



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΙΑΤΡΟΔΙΚΑΣΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
Δ/ντής: Καθηγητής Τσατσάκης Μ. Αριστείδης
ΜΟΝΑΔΑ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ & ΕΓΚΛΗΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΘΕΣΗΣ ΣΕ PCBs ΚΑΙ DDDs (ΠΟΛΥΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΔΙΦΑΙΝΥΛΙΑ
ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ
ΜΑΚΕΔΟΝΙΑΣ, ΑΤΤΙΚΗΣ, ΠΕΛΟΠΟΝΗΣΣΟΥ ΚΑΙ ΚΡΗΤΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ
ΜΑΖΗΣ (MS) ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ (ECD).

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
του
ΕΜΜΑΝΟΥΗΛ Γ. ΜΠΑΡΜΠΟΥΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΥ

Επιβλέπων Καθηγητής:
Δρ. Αριστείδης Μ. Τσατσάκης

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2015



UNIVERSITY OF CRETE
FACULTY OF MEDICINE
DEPARTMENT OF MORPHOLOGY
DIVISION OF FORENSIC SCIENCES & TOXICOLOGY
Director: Professor Tsatsakis M. Aristidis
LABORATORY OF TOXICOLOGY & FORENSIC CHEMISTRY



ASSESSMENT OF PCBs AND DDDs EXPOSURE OF POPULATION SAMPLES FROM
ATTICA, MACEDONIA, PELOPONNOSUS AND CRETE USING MASS SPECTROMETRY
AND ELECTRON CAPTURE DETECTION TECHNIQUES

Ph.D. thesis
EMMANOUIL G. BARBOUNIS
CHEMIST

Supervisor:
Dr. Aristidis M. Tsatsakis

HERAKLION 2015

Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΜΑΧΑΙΡΑ ΚΥΡΙΑΚΗ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α΄, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΜΠΕΝΑΚΕΙΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ

Η ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΚΟΥΤΣΟΛΕΛΟΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΜΑΧΑΙΡΑ ΚΥΡΙΑΚΗ, ΕΡΕΥΝΗΤΡΙΑ Α΄, ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΜΠΕΝΑΚΕΙΟΥ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΥ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟΥ

ΡΙΖΟΣ ΑΠΟΣΤΟΛΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑΣ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΤΖΑΝΑΚΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΑΣ-ΙΣΤΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΤΣΑΤΣΑΚΗΣ ΑΡΙΣΤΕΙΔΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΚΡΗΤΗΣ

ΤΣΑΚΑΛΩΦ ΑΝΔΡΕΑΣ, ΕΠΙΚ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ, ΠΑΝ. ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΨΥΛΛΑΚΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ, ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ, ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ, ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιοπαρακολούθηση της έκθεσης του ανθρώπου σε έμμονους οργανικούς ρύπους (POP) είναι ζωτικής σημασίας για την προστασία της δημόσιας υγείας και την αξιολόγηση της εκτίμησης κινδύνου. Οι ανθρώπινες τρίχες αποτελούν κατάλληλα δείγματα και σημαντικά μέσα για την παρακολούθηση και την αξιολόγηση της έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού σε φαρμακευτικές και άλλες χημικές ουσίες. Η ιδέα της χρησιμοποίησης της ανθρώπινης τρίχας ως δείκτη για την αξιολόγηση της έκθεσης του ανθρώπου σε έμμονους οργανικούς ρύπους (POP) έχει προωθηθεί ιδιαίτερα τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Ένας από τους λόγους για την καθυστερημένη χρήση των συγκεκριμένων βιολογικών δειγμάτων για τη βιοπαρακολούθηση περιβαλλοντικών ρύπων είναι τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που πρέπει να επιτευχθούν στις μεθοδολογίες που εφαρμόζονται για την ανάλυση τους.

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και το 1,1-τριχλωρο-2,2-δις(4-χλωροφαινυλο) αιθάνιο (DDT) και οι μεταβολίτες του είναι μερικοί από τους πιο γνωστά απαντώμενους έμμονους οργανικούς ρύπους. Είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές ενώσεις σε βιολογική και χημική αποικοδόμηση και έχουν μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής στο περιβάλλον. Και οι δύο κατηγορίες ενώσεων (DDTs και PCB) βιο-μεγεθύνονται κατά μήκος της διατροφικής αλυσίδας και συσσωρεύονται, στον άνθρωπο και στους ζωικούς ιστούς. Η βιολογική παρακολούθηση DDTs και PCBs για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου απαιτεί πολύπλοκη προετοιμασία του δείγματος και αναλυτικές διαδικασίες με τη χρήση ευαίσθητων οργανολογικών εξοπλισμών για την επίτευξη των επιθυμητών ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης καθώς και για την επίτευξη της απαραίτητης εκλεκτικότητας.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να προσδιορίσει τα PCBs και DDTs σε δείγματα τριχών μετά από την ανάπτυξη νέων μεθόδων που θα εμφανίζουν ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα. Τα PCBs και DDTs προσδιορίστηκαν σε δείγματα ανθρώπινης τρίχας, από κατοίκους αστικών και αγροτικών περιοχών της Ελλάδας, με την τεχνική της αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-MS) και την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας διπλής εστίασης με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών υψηλής διακρισιμότητας (GC-DFHRMS) μετά από χρήση κατάλληλων τεχνικών εκχύλισης, όπως

στερεή-υγρή εκχύλιση και της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου (HS-SPME).

Πιο συγκεκριμένα, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) εκτιμήθηκαν σε δείγματα ανθρώπινης τρίχας, που προέρχονταν από δύο κύριες γεωργικές περιοχές της Ελλάδας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τις τεχνικές της (α) αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (GC-MS) και (β) αεριοχρωματογραφίας διπλής εστίασης υψηλής διακρισιμότητας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-DFHRMS). Η κύρια αναλυτική διαδικασία περιλαμβάνει την απολύμανση των δειγμάτων τρίχας, την εκχύλιση και τον καθαρισμό των δειγμάτων από διάφορες προσμείξεις. Οι ανακτήσεις των PCBs κυμαίνονταν από 71,2% έως 101,6%, με τις τιμές της πιστότητας, εκφρασμένες σαν % σχετική τυπική απόκλιση να είναι μικρότερες από το 25% για όλους τους υπό προσδιορισμό αναλύτες. Διαφορές στις συχνότητες ανίχνευσης και τις μέσες τιμές των PCB εντοπίστηκαν μεταξύ των εξεταζόμενων περιοχών και μεταξύ των αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόστηκαν. Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν από την περιοχή της Πελοποννήσου βρέθηκαν θετικά για κάθε προσδιοριζόμενο PCB, ενώ το ποσοστό του συνόλου των θετικών δειγμάτων κυμάνθηκε από 86,1% (για τα PCB 138) έως 94,4% (για τα PCB 28 και 153) με χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS. Τα δείγματα των τριχών από την Κρήτη ήταν λιγότερο επιβαρυσμένα (άθροισμα πολυχλωριωμένων διφαινυλίων = 0,61 και 1,47 pg/mg) σε αντίθεση με τα δείγματα της Πελοποννήσου (άθροισμα πολυχλωριωμένων διφαινυλίων = 24,68 και 38,74 pg/mg) όπως προσδιορίστηκαν τόσο με GC-DFHRMS όσο και με GC-MS. Τα PCBs με υψηλό βαθμό χλωρίωσης έδωσαν χαμηλότερες τιμές συγκέντρωσης σε σύγκριση με τα αντίστοιχα PCBs με χαμηλό βαθμό χλωρίωσης και στους δύο πληθυσμούς. Επίσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ γυναικών και ανδρών. Η τεχνική GC-DFHRMS παρείχε υψηλότερο ποσοστό θετικών δειγμάτων και χαμηλές διάμεσες τιμές για PCBs, λόγω της υψηλότερης ευαισθησίας και τις μικρότερες παρεμποδίσεις από ισοβαρικά ιόντα σε σύγκριση με την τεχνική GC-MS και, ως εκ τούτου θεωρείται ως ένα ισχυρό εργαλείο για τέτοιες εκτιμήσεις σε δείγματα τριχών.

Επιπλέον, με την παρούσα εργασία επιτεύχθηκε να αναπτυχθεί μια ταχεία και οικονομική μέθοδος που χρησιμοποιεί την τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς

φάσης υπερκείμενου χώρου (HSSPME) για την εκχύλιση και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των PCBs-DDTs από τα δείγματα τρίχας, καθώς και για την βιοπαρακολούθηση τους. Συνολικά 72 δείγματα τριχών της κεφαλής συλλέχθηκαν από παιδιά που ζουν σε αστικές και αγροτικές περιοχές του νησιού της Κρήτης. Διακόσια χιλιοστόγραμμα δείγματος τρίχας χωνεύθηκαν υπό αλκαλικές συνθήκες και θερμάνθηκαν για 30 λεπτά στους 90 ° C, ενώ μία ίνα 65 μm τύπου PDMS / DVB εκτέθηκε εντός του υπερκείμενου χώρου του φιαλιδίου. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου (χρόνος επώασης, ταχύτητα ανάδευσης, ανάκτηση, πιστότητα, επίδραση της μήτρας, γραμμικότητα και εκλεκτικότητα) εξετάστηκαν. Οι ανακτήσεις για τα DDTs σε εμβολιασμένα δείγματα τριχών υπολογίστηκαν από 42,3% για το ορDDD σε 87,1% για το ορDDE, ενώ οι ανακτήσεις των ομοειδών PCB κυμάνθηκαν από 52,6% για το PCB138 έως 96,6% για το PCB28. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε για την ανάλυση δειγμάτων τρίχας. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ($p = 0,001$), της συνολικής περιεκτικότητας σε DDTs (sumDDTs), καθώς και των συχνοτήτων ανίχνευσης θετικών δειγμάτων ($p = 0,020$) μεταξύ των περιοχών που εξετάστηκαν. Επιπλέον, σημαντικές διαφορές στις συγκεντρώσεις των ομοειδών PCB παρατηρήθηκαν για το PCB52 ($p < 0,001$) και το PCB28 ($p = 0,017$), μεταξύ των αστικών και των αγροτικών περιοχών. Η εφαρμογή της HSSPME για τη βιοπαρακολούθηση των DDTs και PCBs αποδείχτηκε και εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανάλυση των εμβολιασμένων και μη εμβολιασμένων δειγμάτων τρίχας. Η HSSPME βρέθηκε να είναι σημαντικά απλούστερη και ταχύτερη διαδικασία σε σχέση με άλλες προηγούμενες διαδικασίες επεξεργασίας βιολογικών δειγμάτων.

Ανακεφαλαιώνοντας, όλες οι μέθοδοι αποδείχθηκαν να είναι ακριβείς, αφού όλες οι ανακτήσεις που ελήφθησαν ήταν υψηλότερες από 42% και οι %σχετικές τυπικές αποκλίσεις μικρότερες από 25%. Από τη συγκεκριμένη μελέτη αποδείχτηκε ότι η τεχνική GC-DFHRMS εμφανίζει υψηλότερη ευαισθησία και λιγότερες παρεμποδίσεις σε σχέση με την τεχνική GC-MS και, ως εκ τούτου θεωρείται ως ένα ισχυρό εργαλείο για τέτοιες εκτιμήσεις σε δείγματα τριχών. Επιπλέον, η τεχνική εκχύλισης HSSPME αποδείχτηκε να είναι σημαντικά απλούστερη και ταχύτερη διαδικασία από τις υπόλοιπες μεθόδους προκατεργασίας βιολογικών δειγμάτων. Τέλος, όλα τα δείγματα τρίχας που εξετάστηκαν από την Πελοπόννησο βρέθηκαν θετικά για κάθε προσδιοριζόμενο PCB, ενώ τα δείγματα από την Κρήτη εμφάνισαν μικρότερες

περιεκτικότητες. Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ γυναικών και ανδρών.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Η χρήση της ανθρώπινης τρίχας ως δείκτης για την αξιολόγηση της έκθεσης στις χημικές ενώσεις PCB και DDTs.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Δείγματα τρίχας, πολυχλωριωμένα διφαινύλια, 1,1,1-τριχλωρο-2,2-δισ(4-χλωροφαινυλο)αιθάνιο), αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών, αεριοχρωματογραφίας διπλής εστίασης υψηλής διακρισιμότητας με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών, μικροεκχύλισης στερεάς φάσης υπερκείμενης φάσης.

ABSTRACT

Human exposure to persistent organic pollutants (POPs) assessment is crucial for public health protection and risk assessment. Hair sample is a suitable and important medium for monitoring and evaluation of exposure to drugs or to chemical substances. The idea of using human hair as an indicator in assessing exposure to persistent organic pollutants (POPs) has been advancing for the last two decades. One of the reasons for the late development of environmental biomonitoring using human hair as a matrix is the low detection limits which need to be achieved.

PCBs and DDTs are some of the most known POPs. They are resistant to biological and chemical degradation and have long environmental half-lives. Both DDTs and PCBs accumulate in the food chain, in human and animal tissues. The biomonitoring of DDTs and PCBs for the estimation of human exposure requires complex sample preparation and analytical procedures using sensitive state-of-the-art instrumentation to achieve the desired selectivity and quantification limits.

The purpose of this study was to determine PCBs and DDTs in hair samples using precise and accurate methods. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) levels were determined in human hair samples, originating from urban and rural regions of Greece, by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and gas chromatography–double focusing high resolution mass spectrometry (GC–DFHRMS) using solid–liquid extraction and headspace solid phase microextraction (HSSPME) technique.

Polychlorinated biphenyls (PCBs) levels were assessed in human hair samples, originating from two main agricultural regions of Greece. The analysis was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and gas chromatography–double focusing high resolution mass spectrometry (GC–DFHRMS). The main analytical procedure involved hair decontamination, solid–liquid extraction and cleanup steps. The recoveries of PCBs ranged from 71.2% to 101.6%, with accuracies greater than 87.5% and the between run precisions (%RSD) lower than 25% for all analytes. Differences in the frequencies of detection and the median values of PCBs were detected between the examined regions and between the applied

analytical techniques. All Peloponnesus' hair examined samples were found positive for each examined PCB, while the percentage of the total positive samples ranged from 86.1% (for PCB 138) to 94.4% (for PCB 28 and 153 congeners) using GC–DFHRMS. The Cretan hair samples were less contaminated (SUM PCBs = 0.61 and 1.47 pg/mg) unlike the Peloponnesus' samples (SUM PCBs = 24.68 and 38.74 pg/mg) measured by GC–DFHRMS and GC–MS, respectively. PCBs with high chlorination gave lower concentration values compared to low chlorination PCBs in both populations. No significant differences were observed between women and men. The GC–DFHRMS technique provided higher percentage of positive samples and low PCBs median values, due to higher sensitivity and interferences from isobaric ions in the GC–MS technique and is therefore considered as a powerful tool for such assessments in hair specimens.

Furthermore, headspace solid phase microextraction (HSSPME) technique was developed as a rapid and cost efficient hair extraction method for the simultaneous determination and biomonitoring of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane) (DDT) and its isomers/metabolites and polychlorinated biphenyls (PCBs) in hair samples. A total of 72 head hair samples were collected from children living in urban and rural regions of the island of Crete. Two hundred milligrams of hair were digested under alkaline conditions and thermostated for 30min at 90°C while a 65 µm PDMS/DVB fibre was exposed into the headspace of the vial. Analytical parameters of the method (time of incubation, agitation speed, recovery, precision, accuracy, carry over, matrix effect, linearity, and selectivity) were examined. Recoveries of the DDTs in the spiked hair samples were calculated from 42.3% for opDDD to 87.1% for opDDE, while recoveries for PCB congeners were from 52.6% for PCB138 to 96.6 % for PCB28. The method was applied for the analysis of authentic hair samples. Significant differences ($p=0.001$) of the burden to total DDTs (sumDDTs) as well as of the frequencies of detection of positive samples ($p=0.020$) were observed between the examined regions. Moreover, significant differences in the detected concentrations of PCB congeners were observed for PCB52 ($p<0.001$) and PCB28 ($p=0.017$) as well for their prevalence between urban and rural regions. Application of HSSPME for the biomonitoring of DDTs and PCBs biomarkers in hair was tested and successfully applied to the analysis of spiked and authentic hair samples.

HSSPME was found to be substantially simpler and faster procedure than previous reported sample treatment procedures.

Summarizing, all methods proved to be both accurate and precise since all recoveries obtained were higher than 42% and %relative standard deviation values lower than 25%. The GC–DFHRMS technique gave higher sensitivity and provided less interferences from isobaric compared to the GC–MS technique and was therefore considered as a powerful tool for such assessments in hair specimens. Furthermore, HSSPME was found to be substantially simpler and faster procedure than previous reported sample treatment procedures. Finally, all Peloponnesus' hair examined samples were found positive for each examined PCB whereas the the Cretan hair samples were less contaminated (PCBs with high chlorination gave lower concentration values compared to low chlorination PCBs in both populations. No significant differences were observed between women and men.

SUBJECT AREA: The use of human hair as an indicator in assessing exposure to PCBs and DDTs.

KEYWORDS: Hair samples, Polychlorinated biphenyls, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane), gas chromatography–mass spectrometry, gas chromatography–double focusing high resolution mass spectrometry, headspace solid phase microextraction.

Αφιερωμένο στην Ελένη Φίλιου , την αγαπημένη μου γιαγιά

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	9
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	14
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	19
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	23
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	25
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	27
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Έμμονοι οργανικοί ρύποι (PCBs-DDTs)	32
1.1 Εισαγωγή.....	32
1.2 Ταυτότητα και φυσικοχημικές ιδιότητες	34
1.3 Αναλυτικές μέθοδοι ποροσδιορισμού των PCBs-DDTs σε βιολογικά δείγματα	45
1.4 Πηγές ανθρώπινης και περιβαλλοντικής έκθεσης	46
1.5 Περιβαλλοντική μεταφορά, κατανομή και μετασχηματισμός	47
1.5.1 Μεταφορά και κλασματοποίηση	47
1.5.2 Μετασχηματισμός και αποικοδόμηση.....	50
1.6 Περιβαλλοντικά επίπεδα και ανθρώπινη έκθεση.....	51
1.6.1 Επίπεδα συγκεντρώσεων PCBs-DDTs στο περιβάλλον	51
1.6.2 Ανθρώπινη έκθεση	53
1.6.3 Συγκεντρώσεις στον ορό	56
1.7 Κινητική και μεταβολισμός σε πειραματόζωα και ανθρώπους	56
1.8 Επίδραση σε θηλαστικά και in-vitro συστήματα ελέγχου.....	58
1.8.1 Συγκεντρώσεις στον λιπώδη ιστό	58
1.8.2 Βραχυχρόνια έκθεση	59
1.8.3 Μακροχρόνια έκθεση και καρκινογένεση.....	59
1.9 Γενοτοξικότητα και σχετικές παράμετροι.....	65

1.10	Αναπαραγωγική τοξικότητα	66
1.10.1	Επιπτώσεις στη γονιμότητα.....	66
1.10.2	Επίδραση στο ενδοκρινικό σύστημα	67
1.10.3	Επίδραση στην ανάπτυξη.....	68
1.10.4	Ανοσοτοξικότητα	71
1.10.5	Νευρολογικές επιδράσεις	74
1.11	Μηχανισμοί δράσης	73
1.12	Επίδραση στον άνθρωπο	75
1.12.1	Καρκινογένεση	76
1.12.2	Γενοτοξικότητα	78
1.12.3	Αναπαραγωγική τοξικότητα	78
1.12.4	Ανάπτυξη και εξέλιξη.....	79
1.12.5	Επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα	80
1.12.6	Νευρολογικές επιδράσεις	81
1.13	Εκτίμηση επικινδυνότητας.....	81
1.13.1	Εκτίμηση κινδύνου και αξιολόγηση δόσης-απόκρισης.....	82
1.13.2	Κριτήρια για τον καθορισμό της ανεκτής πρόσληψης και συγκεντρώσεων για τα PCBs.....	83
2.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: Ο κύκλος της τρίχας.....	85
2.1	Εισαγωγή.....	85
2.2	Μορφογένεση.....	86
2.3	Ανάπτυξη	87
2.4	Μετάβαση από την ανάπτυξη στην αποτύπωση.....	87
2.5	Απόπτωση	88
2.6	Ανάπαυση.....	88
2.7	Μετάβαση από την ανάπαυση στην ανάπτυξη	89
2.8	Η χρήση της τρίχας ως δείκτη ανθρώπινης έκθεσης σε ρύπους.....	89

2.9	Μηχανισμός ενσωμάτωσης των ξενοβιοτικών στην τρίχα.....	90
3.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Μικροεκχύλιση στερεής φάσης από την υπερκείμενη αέρια φάση (Head Space-Solid Phase Microextraction, HS-SPME)	97
3.1	Εισαγωγή-Αναδρομή	97
3.2	Φυσικοχημική βάση της εκχύλισης	99
3.3	Διάχυση σε αναδευόμενη υδατική φάση	110
4.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Αέρια χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας (GC/MS)	115
4.1	Εισαγωγή.....	115
4.2	Φασματόμετρο μαζών.....	115
4.3	Πηγές ιόντων	116
4.4	Φάσματα με πηγή EI.....	119
4.5	Ισοτοπικές κορυφές	121
4.6	Τετραπολικός αναλυτής μαζών	121
4.7	Διαδρομή ιόντων στο τετράπολο.....	122
4.8	Εξισώσεις κίνησης	122
4.9	Διακριτική ικανότητα.....	125
4.10	Μεταλλάκτες ιόντων	126
4.11	Απαιτήση για υψηλό κενό	126
4.12	Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μαζών	126
4.13	Αναλυτής μάζας μαγνητικού τομέα	127
4.13.1	Βασικές αρχές της μέτρησης	127
4.13.2	Εισαγωγή του δείγματος.....	128
4.13.3	Μονής εστίασης διαχωρισμός με μαγνητική εκτροπή	128
4.13.4	Διαχωρισμός διπλής εστίασης.....	130
4.13.5	Γεωμετρίες που χρησιμοποιούνται στα όργανα διπλής εστίασης	132

5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: Αέρια χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας (GC/MS)	134
5.1 Εισαγωγή.....	134
5.2 Τεχνικές ποσοτικοποίησης.....	134
5.2.1 Μέθοδος εξωτερικών προτύπων	134
5.2.2 Μέθοδος καμπύλης προσαρμοσμένης στη μήτρα του δείγματος	134
5.2.3 Μέθοδος γνωστών πολλαπλών προσθηκών	135
5.2.4 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου.....	135
5.3 Αξιολόγηση-επικύρωση μεθόδου	136
6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Σκοπός της εργασίας.....	139
7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: Εκτίμηση της έκθεσης της ανθρώπινης τρίχας σε PCBs με χρήση της τεχνικής αεριοχρωματογραφίας υψηλής διακριτικής ικανότητας (διπλής εστίασης) με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών.....	141
7.1 Εισαγωγή.....	141
7.2 Συλλογή δειγμάτων.....	141
7.3 Αντιδραστήρια.....	141
7.4 Μέθοδος εκχύλισης.....	142
7.5 Αναλυτικές τεχνικές.....	142
7.5.1 Ανάλυση με χρήση της τεχνικής GC–DFHRMS.....	142
7.5.2 Ανάλυση με χρήση της τεχνικής GC–MS	148
7.6 Στατιστική ανάλυση.....	150
7.7 Αποτελέσματα-Συζήτηση	150
7.7.1 Ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου.....	150
7.7.2 <i>Μελέτη της έκθεσης του ανθρώπου σε PCBs μέσω της τρίχας.....</i>	<i>153</i>
7.8 Συμπεράσματα	166
8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: Μελέτη της έκθεσης παιδιών σε DDTs και PCBs μετά από ανάπτυξη μιας ταχείας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους σε δείγματα τρίχας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου και αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματογράφου μάζας (HSSPME/GC-MS)	168

8.1	Εισαγωγή.....	168
8.2	Συλλογή δειγμάτων.....	169
8.3	Αντιδραστήρια.....	169
8.4	Προκατεργασία δειγμάτων-HSSPME.....	170
8.5	Οργανολογία.....	170
8.6	Στατιστική Ανάλυση	172
8.7	Αποτελέσματα και συζήτηση.....	172
8.7.1	Αξιολόγηση-επικύρωση μεθόδου	172
8.7.2	Καταγραφή της έκθεσης μικρών παιδιών σε PCBs και DDTs	178
8.8	Συμπεράσματα	189
9.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9: Γενικά συμπεράσματα	190
9.1	Εισαγωγή.....	190
9.2	Επιλογή μέσου βιοπαρακολούθησης των POPs.....	190
9.3	Η σημασία της ευαισθησίας της αναλυτικής τεχνικής στην ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση για τον προσδιορισμό χαμηλών επιπέδων έκθεσης	192
10.	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	198
11.	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	201
12.	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	203
13.	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	234

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Παράδειγμα σύνθεσης 4-υδροξυ PCBs.....	33
Σχήμα 1.2: Σύστημα αρίθμησης μορίου διφαινυλίου. Στα PCBs, μερικά ή όλα από τα 10 άτομα υδρογόνου (που συνδέονται με άτομα άνθρακα είναι αριθμημένα από 2-6 και από 2'-6') έχουν αντικατασταθεί με άτομα χλωρίου.....	35
Σχήμα 1.3: Σχηματική παράσταση της βραδείας αποδέσμευσης των PCBs από το χώμα.....	48
Σχήμα 1.4: Σχηματική παράσταση της τύχης των PCBs στο περιβάλλον	49
Σχήμα 2.1: Μορφογένεση της τρίχας.....	86
Σχήμα 2.2: (α) Δομή του Δέρματος . (β) Δομή του θύλακα της τρίχας . (γ) Τομή της τρίχας.....	90
Σχήμα 2.3: Ενσωμάτωση και αποβολή των ξενοβιοτικών στην τρίχα.....	95
Σχήμα 3.1: (α) Η γεωμετρία της τεχνικής HS-SPME. (β) Μονοδιάστατο μοντέλο της διάχυσης των τριών φάσεων. Όπου K1 και K-2 είναι οι συντελεστές κατανομής της επικάλυψης/υπερκείμενης φάσης και υπερκείμενης φάσης/υδατικού διαλύματος, αντίστοιχα, D1, D2 και D3 είναι οι συντελεστές διάχυσης του αναλύτη στην επικάλυψη, στην υπερκείμενη φάση και στην υδατική φάση αντίστοιχα, C1, C2 και C3 είναι οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στην επικάλυψη, στην υπερκείμενη φάση και στην υδατική φάση αντίστοιχα, a, b-a, και c-b είναι το πάχος της επικάλυψης, της υπερκείμενης φάσης και της υδατικής φάσης αντίστοιχα,	103
Σχήμα 3.2: Προφίλ συγκεντρώσεων στις τρεις φάσεις σε διαφορετικά στάδια διάχυσης σε στατική υδατική φάση..	107
Σχήμα 3.3: Προφίλ χρόνου της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε στατική υδατική φάση, για: (A), (B) και (C).....	108
Σχήμα 3.4: Προφίλ της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε στατική υδατική φάση, για (A), (B) και (C)	110
Σχήμα 3.5: Προφίλ της συγκέντρωσης στις τρεις φάσεις σε διαφορετικά στάδια της διάχυσης σε καλά αναδευόμενη υδατική φάση, σε: (A), (B), (C) και (D).....	111

Σχήμα 3.6: Προφίλ της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε αναδευόμενη υδατική φάση για: (A), (B) και (C).....	112
Σχήμα 3.7: Προφίλ της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε αναδευόμενη υδατική φάση για: (A), (B) και (C).....	113
Σχήμα 3.8: Σχέση μεταξύ χρόνου ισορροπίας και K_2 με $K = 1000$	114
Σχήμα 4.1: Πηγή ιόντων EI.....	117
Σχήμα 4.2: Πηγή ιόντων και σύστημα φακών	118
Σχήμα 4.3: Φάσμα μάζας $C_7H_6Cl_2$	119
Σχήμα 4.4: Βασική κορυφή $C_7H_6Cl_2$	120
Σχήμα 4.5: Μοριακό ιόν $C_7H_6Cl_2$	120
Σχήμα 4.6: Θυγατρικά ιόντα $C_7H_6Cl_2$	120
Σχήμα 4.7: Τετραπολικός αναλυτής μαζών	121
Σχήμα 4.8: Δυναμικό στις ράβδους του τετράπολου.	123
Σχήμα 4.9: Η περιοχή A καλείται περιοχή σταθερότητας και είναι συμμετρική γύρω από τον άξονα. Συνήθως λαμβάνεται υπόψη μόνο το άνω τμήμα της περιοχής ενώ το κάτω λαμβάνεται με αλλαγή των ηλεκτρικών συνδέσεων του τετράπολου..	124
Σχήμα 4.10: Περιοχές σταθερότητας για ιόντα με διαφορετικές μάζες ($m_1 > m_2 > m_3$). Με τη γραμμική μεταβολή του ω ως προς το θ λαμβάνεται μια ευθεία γραμμή η οποία επιτρέπει την επιτυχή παρατήρηση αυτών των ιόντων. Αν αυξηθεί η κλίση της γραμμής αυξάνεται η διακριτική ικανότητα όσο η γραμμή διέρχεται από τις περιοχές σταθερότητας. Όταν το θ η διακριτική ικανότητα μηδενίζεται.....	125
Σχήμα 4.11: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών-δυνόδων.....	126
Σχήμα 4.12: Φασματογράφος μάζας μαγνητικού τομέα	127
Σχήμα 4.13: Οι δύο διαφορετικές γεωμετρίες που χρησιμοποιούνται στα όργανα διπλής εστίασης	132
Σχήμα 5.1: Τυπική καμπύλη γνωστών πολλαπλών προσθηκών	135
Σχήμα 7.1: Το σύστημα FS High Resolution GC/MS (Thermo Scientific, West Palm Beach, USA).....	143

Σχήμα 7.2: Καμπύλες εξωτερικών προτύπων για τα PCB 28, 52, 101 και 138 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS	151
Σχήμα 7.3: Καμπύλες σταθερών προσθηκών για τα PCB 28, 52, 101 και 138 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS	151
Σχήμα 7.4: Καμπύλες εξωτερικών προτύπων για τα PCB 118, 153, και 180 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS	152
Σχήμα 7.5: Καμπύλες γνωστών προσθηκών για τα PCB 118, 153, και 180 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS	152
Σχήμα 7.6: : Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 28: Χρόνος ανάλυσης 16,83; PCB 31: Χρόνος ανάλυσης 16,56, PCB 37: Χρόνος ανάλυσης 20,31	157
Σχήμα 7.7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 52: Χρόνος ανάλυσης 18,09; PCB 77: Χρόνος ανάλυσης 25,78; PCB 81: Χρόνος ανάλυσης 25,05	157
Σχήμα 7.8: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 101: Χρόνος ανάλυσης 22,89; PCB118: Χρόνος ανάλυσης 26,86; PCB 105: Χρόνος ανάλυσης 28,27; PCB126: Χρόνος ανάλυσης 30,27	158
Σχήμα 7.9: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 138: Χρόνος ανάλυσης 29,07; PCB153: Χρόνος ανάλυσης 27,66; PCB 167: Χρόνος ανάλυσης 31,09; PCB156: Χρόνος ανάλυσης 30,26	158
Σχήμα 7.10: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 180: Χρόνος ανάλυσης 32,66; PCB189: Χρόνος ανάλυσης 36,23	159
Σχήμα 7.11: Οι κατανομές του κάθε ομοειδούς PCB και για τα δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με χρήση και των δύο τεχνικών	163
Σχήμα 7.12: Περιεκτικότητα PCBs σε δείγματα τρίχας γυναικών και αντρών από τις περιοχές της Κρήτης και της Πελοποννήσου	166
Σχήμα 8.1: Τυπικά χρωματογραφήματα των: (Α) προτύπου διαλύματος μείγματος των PCB και DDTs, (Β) εμβολιασμένου δείγματος σε	

συγκεντρώσεις 1 και 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για PCB και DDTs, αντίστοιχα, (Γ) δείγμα τρίχας θετικό για τα PCB52, 101, και 138 και για $o\text{p}$ και $p\text{pDDE}$ και (Δ) λευκό δείγμα τρίχας που εμβολιάστηκε μόνο με το εσωτερικό πρότυπο.....	176
Σχήμα 8.2: Επίδραση του χρόνου επώασης και της ταχύτητας ανάδευσης στο εμβασμό κορυφής των PCBs και DDTs	178
Σχήμα 8.3: %Ποσοστό εμφάνισης των (A)PCBs και (B)DDTs στον πληθυσμό μικρών παιδιών από τις διάφορες περιοχές που εξετάστηκαν	182

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Συσχετισμός συστημάτων ονοματολογίας PCBs.	36
Πίνακας 1.2: Φυσικές και χημικές ιδιότητες των περισσότερο τοξικών PCBs.	40
Πίνακας 1.3: Συγκέντρωση (mol%) των εμπορικά συνηθισμένων PCBs προϊόντων.....	42
Πίνακας 1.4: Συγκέντρωση (mol%) των περισσότερο τοξικών Aroclors.....	43
Πίνακας 1.5: Σύσταση (%) διαφόρων Aroclors	44
Πίνακας 1.6: Ενδεικτικές περιεκτικότητες PCBs στον αέρα σε διάφορες χώρες	53
Πίνακας 1.7: Ηπατικοί όγκοι σε αρουραίους μετά από χορήγηση μιγμάτων PCBs.....	63
Πίνακας 7.1: Λειτουργικά και αναλυτικά χαρακτηριστικά του αεριοχρωματογράφου.....	143
Πίνακας 7.2: Ανίχνευση πολλαπλών ιόντων (MID) με τη χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS	145
Πίνακας 7.3: Λόγος m/z και χρόνοι κατακράτησης για κάθε υπό εξέταση PCB	150
Πίνακας 7.4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου	153
Πίνακας 7.5: Η διάμεση τιμή, οι τιμές 1ου και 3ου τεταρτημορίου και ο αριθμός των %θεικών δειγμάτων για τον πληθυσμό της Κρήτης και της Πελοποννήσου με τις τεχνικές GC-MS και GC-DFHRMS.....	155
Πίνακας 7.6: Η αναλυτική περιεκτικότητα των δειγμάτων (pg/mg) στα διάφορα PCBs για την περιοχή της Αμαλιάδας στην Πελοπόννησο και της Ιεράπετρας στην Κρήτη με την τεχνική GC-DFHRMS.....	161
Πίνακας 7.7: Η αναλυτική περιεκτικότητα των δειγμάτων (pg/mg) στα διάφορα PCBs για την περιοχή της Αμαλιάδας στην Πελοπόννησο και της Ιεράπετρας στην Κρήτη με την τεχνική GC-MS.....	162
Πίνακας 7.8: %Συνεισφορά για κάθε ομοειδές PCB και για τις δύο υπό εξέταση περιοχές	165
Πίνακας 8.1: Αναλυτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά προσδιορισμού PCBs-DDTs σε δείγματα τρίχας με GC-MS.	175

Πίνακας 8.2: Μέσες, διάμεσες τιμές και συχνότητα εμφάνισης θετικών δειγμάτων για τα PCBs όπως προσδιορίστηκαν σε δείγματα τρίχας μικρών παιδιών από αστικές και αγροτικές περιοχές της Κρήτης.....	180
Πίνακας 8.3: Μέσες, διάμεσες τιμές και συχνότητα εμφάνισης θετικών δειγμάτων για τα DDTs όπως προσδιορίστηκαν σε δείγματα τρίχας μικρών παιδιών από αστικές και αγροτικές περιοχές της Κρήτης.....	183
Πίνακας 9.1: Σύγκριση των λειτουργικών χαρακτηριστικών των Φασματογράφων Μάζας που θεωρούνται κατάλληλοι για τον προσδιορισμό των POPs.	194
Πίνακας 9.2: Σύγκριση αναλυτικών χαρακτηριστικών της παρούσας διατριβής σε σχέση με τη βιβλιογραφία.....	196

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διεξαγωγή και η περαίωση μιας Διδακτορικής Διατριβής αποτελεί μία ξεχωριστή εμπειρία. Στον επαγγελματικό μου στίβο ασχολούμαι πολλά χρόνια με την εφαρμογή σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών και έχω συνεργαστεί με πολλούς Πανεπιστημιακούς Δασκάλους , ερευνητές , υποψήφιους διδάκτορες, συναδέλφους χημικούς που ασχολούνται στον τομέα του ποιοτικού ελέγχου αλλά και με στελέχη των τμημάτων Έρευνας και Ανάπτυξης κατασκευαστικών Οίκων του εξωτερικού.

Αυτό το εργασιακό περιβάλλον μου δημιούργησε μία εσωτερική ανησυχία και δίψα για να πραγματοποιήσω μία αυτόνομη ερευνητική εργασία στα πλαίσια μιας Διατριβής. Ο επιβλέπων Καθηγητής μου κ. Αριστείδης Τσατσάκης, μου έδωσε αυτή την ευκαιρία και μου συμπαραστάθηκε απόλυτα σε κάθε σημείο αυτής της δύσκολης διαδρομής .Κάθε συνάντηση μαζί του μου έδινε ώθηση και αισιοδοξία για να ολοκληρώσω αυτή την εργασία .Οι πολύτιμες συμβουλές του με ενέπνευσαν όχι μόνο μόνο σε ότι αφορά στην εκπόνηση αυτής της διατριβής αλλά και στην προσωπικό και επαγγελματικό μου βίο. Του οφείλω μέσα από την καρδιά μου ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Επιθυμώ να ευχαριστήσω τους επιβλέποντες αυτής της Διατριβής τον καθηγητή κ. Τσακάλωφ και την Διευθύντρια του Μπενακείου κ. Μαχαίρα γιατί στήριξαν με το κύρος τους και την επιστημονική τους γνώση την προσπάθειά μου. Ευχαριστώ θερμά τους καθηγητές της επταμελούς επιτροπής, τον κ. Αθανάσιο Κουτσολέλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν.Κρήτης, τον κ. Γεώργιο Τζανακάκη, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Παν. Κρήτης, τον κ. Απόστολο Ρίζο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Παν. Κρήτης και την κα Ελευθερία Ψυλλάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Πολυτεχνείου Κρήτης για την τιμή που μου επιφύλαξαν

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω για τον Επίκουρο καθηγητή του Εργαστηρίου κ. Μανώλη Τζατζαράκη, ο οποίος με δρομολόγησε επιστημονικά, με συμβούλεψε πολλές φορές, με στήριξε δυναμικά σε πολλά θέματα και μου έδειχνε κάθε φορά την κατεύθυνση που θα πρέπει να ακολουθήσω. Η ευγενική του προσωπικότητα και η παροιμιώδης καλοσύνη του αποτέλεσε για μένα μία όαση σε κάθε δύσκολη στιγμή.

Στις εργασίες που δημοσιεύτηκαν την στατιστική επεξεργασία πραγματοποίησε ο Δρ. Αθανάσιος Αλεγκάκης τον οποίο και ευχαριστώ. Παράλληλα με την ερευνητική εργασία συνέχισα να εργάζομαι στην εταιρεία Επιστημονικών οργάνων Ν. ΑΣΤΕΡΙΑΔΗΣ Α.Ε. Ένα μεγάλο ευχαριστώ το απευθύνω στον ιδιοκτήτη και Διευθύνοντα Σύμβουλο κ. Γεώργιο Αστεριάδη που μου παρείχε κάθε δυνατή διευκόλυνση για συνεχίσω και να ολοκληρώσω τη Διατριβή μου.

Από αυτό το βήμα δεν θέλω να παραλείψω να ευχαριστήσω τη σύζυγό μου Ανθή Ακαρέπη και την κόρη μου Θεοδώρα για τη μεγάλη δύναμη που μου δίνουν καθημερινά.

Μία διδακτορική διατριβή πρέπει να εκφράζει τα επιστημονικά ενδιαφέροντα του συγγραφέα της . Αυτός ο στόχος έχει επιτευχθεί σε μεγάλο βαθμό. Πρέπει όμως να παρουσιάζει και μία επιστημονική πρωτοτυπία και μία επιστημονική χρησιμότητα. Στην παρούσα διατριβή καταβλήθηκε κάθε δυνατή προσπάθεια για να πραγματοποιηθούν και οι δύο στόχοι. Το παρόν ερευνητικό εγχείρημα δεν διεκδικεί "δάφνες τελειότητας" και πλήρους κάλυψης ενός σημαντικού ερευνητικού αντικειμένου όπως είναι η έκθεση του πληθυσμού σε ξενοβιοτικές οργανικές ενώσεις και οι επιπτώσεις που έχει αυτή η έκθεση στην ανθρώπινη υγεία. Ελπίζω όμως να δώσει έναυσμα σε άλλους ερευνητές για να ασχοληθούν με τη μελέτη νέων τεχνικών ανάλυσης που θα συμβάλουν στην βελτίωση των συνθηκών ζωής της κοινωνίας μας.

Ηράκλειο Κρήτης 2015

Εμμανουήλ Μπαρμπούνης

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

1. Προσωπικά Στοιχεία

Όνομα: Εμμανουήλ
Επίθετο: Μπαρμπούνης
Πατρώνυμο: Γεώργιος
Ημερομηνία Γέννησης: 16 Αυγούστου 1963
Οικογενειακή Κατάσταση: Έγγαμος με ένα τέκνο
Διεύθυνση Κατοικίας: Αναστάσεως 32, 15669 Παπάγου, Αθήνα
Τηλέφωνο: 210-6511498, 6945-599624.
E-mail: mb@asteriadis.gr

2. Σπουδές

1991 Πτυχίο Χημείας από το Πανεπιστήμιο της Μεσσηνίας, Ιταλία, με αναγνώριση Πτυχίου από το ΔΙ.Κ.Α.Τ.Σ.Α. (1991) και βαθμό πτυχίου 8.5.

2008 – σήμερα Υποψήφιος Διδάκτορας του Εργαστηρίου Τοξικολογίας, Τομέας Μορφολογίας, Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης

3. Ξένες γλώσσες

- **Αγγλικά** σε επαγγελματικό επίπεδο γραπτού και προφορικού λόγου.
- **Ιταλικά** σε επαγγελματικό επίπεδο γραπτού και προφορικού λόγου.

4. Διαρκής εκπαίδευση

- 1993, Σεμινάριο διάρκειας 350 ωρών με θέμα «Διαχείριση Ολικής Ποιότητας».
- 1996–2014, Παρακολούθηση μεγάλου αριθμού Σεμιναρίων σε θέματα οργανολογίας επιστημονικών οργάνων. Διαρκής επικαιροποίηση σε σύγχρονες τεχνολογίες χρωματογραφίας, φασματοφωτομετρίας και φασματογραφίας μάζας.
- 1996–2014, Παρακολούθηση Σεμιναρίων σε θέματα Διασφάλισης Ποιότητας, Νομοθεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων.

5. Επαγγελματική εμπειρία

- 2007 έως σήμερα, Προϊστάμενος πωλήσεων και επιστημονικής υποστήριξης επιστημονικών οργάνων στην εταιρεία Ν. ΑΣΤΕΡΙΑΔΗΣ Α.Ε.
- 1997-2007, Προϊστάμενος επιστημονικής υποστήριξης στην εταιρεία Ν.ΑΣΤΕΡΙΑΔΗΣ Α.Ε.
- 1993-1997, Προϊστάμενος Χημικού Εργαστηρίου ποιοτικού ελέγχου ελαιολάδων, Ελληνικός Σύνδεσμος Βιοτεχνών Τυποποίησης Ελαιολάδων - Ε.Σ.ΒΙ.Τ.Ε .
- 1991-1993, Χημικός – Αναλυτής ποιοτικού Ελέγχου, Εταιρεία ζαχαρωδών προϊόντων.

6. Δραστηριότητες στην Ε.Ε.Χ. – Παράλληλη επαγγελματική εμπειρία

- 1997-2013, Μέλος του Δ.Σ του Επιστημονικού Τμήματος Τροφίμων.
- 2004-2008, Μέλος του Συμβουλίου Πιστοποίησης του Ελληνικού Οργανισμού Τυποποίησης, ΕΛΟΤ.
- 1994-1998, Χημικός, αναλυτής στο εργαστήριο Ποιοτικού Ελέγχου Τροφίμων, Food Control – Γιώργος Αλυσανδράτος.
- 1993-2000, Χημικός – σύμβουλος επιχειρήσεων σε παραστάσεις στο Ανώτατο Χημικό Συμβούλιο. Την περίοδο αυτή συμμετείχα σε 95 παραστάσεις στο Α.Χ.Σ.
- 2000 έως σήμερα, Εισηγητής σε σεμινάρια της Ένωσης Ελλήνων Χημικών, Ε.Ε.Χ, σε θέματα θεωρίας και λειτουργίας ενόργανης ανάλυσης.

7. Επιστημονικό – συγγραφικό έργο

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ ΜΕ ΚΡΙΤΕΣ

(PUBLICATIONS)

1. **Barbounis EG**, Tzatzarakis MN, Alegakis A, Kokkinaki A, Karamanos N, Tsakalof A, Tsatsakis AM. Assessment of PCBs exposure in human hair applies double focusing high resolution mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Toxicology Letters*, 210 (2), 225-231, 2012
2. Tzatzarakis M, **Barbounis EG**, Kavvalakis M, Vakonaki E, Renieri E, Vardavas AI, Tsatsakis AM. Rapid method for the simultaneous

- determination of DDTs and PCBs in hair of children by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HSSPME/GC-MS). *Drug Analysis and Testing* 6, 85–92, 2014.
3. Tsatsakis AM, **Barbounis MG**, Kavalakis M, Kokkinakis M, Terzi I, Tzatzarakis MN. Determination of dialkyl phosphates in human hair for the biomonitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878, 1246-1252, 2010.
 4. Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Theodoropoulou EP, **Barbounis EG**, Tsakalof AK, Tsatsakis AM. Development and application of LC–APCI–MS method for biomonitoring of animal and human exposure to imidacloprid. *Chemosphere*. 93(10), 2612-2620, 2013.
 5. Kamvissis VN, **Barbounis EG**, Megoulas NC and Koupparis MA, A Novel Photometric Method for Evaluation of the Oxidative Stability of Virgin Olive Oils, *Food Composition and Additives, Journal Of AOAC International Vol. 91*, No. 4, 2008.

ABSTRACTS

1. Barmpas M, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kypraiou A, **Barbounis E**, Kavvalakis M, Sifakis S, Daskalakis G, Tsatsakis AM. Determination of PCBs, DDTs and HCB in hair, amniotic fluid and serum of pregnant women by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HSSPME/GC-MS). 51st Congress of the European, Societies of Toxicology (EUROTOX2015), 13-16 September 2015, Porto, Portugal.
2. Tzatzarakis MN, Karzi V, Vakonaki E, **Barbounis E**, Tsitsimpikou C, Vardavas AI, Tsakiris I, Rizos AK, Tsatsakis AM. Bisphenol A in beverages and canned foods of the Greek market. 51st Congress of the European, Societies of Toxicology (EUROTOX2015), 13-16 September 2015, Porto, Portugal.
3. Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kavvalakis MP, Stivaktakis PD, Ioannis H, **Barbounis E**, Vardavas A, Barmpas M, Tsatsakis AM. Development and validation of an LC-APCI-MS method for the determination of bisphenol A

- in hair samples of Greek population. 50th Congress of The European Societies of Toxicology (Eurotox 2014), 7-10 September, 2014, Edinburgh, United Kingdom.
4. Tzatzarakis MN, Kavvalakis MP, Vakonaki E, Theodoropoulou E, **Barbounis E**, Kokkinakis EN, Tsatsakis AM. Determination of DDTs in human hair by SPME/GC-MS. 18th Meeting of the Society of Hair Testing , Geneva, Swiss, 28 - 30 August, 2013
 5. Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Polychronis S, **Barbounis M**, Goumenou M, Alegakis A, Renieri E, Vynias D, Tsatsakis AM. Understanding the imidacloprid metabolism in long-term exposure through a comparative study of imidacloprid and its major metabolite levels in the urine and hair of intentionally exposed rabbits. 49th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2013) September 1-4, 2013, Switzerland, Interlanken (poster).
 6. Kavvalakis PM, Tzatzarakis MN, Stivaktakis DP, **Barbounis E**, Alegakis KA, Karamanos N, Tsatsakis M. Assessment of burden of the pesticide imidacloprid and its metabolite on rural and urban residents of Crete, Greece in hair using an LC-APCI-MS technique. 14th international symposium on advances in extraction technologies. September 24-26, 2012, Messina, Italy.
 7. Stivaktakis DP, Tzatzarakis MN, Kavvalakis PM, **Barbounis E**, Vakonaki E, Tsitsimpikou C, Tsatsakis MA. Development of LC-MS technique for the determination of anabolic steroids (turinabol and dianabol) in hair of exposed rabbits. 14th international symposium on advances in extraction technologies. September 24-26, 2012, Messina, Italy.
 8. Tzatzarakis M, Morozova V, Vakonaki E, Petrochenko S, Myagkova M, **Barbounis E**, Kanaki A, Belivanis S, Tsatsakis A. Antibodies to opiates in serum as markers of chronic drug use. 3rd Russian-Hellenic Symposium. Biomaterials and Bionanomaterials: Recent Problems and Safety Issues. Heraklio, Agapi Beach, May 6-13, Crete, Greece.
 9. **Barbounis GE**, Tzatzarakis M, Renieri E, Tsatsakis MA. Determination of polychlorinated biphenyls in human hair by fully automated Rapid Alkaline Digestion Solid Phase Microextraction method (RAD-SPME).

36th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda, Italy 27 May -1 June 2012.

10. Tzatzarakis M, Morozova V, Vakonaki E, Petrochenko S, Myagkova M, **Barbounis E**, Kanaki A, Belivanis S, Tsatsakis A. Detection of antibodies in serum of drug users after an abstinence period of opiates use. 48th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2012) June 17-20, 2012, Stockholm, Sweden (poster).
11. **Barbounis M**, Tzatzarakis M, Kavvalakis M, Maravgakis G, Toutoudaki M, Tsatsakis AM. Comparative study of polychlorinated biphenyls (PCBs) determination in human head hair samples using GC-DFHRMS and GC-MS 16th SoHT annual meeting, 2011, 21-26 March, Chamonix, Mont Blanc (poster).

ΠΕΡΙΛΗΨΕΙΣ ΣΕ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

(Abstracts in Scientific Journals)

1. Tzatzarakis M, Vakonaki E, Kavvalakis M, Stivaktakis P, Heretis I, **Barbounis E**, Vardavas A, Barmpas M, Tsatsakis A. Development and validation of an LC–APCI-MS method for the determination of bisphenol A in hair samples of Greek population. Toxicology Letters, Volume 229, Supplement, 10 September 2014, Page S227
2. Kavvalakis MP, Tzatzarakis MN, Stivaktakis P, **Barbounis M**, Goumenou M, Alegakis A, Renieri E, Vynias D, Tsatsakis AM. Understanding the imidacloprid metabolism in long-term exposure through a comparative study of imidacloprid and its major metabolite levels in the urine and hair of intentionally exposed rabbits. Toxicology Letters, Volume 221, Supplement, 28 August 2013, Page S203
3. Tzatzarakis M, Morozova V, Vakonaki E, Petrochenko S, Myagkova M, **Barbounis E**, Kanaki A, Belivanis S, Tsatsakis A. Detection of antibodies in serum of drug users after an abstinence period of opiates use. Toxicology Letters, Volume 211, Supplement, 17 June 2012, Page S152

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Έμμονοι οργανικοί ρύποι (PCBs-DDTs)

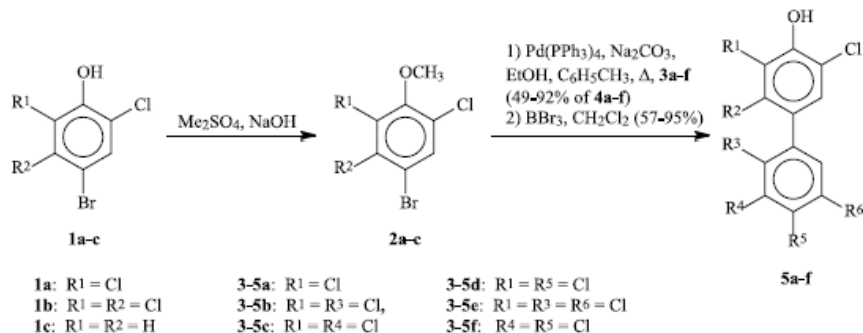
1.1 Εισαγωγή

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) είναι συνθετικά χλωριωμένες ενώσεις υδρογονανθράκων που αποτελούνται από δύο βενζολικούς δακτυλίους συνδεδεμένους με απλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα, με όλα ή μερικά από τα άτομα υδρογόνου των δακτυλίων να έχουν αντικατασταθεί από άτομα χλωρίου. Η παραγωγή και εμπορική διάθεση των PCBs ξεκίνησε το 1929 και οι εφαρμογές τους περιλαμβάνουν πλαστικοποιητές (plasticizers), επικαλύψεις επιφανειών (surface coatings), μελάνες (inks), κόλλες (adhesives), επιβραδυντικά φλόγας (flame retardants), διαλυτικά φυτοφαρμάκων (pesticide extenders), βαφές (paints) και μικροενθυλάκωση βαφών (microencapsulation of dyes) για φωτοτυπικό χαρτί. Επειδή τα PCBs εμφανίζουν αντίσταση τόσο σε οξέα όσο και σε αλκάλια και είναι σχετικά σταθερά στη επίδραση θερμότητας, έχουν χρησιμοποιηθεί σε διηλεκτρικά υγρά σε μετασχηματιστές και πυκνωτές. Επιπλέον περιβαλλοντική μόλυνση μπορεί να προκύψει από την απόθεση παλαιότερου ηλεκτρικού εξοπλισμού που περιέχει PCBs. Η πυρόλυση μιγμάτων PCBs παράγει HCl και πολυχλωριωμένα διφαινυλοφουράνια (PCDFs) και η πυρόλυση μιγμάτων που περιέχουν χλωροβενζόλια παράγει επίσης πολυχλωριωμένες διφαινυλοδιοξίνες (PCDDs). Σε αρκετές χώρες υπάρχουν αυστηροί περιορισμοί ή απαγορεύεται η παραγωγή των PCBs [1].

Όσο περισσότερα άτομα χλωρίου έχουν οι ομόλογες σειρές των PCBs τόσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφησή τους στο έδαφος και στα ιζήματα και είναι γενικά ανθεκτικές στο περιβάλλον. Οι διάφορες ομόλογες σειρές τόσο στο έδαφος όσο και στα ιζήματα έχουν ημιζωή που εκτείνεται από μήνες σε χρόνια. Γενικά η απορρόφηση των PCBs αυξάνεται με την έκταση της χλωρίωσης της ομόλογης σειράς και με το περιεχόμενο σε οργανικό άνθρακα και αργίλου του εδάφους ή του ιζήματος. Η εξάτμιση και η βιοαποικοδόμηση, δύο πολύ αργοί μηχανισμοί, είναι οι κύριες διαδικασίες της απομάκρυνσης των PCBs από το νερό και το έδαφος.

Τα PCBs βιοσυσσωρεύονται κατά μήκος της διατροφικής αλυσίδας. Η απορρόφησή τους από το γαστρεντερικό σωλήνα και η μεταφορά και

συσσώρευση τους στο ήπαρ και στο λιπώδη ιστό είναι ταχύτερη. Επίσης μετακινούνται στον πλακούντα, απεκκρίνονται στο γάλα και συσσωρεύονται στο έμβρυο/βρέφος. Τα PCBs μεταβολίζονται με υδροξυλίωση και επακόλουθη σύζευξη. Η υδροξυλίωση πραγματοποιείται συνήθως σε μέτα- και πάρα- θέση, ενώ ποικιλία μόνο- και πόλυ- υδροξυλιωμένων ενώσεων έχουν ανιχνευτεί σε βιολογικά δείγματα. Ο ρυθμός του μεταβολισμού και της επακόλουθης απέκκρισής τους διαφέρει σημαντικά ανάλογα με την ομόλογη σειρά [1,2].



Σχήμα 1.1: Παράδειγμα σύνθεσης 4-υδρόξυ PCBs [2].

Οι άνθρωποι εκτίθενται σε PCBs με την εισπνοή μολυσμένου αέρα και την κατάποση μολυσμένου νερού και τροφίμων. Το 1978, η εκτιμώμενη πρόσληψη των PCBs από ενήλικες στις ΗΠΑ ήταν 0,027 μg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, αλλά μειώθηκε σε 0,0005 μg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα το διάστημα από 1982-1984 και <0,001 μg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα για το διάστημα από 1986-1991.

Σε μελέτες σε ανθρώπους που εκτίθενται σε PCBs, έχουν παρατηρηθεί επιδράσεις στην κινητικότητα του σπέρματος, στην εμβρυϊκή ανάπτυξη (χαμηλότερο βάρος γέννησης, μικρότερη περιφέρεια κεφαλιού), στην ανάπτυξη (μικρότερη ηλικία κύησης, νευρομυϊκή ανωριμότητα) και στις νευρολογικές λειτουργίες των απογόνων (αδυναμία αυτόνομης λειτουργίας, αύξηση του αριθμού των ασυνήθιστα ασθενών αντανακλαστικών, μειωμένη ικανότητα μνήμης, χαμηλότερο IQ, έλλειψη προσοχής). Μερικές από τις νευρολογικές ελλείψεις στις μικρότερες ηλικίες μπορεί να εξαφανιστούν αργότερα κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας [1,3].

Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν το συσχετισμό της έκθεσης σε PCBs με την αύξηση σε καρκίνους του πεπτικού συστήματος, ειδικά με τον

καρκίνο του ήπατος και με το κακοήθες μελάνωμα. Ωστόσο, οι περιορισμοί των αποτελεσμάτων αποκλείουν ένα σαφή προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ της έκθεσης και του αποτελέσματος. Δεν έχει παρατηρηθεί αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης λοιμώξεων της αναπνευστικής οδού κατά τη διάρκεια των πρώτων 18 μηνών της ζωής αλλά έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στις σχετικές ποσότητες διαφορετικών τύπων λεμφοκυττάρων μεταξύ των παιδιών που γεννήθηκαν από μητέρες εκτεθειμένες σε PCBs.

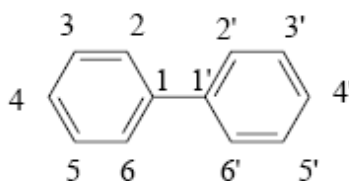
Έχει επίσης παρατηρηθεί μείωση του αριθμού των φυσικών φονικών κυττάρων σε ανθρώπους που καταναλώνουν θαλασσινά είδη μολυσμένα με PCBs καθώς και λοιμώξεις του μέσου ωτός και ανεμοβλογιά σε παιδιά της ηλικίας των 3,5 ετών. Δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία (ανοσολογικό, αναπτυξιακό, αναπαραγωγικό, ηπατικό και σωματικό βάρος) παρατηρήθηκαν και σε διάφορα είδη θηλαστικών. Αρκετές μελέτες εμφανίζουν σταθερή αύξηση στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του ήπατος μεταξύ τρωκτικών που εκτίθενται σε διαφορετικά PCBs. Η επίδραση των επιπτώσεων στην υγεία εξαρτάται από τη δόση, το είδος, το μίγμα των PCB, τη διάρκεια και το χρονοδιάγραμμα της έκθεσης και από άλλους παράγοντες. Περιορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι τα PCBs δεν είναι γενετοξικά με άμεσους μηχανισμούς [1,3,4].

Από την άλλη πλευρά το DDT (1,1,1-τριχλωρο-2,2-δισ(4-χλωροφαινυλ)αιθάνιο) είναι ένα φυτοφάρμακο που κάποτε χρησιμοποιούταν ευρέως για τον έλεγχο των εντόμων σε γεωργικές καλλιέργειες καθώς και των εντόμων που μεταφέρουν ασθένειες, όπως η ελονοσία και ο τύφος, αλλά σήμερα έχει απαγορευθεί η χρήση του στην πλειονότητα των χωρών. Το DDT είναι ένα μίγμα από τρεις μορφές, *p,p*-DDT (85%), *o,p*-DDT (15%), και *o,o*-DDT (σε ιχνοποσότητες). Όλα αυτά είναι λευκά, κρυσταλλικά, άγευστα, άοσμα και σχεδόν στερεά. Το DDT μπορεί επίσης να περιέχει DDE (1,1-διχλωρο-2,2-δισ(*p*-χλωροφαινυλ)αιθυλένιο) και DDD (1,1-διχλωρο-2,2-δισ(*p*-χλωροφαινυλ)αιθάνιο) ως προσμείξεις. Το DDD χρησιμοποιήθηκε επίσης για να σκοτώσει τα παράσιτα, αλλά χωρίς ευρεία χρήση.

1.2 Ταυτότητα και φυσικοχημικές ιδιότητες

Τα PCBs είναι μια κατηγορία χημικών ενώσεων στην οποία άτομα χλωρίου έχουν αντικαταστήσει μερικά ή όλα τα άτομα υδρογόνου σε ένα μόριο του

διφαινυλίου. Η γενική χημική δομή των χλωριωμένων διφαινυλίων απεικονίζεται παρακάτω στο σχήμα 1.2



Σχήμα 1.2: Σύστημα αρίθμησης μορίου διφαινυλίου. Στα PCBs, μερικά ή όλα από τα 10 άτομα υδρογόνου (που συνδέονται με άτομα άνθρακα είναι αριθμημένα από 2-6 και από 2'-6') έχουν αντικατασταθεί με άτομα χλωρίου.

Τα PCBs παράγονται και πωλούνται ως μείγματα με διάφορες εμπορικές ονομασίες, όπως Aroclor, Pyranol, Pyroclor (ΗΠΑ), Phenoclor, Pyralene (Γαλλία), Clophen, Elaol (Γερμανία), Kanechlor, Santotherm (Ιαπωνία), Fenchlor, Apirolio (Ιταλία), και Sovol (Ρωσία).

Σήμερα χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικά αλλά συσχετιζόμενα συστήματα ονοματολογίας των PCBs. Η ονοματολογία κατά IUPAC (σύμφωνα με τους κανόνες της IUPAC A-52.3 και A-52.4) προσδιορίζει τα αριθμημένα άτομα άνθρακα στα οποία είναι ενωμένα τα άτομα χλωρίου και ταξινομεί διαδοχικά τους αριθμούς (π.χ. η ομόλογη σειρά PCB με άτομα χλωρίου στα άτομα άνθρακα 2, 3, 4, και 3' ορίζεται ως 233'4). Μια παραλλαγή του παραπάνω συστήματος ταξινομεί τις χλωριωμένες θέσεις των δακτυλίων ξεχωριστά (π.χ. 234-3' ή 234-3). Ένα δεύτερο χρησιμοποιούμενο σύστημα ονοματολογίας αναπτύχθηκε από τους Ballschmiter & Zell (1980) ως ένας τρόπος για την απλοποίηση της αναφοράς σε συγκεκριμένες ομόλογες σειρές PCBs [5]. Σε αυτό συσχετίζεται η δομική διάταξη των ομόλογων σειρών PCBs, σε αύξουσα σειρά ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων χλωρίου. Ένας μη κύριος αριθμός θεωρείται χαμηλότερος (μεγαλύτερης προτεραιότητας) από τον ίδιο αριθμό όταν είναι κύριος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ομόλογες σειρές να αριθμούνται από PCB 1 έως PCB 209. Αρχικά τυπογραφικά σφάλματα στο σύστημα αρίθμησης των Ballschmiter & Zell (1980) επιλύθηκαν στη συνέχεια (δηλαδή, PCB με αριθμούς 107, 108, 109, 199, 200, και 201 έχουν τώρα αριθμηθεί 109, 107, 108, 200, 201, και 199, αντίστοιχα) [5]. Στον Πίνακα 1.1 απεικονίζεται η σχέση μεταξύ του συστήματος της IUPAC και του αναθεωρημένου συστήματος αρίθμησης των PCBs.

Πίνακας 1.1: Συσχετισμός συστημάτων ονοματολογίας PCBs.

Θέση χλωρίου σε κάθε δακτύλιο	Χωρίς χλώριο	2	3	4	23	24	25	26	34	35	234	235	236	245	246	345	2345	2346	2356	23456
23456																				209
2356																			202	208
2346																		197	201	207
2345																	194	196	199	206
345																169	189	191	193	205
246															155	168	182	184	188	204
245														153	154	167	180	183	187	203
236													136	149	150	164	174	176	179	200
235												133	135	146	148	162	172	175	178	198
234											128	130	132	138	140	157	170	171	177	195
35										80	107	111	113	120	121	127	159	161	166	192
34									77	79	105	109	118	118	119	126	156	158	163	190

Όπως απεικονίζεται στον Πίνακα 1.1 είναι πιθανές 209 χλωριωμένες ενώσεις. Επίσης τα PCBs κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το βαθμό και τη θέση χλωρίωσης. Ο όρος ομόλογη σειρά χρησιμοποιείται για όλες τις ενώσεις με τον ίδιο αριθμό ατόμων χλωρίου (ομόλογη σειρά PCBs με τρία άτομα χλωρίου ονομάζονται τριχλωροδифαινύλια). Ομόλογη σειρά PCBs με διαφορετικές θέσεις ατόμων χλωρίου ονομάζονται ισομερή.

Οι δακτύλιοι βενζολίου μπορεί να περιστρέφονται γύρω από τον δεσμό που τους συνδέει αλλά εξαιτίας της ηλεκτροστατικής άπωσης των υψηλά ηλεκτραρνητικών ατόμων χλωρίου είτε βρίσκονται στο ίδιο επίπεδο (ή συνεπίπεδο) ή κάθετα μεταξύ τους. Ο βαθμός στον οποίο οι δακτύλιοι μπορούν να περιστρέφονται πέρα από αυτές τις δύο ακραίες περιπτώσεις είναι συνάρτηση της στερεοχημικής παρεμπόδισης που δημιουργούν τα άτομα χλωρίου στις διαφορετικές θέσεις στους δακτύλιους. Ο κάθετος προσανατολισμός προκύπτει από πολλαπλές υποκαταστάσεις σε -ορθο θέσεις (2, 2', 6 και 6') και μια αύξηση από 2 σε 4 υποκαταστάσεις έχει ως αποτέλεσμα μια προοδευτικά ισχυρότερη παρεμπόδιση περιστροφής. Αντίστροφα, ορισμένες μονο -ορθο και όλες οι μη -ορθο υποκαταστάσεις στα PCBs θεωρούνται επίπεδου προσανατολισμού, σε διαφορετική περίπτωση ονομάζονται επίπεδου ή μονο -ορθο συνεπίπεδου προσανατολισμού, θεωρώντας ότι οι δακτύλιοι των ομόλογων σειρών μπορούν να περιστραφούν αλλά όχι εντελώς. Επίσης οι -ορθο υποκατεστημένες ομόλογες σειρές, στον ένα ή και στους δύο δακτύλιους, μπορεί να είναι πολικά μόρια με την ικανότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και επομένως να είναι περισσότερο υδατοδιαλυτά. Τα -μετα και -παρα υποκατεστημένα PCBs είναι περισσότερο άπολα και επομένως είναι περισσότερο λιποδιαλυτά. Οι ομόλογες σειρές οι οποίες θεωρούνται περισσότερο τοξικές, από τα αποτελέσματα της επίδρασής τους στην υγεία, είναι οι συνεπίπεδες.

Μια σημαντική ιδιότητα των PCBs είναι η γενικότερή τους αδράνεια. Τα PCBs είναι αδρανή τόσο στην επίδραση οξέων όσο και αλκάλιων και η θερμική τους σταθερότητα τα καθιστά χρήσιμα σε ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών όπως διηλεκτρικά ρευστά σε μετασχηματιστές και πυκνωτές, ρευστά μεταφοράς θερμότητας και λιπαντικά [6].

Σε υψηλές θερμοκρασίες τα PCBs είναι εύφλεκτα και τα προϊόντα της καύσης μπορεί να είναι περισσότερο επικίνδυνα από τις αρχικές ενώσεις. Τα υποπροϊόντα της καύσης περιλαμβάνουν χημικές ενώσεις όπως HCl και πολυχλωριωμένα διβενζοφουράνια (PCDFs). Η καύση συνθετικών υλικών τα οποία περιέχουν PCBs και χλωροβενζόλια (όπως τα διηλεκτρικά ρευστά) μπορεί να παράγει PCDDs [7, 8]. Επίσης κατά την παραγωγή των PCBs παράγονται PCDFs. Το ποσοστό των PCDFs που σχηματίζεται εξαρτάται από τις συνθήκες παραγωγής. Για παράδειγμα, στο Aroclor 1248 βρέθηκαν οι προσμίξεις 2,3,7,8-τετραδихλωροδιβενζοφουράνιο και 2,3,4,7,8-πενταχλωροδιβενζοφουράνιο σε συγκεντρώσεις 0,33 και 0,83 mg/kg αντίστοιχα και στο Aroclor 1254 σε συγκεντρώσεις 0,11 και 0,12 mg/kg, αντίστοιχα. Επίσης, έχουν αναφερθεί διάφορες συγκεντρώσεις των PCDFs στα εμπορικά μίγματα των PCBs όπως τα Clophen A-60, Phenoclor DP-6 και Kanechlor 400. Γενικά, υπάρχει μια ολοκληρωμένη βάση δεδομένων των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων των PCBs (Syracouse 2000), ενώ στον Πίνακα 1.2 απεικονίζονται οι τιμές ιδιοτήτων των περισσότερο τοξικών και διαδεδομένων στο περιβάλλον PCBs.

Πίνακας 1.2. Φυσικές και χημικές ιδιότητες των περισσότερο τοξικών PCBs.

	PCB1	PCB77	PCB81	PCB105	PCb118	PCB126	PCB138	PCB153	PCB156	PCB163	PCB169	PCB180
Υποκ. Χλωρίου (IUPAC No)	2	34-3'4'	345-4'	234-3'4'	245-3'4'	345-3'4'	234-2'4'5'	245-2'4'5'	2345-3'4'	2366-3'4'	345-3'4'5'	2345-2'4'5'
Σχετική Μοριακή Μάζα	188,7	292,0	292,0	326,4	326,4	326,4	360,9	360,9	390,6	390,6	360,9	395,3
Σημείο ζέσεως (°C)	274	360					400					240-280
Διαλυτότητα στο νερό (mg/L, 25 °C)	4,83	0,175		0,034	0,0134		0,0159	0,00091 0,00086	0,005 33	0,001 195	0,000 036- 0,012 30	0,000 31- 0,006 56

LOG kw	4,53	6,04-6,83	6,96	7,12	8,50-7,44	8,35	7,80	7,20	7,408	8,70-7,21
---------------	------	-----------	------	------	-----------	------	------	------	-------	-----------

Τάση ατμών (mmHg, 25 °C)	$1,38 \times 10^{-9}$	$4,4 \times 10^{-7}$	$6,53 \times 10^{-8}$	$8,97 \times 10^{-8}$	$4,0 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$	$5,8 \times 10^{-7}$	$4,0 \times 10^{-7}$	$0,8 \times 10^{-7}$
---	-----------------------	----------------------	-----------------------	-----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Επιπλέον, στους Πίνακες 1.3 και 1.4 συνοψίζονται οι συνθέσεις των περισσότερο συνηθισμένων μιγμάτων Aroclor ενώ στον Πίνακα 1.5 κατηγοριοποιούνται οι ομόλογες σειρές των Aroclor.

Πίνακας 1.3. Συγκέντρωση (mol%) των εμπορικά συνηθισμένων PCBs προϊόντων.

PCB No	Υποκατάσταση Cl (IUPAC)	Aroclor 1016	Aroclor 1042	Aroclor 1248	Aroclor 1254	Aroclor 1260
4	2,2'	4.38	3.99			
8	2,4'	10.30	8.97			
18	2,5,2'	10.87	9.38	9.95		
28	2,4,4'	14.48	13.30			
31	2,5,4'	4.72	4.53	9.31		
42	2,3,2',4'			7.05		
52	2,5,2',5'	4.35	4.08	8.38		
53	2,5,2',6'			8.30		
70	2,5,3',4'			8.38	4.75	
91	2,3,6,2',4'				5.00	
99	2,5,2',3',4'				6.10	
101	2,4,5,2',5'				6.98	5.04
110	2,3,6,3',4'				8.51	
118	2,4,5,3',4'				8.09	
138	2,3,4,2',4',5'					5.01
149	2,3,6,2',4',5'					9.52
153	2,4,5,2',4',5'					8.22
180	2,3,4,5,2',4',5'					7.20
185	2,3,4,5,6,2',5'					5.85

Πίνακας 1.4. Συγκέντρωση (mol%) των περισσότερων τοξικών Aroclors.

	PCB	PCB	PCB	PCB	PCB	PCB	PCB	PCB
	115	118	138	153	156	163	180	183
Aroclor 1018	0							
Aroclor 1221	0,04	0,07		0				
Aroclor 1232	0,21	0,27	0,06	0,01	0,01	0		
Aroclor 1242	0,47	0,66	0,10	0,06	0,01	0		
Aroclor 1248^b	1,60 /1,4 5	2,29/2,3 5	0,38/0, 41	0,23/0, 43	0,06/0, 04	0,06/0, 08	0,02/0, 21	-/0,08
Aroclor 1254	7,37 /2,9 9	13,59/7, 35	5,95/5, 80	3,29/3, 77	1,13/0, 82	0,70/1, 03	0,42/0, 67	0,09/0, 18
Aroclor 1280	0,22	0,48	8,54	9,39	0,52	2,42	11,4	2,41
Aroclor 1282	0,09	0,15	2,74	7,10	0,16	1,52	14,1	2,88

Πίνακας 1.5. Σύσταση (%) διαφόρων Aroclors.

Αρ. υποκαταστατών	Aroclor 1232	Aroclor 1016	Aroclor 1242	Aroclor 1248	Aroclor 1254	Aroclor 1260
1	31,3	<1	<1	<0,2		
2	23,7	21,2	14,7	<1	<0,1	
3	23,4	51,5	46	20,9	1,8	<0,3
4	15,7	27,3	30,6	50,3	17,1	<0,3
5	5,8	<0,6	8,7	18,1	49,3	9,2
6			<0,3	0,8	27,8	46,9
7				<0,3	3,9	36,9
8					<0,05	6,3
9					<0,05	0,7

Γενικά, τα PCBs είναι σχετικά αδιάλυτα στο νερό, με τις μεγαλύτερες διαλυτότητες να εμφανίζουν οι ορθοχλωριωμένες ομόλογες σειρές (5 mg/L για PCB 1), η οποία μπορεί να οφείλεται στους δεσμούς υδρογόνου που σχετίζονται με το περισσότερο πολικό χαρακτήρα αυτών των μορίων. Η διαλυτότητα ελαττώνεται στις κενές -ορθο θέσεις και ιδιαίτερα όσο δεσμευμένες είναι οι -παρα θέσεις, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη και περισσότερο ομοιόμορφη περιοχή ηλεκτραρνητικότητας και αλληλεπίδρασης με δεσμούς υδρογόνου. Τα PCBs είναι διαλυτά σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες και βιολογικά λίπη [9]. Η διαλυτότητα στο νερό και στα λίπη απεικονίζεται στον Πίνακα 1.2 ως αύξηση της K_{ow} με την αύξηση του αριθμού των ατόμων χλωρίου. Τα περισσότερα χλωριωμένα PCBs είναι σχετικά μη πτητικά, με μερικές πιέσεις και σταθερές νόμου Henry να έχουν την τάση να μειώνονται με την αύξηση του αριθμού των ατόμων χλωρίου, ειδικά στις -μετα και -παρα υποκατεστημένες ομόλογες σειρές.

Από την άλλη πλευρά ο χημικός τύπος του DDT είναι $C_{14}H_9Cl_5$. Στην καθαρή του μορφή, το DDT είναι μια λευκή, κρυσταλλική σκόνη με λίγη οσμή. Ένας από τους λόγους για τους οποίους η ανησυχία για το DDT και τους μεταβολίτες του είναι είναι μεγάλη αποτελεί το γεγονός ότι δεν διασπάται στο περιβάλλον ή σε οργανισμούς. Η μακρά διάρκεια ζωής του DDT οφείλεται στη χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και στη σχετικά υψηλή διαλυτότητα σε λίπη. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι το DDT έχει την ιδιότητα να εισέλθει στο λιπώδη ιστό των οργανισμών. Επομένως, επειδή το DDT παραμένει στο σώμα, μπορεί να συσσωρευτεί, αν ο οργανισμός συνεχίζει να εκτίθεται σε DDT μέσω του περιβάλλοντος ή της τροφικής αλυσίδας.

1.3 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού των PCBs-DDTs σε βιολογικά δείγματα

Η ποσοτικοποίηση των έμμονων οργανικών ρύπων σε βιολογικά δείγματα συνήθως αποτελείται από τρία διακριτά στάδια: (α) εκχύλιση από τη μήτρα του δείγματος από ένα ή συνδυασμό διαλυτών, (β) καθαρισμός (απομάκρυνση προσμίξεων) σε μια ή πολλαπλές στήλες και (γ) ποσοτικοποίηση με αέρια χρωματογραφία (GC) και κατάλληλο ανιχνευτή. Συνήθως οι συγκεντρώσεις των PCBs αναφέρονται ως αυτές των μεμονωμένων PCBs ή ως άθροισμα συγκεντρώσεων των ομόλογων σειρών [10].

Τα PCBs-DDTs εκχυλίζονται από το αίμα ή τον ορό χρησιμοποιώντας εξάνιο, βενζόλιο ή συνδυασμούς διαλυτών όπως εξάνιο/αιθυλαιθέρας. Για τον καθαρισμό και/ή την κλασματοποίησή τους χρησιμοποιούνται διάφορα προσροφητικά όπως απενεργοποιημένη silica gel [11], florasil, alumina [12] ή πολλαπλές στήλες. Επίσης έχει χρησιμοποιηθεί η υπερκρίσιμη ρευστή εκχύλιση (Djordjevic et al 1994) για την εκχύλιση PCBs από λιπώδη ιστό [13]. Για τον προσδιορισμό των PCBs-DDTs συνήθως χρησιμοποιείται αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (GC/ECD) [8,14], αλλά είναι απαραίτητη η επιβεβαίωση με φασματοσκοπία μάζας (MS) όταν απαιτούνται πολλαπλές μεμονωμένες μετρήσεις ομόλογων σειρών [15].

Για παράδειγμα, τα όρια ανίχνευσης για συγκεκριμένα Aroclors βρίσκονται στην υπό $\mu\text{g/L}$ κλίμακα και οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 80 έως 96% [8,12]. Με τη χρήση των νέων τεχνικών αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτές μαζών

έχουν επιτευχθεί χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και καλύτερος διαχωρισμός των PCBs [10]. Οι συνηθισμένες αναλυτικές μέθοδοι ποσοτικοποιούν τα PCBs ως μίγματα Aroclor με την παραδοχή ότι το αρχικό συστατικό διατηρείται στο περιβάλλον. Η ισχύς της παραδοχής υστερεί στο ότι τα μεμονωμένα PCBs υποβάλλονται σε διαφορετικές φυσικές, χημικές και βιολογικές αλληλεπιδράσεις με το περιβάλλον με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται το μίγμα των PCBs σχετικά με το αρχικό συστατικό. Η ανάλυση των Aroclors έχει το μειονέκτημα ότι δεν είναι ευαίσθητη στις 4-6 χλωριωμένες συνεπίπεδες ομόλογες σειρές οι οποίες είναι ιδιαίτερης σημασίας εξαιτίας των αποτελεσμάτων στην υγεία. Μια προσεγγιστική ανάλυση είναι η ανάλυση των ισομερών (C1-C10) εννέα από τα οποία παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.5.

Οι μεταβλητές των μεθόδων δειγματοληψίας επηρεάζουν τα αποτελέσματα σε μεγάλο βαθμό. Τυχαία σφάλματα, διεργαστηριακές διακυμάνσεις στη διαδικασία και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την αναφορά των αποτελεσμάτων έχουν σημαντικό αντίκτυπο στα αναφερόμενα επίπεδα των PCBs-DDTs στους ανθρώπινους ιστούς. Δεδομένου ότι δεν υπάρχει τυποποιημένη μέθοδος ή προσέγγιση για την ανάλυση τους σε βιολογικά δείγματα, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στη σύγκριση των εκτιμήσεων διαφορετικών μελετών. Σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμες μέθοδοι για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων των τους σε βιολογικά δείγματα καθώς και σε θαλασσινά και άλλα δείγματα [10,13-17].

1.4 Πηγές ανθρώπινης και περιβαλλοντικής έκθεσης

Η παραγωγή των PCBs άρχισε στα τέλη του 1920. Από το 1929, περίπου 2×10^9 kg PCBs έχουν παραχθεί εμπορικά, εκ των οποίων περίπου 2×10^8 kg παραμένουν σε κινητές δεξαμενές. Ρύπανση από PCBs μπορεί να εμφανιστεί κατά την καύση αστικών αποβλήτων. Συγκεντρώσεις από 0,01-1,5 mg/kg ανιχνεύθηκαν σε τέφρα από πέντε εγκαταστάσεις αποτέφρωσης αστικών αποβλήτων που λειτουργούν με διαφορετικές τεχνολογικές και συνθήκες εργασίας. Τα απόβλητα από διαφορετικούς αποτεφρωτήρες στις μεσοδυτικές ΗΠΑ περιείχαν PCBs σε συγκεντρώσεις από 0,3-3,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Η συνολική συγκέντρωση των PCBs μετρούμενη στα αέρια απόβλητα από ένα αποτεφρωτήρα αστικών αποβλήτων στο Οχάιο των ΗΠΑ, ήταν 0,26 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. PCBs σε επίπεδα από 2-10 ng/m^3 ανιχνεύθηκαν σε απόβλητα από την καύση απορριμμάτων στην Ames, Iowa, Η.Π.Α.[18]. Μια πρόσθετη πηγή ρύπανσης

από PCBs είναι η εξάτμιση από τους χώρους υγειονομικής ταφής που περιέχουν μετασχηματιστές, πυκνωτές, και άλλα PCBs απόβλητα και τα ρυπασμένα υδατικά συστήματα. Εξαιτίας των πιθανών επιπτώσεων στην υγεία και στο περιβάλλον, η χρήση και η παραγωγή PCBs υπόκειται σε αυστηρούς περιορισμούς ή απαγορεύεται σε πολλές χώρες. Ενδεικτικά, στη Σουηδία περιορίστηκε η χρήση και η παραγωγή τους από το 1972, στις ΗΠΑ από το 1977, στη Νορβηγία από το 1980, στη Φινλανδία από το 1985 και τέλος στη Δανία το 1986.

Σε ότι αφορά το DDT, πριν από το 1973, όταν απαγορεύτηκε, η χρήση του ως εντομοκτόνο είχε ως αποτέλεσμα την συσσώρευση του στον αέρα, το νερό και το έδαφος. Σήμερα η εμφάνιση του στο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα της χρήσης του κατά το παρελθόν.

1.5 Περιβαλλοντική μεταφορά, κατανομή και μετασχηματισμός

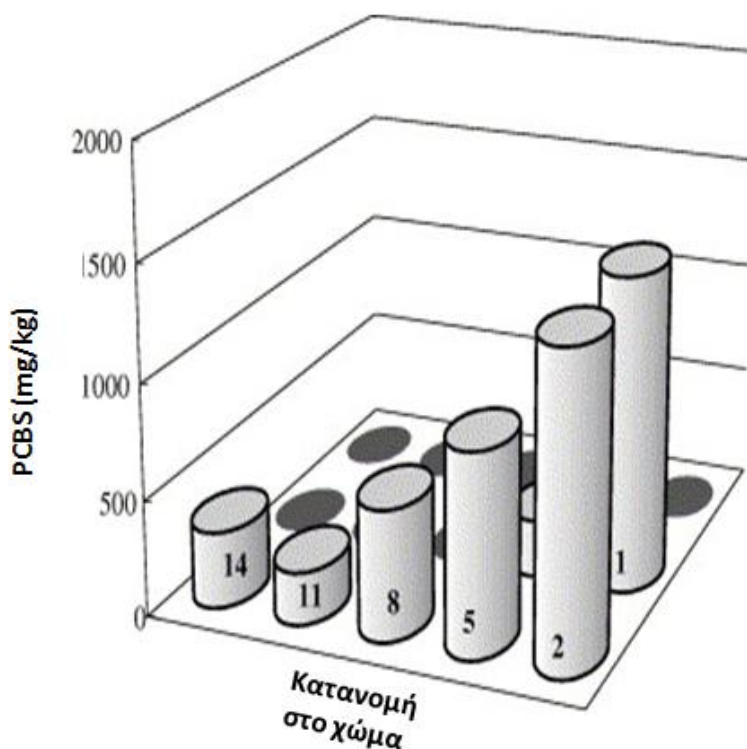
1.5.1 Μεταφορά και κλασματοποίηση

Οι εκτιμώμενες τιμές για τις σταθερές του νόμου Henry για τα Aroclors, που κυμαίνονται από 29-47 Pa·m³/mol, υποδεικνύουν ότι η εξάτμιση μπορεί να είναι μια σημαντική περιβαλλοντική διαδικασία μεταφοράς των PCBs από τα επιφανειακά ύδατα [19]. Αυτό συμβαίνει όταν λόγω αυξημένης θερμοκρασίας, παρατηρείται σημαντική απώλεια νερού από εξάτμιση. Οι διαφορές στην πτητικότητα και στη διαλυτότητα μεταξύ των διαφόρων ομόλογων σειρών αναμένεται να προκαλέσει ανακατανομή τόσο στα επιφανειακά ύδατα όσο και στο ίζημα του πυθμένα. Μια μελέτη [20] υποδεικνύει ότι η εξάτμιση μπορεί να είναι διαδικασία ιδιαίτερης σημασίας για την απομάκρυνση των PCBs από τις λίμνες. Τα PCBs μπορεί να εξατμιστούν περισσότερο από υπερχειλίσσεις φραγμάτων και άλλες υδάτινες οδούς με σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αεριοποίησης [21,22]. Παρόλα αυτά, η απορρόφηση σε ιζήματα μειώνει σημαντικά το ρυθμό εξατμίσεως από την υδατική φάση [23-26]. Κάτι παρόμοιο συμβαίνει και με το DDT, όπου η δράση των μικροοργανισμών το μετατρέπει κυρίως σε DDE, DDD, τα οποία έχουν την ικανότητα να συσσωρεύονται στην επιφάνεια του εδάφους ή μέσω της εξάτμισης να μεταφέρονται στον αέρα.

Στο νερό, η απορρόφηση από τα ιζήματα και τα αιωρούμενα σωματίδια είναι επίσης μια σημαντική διαδικασία η οποία κλασματοποιεί τα PCBs-DDTs

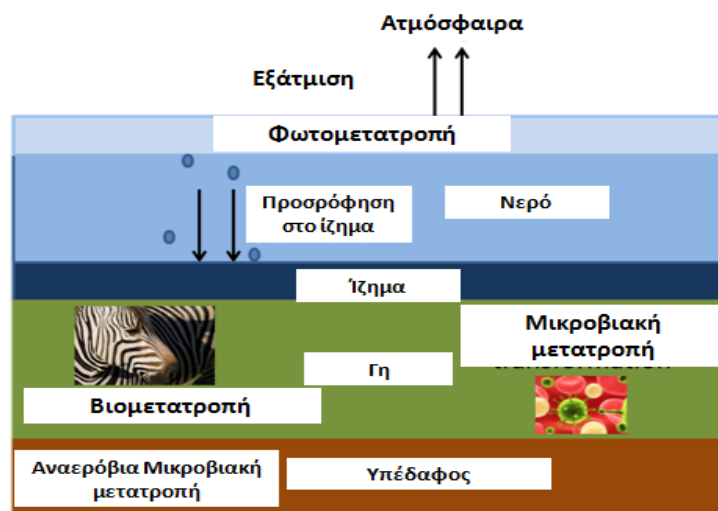
από το νερό στη στερεά φάση. Η απορρόφηση συνήθως αυξάνεται όσο αυξάνεται η οργανική ύλη, ο πηλός και τα περιεχόμενα μικρο-σωματίδια [9,22].

Η απορρόφηση και η επακόλουθη καθίζηση συντελούν στην ακινητοποίηση τους για μεγάλο χρονικό διάστημα στα υδατικά συστήματα. Έτσι σημαντικές ποσότητες PCBs-DDTs που περιέχονται στα ιζήματα και στα χώματα δρουν ως δεξαμενές βραδείας αποδέσμευσης τους. Ενδεικτικά, στο σχήμα 1.3 παρουσιάζεται η βραδεία αποδέσμευση PCBs, όπως μελετήθηκε από του Lin και τους συνεργάτες του (2006) [22]. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν δείγματα χώματος εμβολιασμένων με PCBs σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο και υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Μετά το πέρας δέκα μηνών αποδείχτηκε ότι όλα τα δείγματα συνέχιζαν να εμφανίζουν συγκεντρώσεις PCBs με τον τομέα 1 να είχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση λόγω ότι βρισκόταν κοντά στην περιοχή εμβολιασμού. Οι υπόλοιπες περιοχές εμφάνιζαν μια σταδιακή αύξηση κατά τη διάρκεια των δέκα μηνών λόγω της μεταφοράς των ρύπων. Ο ρυθμός της επαναδιάλυσης από τα ιζήματα στο νερό και της εξάτμισης από το νερό στον αέρα είναι πάντα μεγαλύτερος τους καλοκαιρινούς μήνες επειδή αυξάνεται με τη θερμοκρασία [26,27].



Σχήμα 1.3: Σχηματική παράσταση της βραδείας αποδέσμευσης των PCBs από το χώμα [22].

Τα PCBs στην ατμόσφαιρα απομακρύνονται φυσικά με την υγρή και ξηρή εναπόθεση [27-30]. Η ξηρή εναπόθεση των PCBs γίνεται με τη βαρυτική καθίζηση σωματιδίων και από την πρόσκρουση PCBs αέριας φάσης στο έδαφος ή σε υδάτινες επιφάνειες. Η υγρή εναπόθεση των PCBs συντελείται με τη βροχή, το χιόνι και την ομίχλη (Hart et al 1993). Η ροή της ατμοσφαιρικής υγρής και ξηρής εναπόθεσης των PCBs παρουσιάζεται στο σχήμα 1.4.



Σχήμα 1.4: Σχηματική παράσταση της τύχης των PCBs στο περιβάλλον [32].

Σε ότι αφορά τους υδρόβιους οργανισμούς οι τιμές του συντελεστή βιοσυσσώρευσης (BCF ή ο λόγος της συγκέντρωσης των ρύπων στον οργανισμό προς τη συγκέντρωσή τους στο νερό) αναμένεται να αυξάνεται με την αύξηση των υποκατεστημένων ατόμων χλωρίου και τη μείωση της υδατοδιαλυτότητας [17,33]. Ωστόσο, η μέγιστη βιοσυσσώρευση παρατηρήθηκε για τα εξαχλωροδифαινύλια και όχι για τα επτα- ή οκτωχλωροδифαινύλια [34,35]. Οι χαμηλότερες τιμές BCF για τις δύο τελευταίες κατηγορίες υψηλά χλωριωμένων ενώσεων μπορεί να οφείλεται στους χαμηλότερους ρυθμούς πρόσληψης.

Η εξάλειψη των PCBs από υδρόβιους οργανισμούς εξαρτάται από τα είδη και την ομόλογη σειρά PCBs [17]. Σε γενικές γραμμές, οι ομόλογες σειρές που περιέχουν δύο γειτονικά άτομα υδρογόνου σε μετα- και παρα- θέσεις σε ένα τουλάχιστον αρωματικό δακτύλιο μεταβολίζονται εύκολα [36]. Η βιομετατροπή των PCBs στα σπονδυλωτά συντελείται από το κυτόχρωμα P450 μικτής λειτουργίας οξυγενάσης (MFO) [37]. Υπάρχουν επίσης ενδείξεις ότι διαφορετικά ένζυμα του κυτοχρώματος P450 μεταβολίζουν συγκεκριμένες ομόλογες σειρές PCBs. Πρόσφατη έρευνα αποδεικνύει ότι συγκεκριμένα PCBs

παρουσιάζουν και αντιοιστρογονική δράση καθώς ρυθμίζουν τη δράση ενζύμων και γονιδίων όπως των CYP17, CYP19, ESR1 και ESR2 [38].

Γενικά τα PCBs βιοσυσσωρεύονται στις υδρόβιες τροφικές αλυσίδες όπως υποδεικνύεται από τις συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν στα υψηλότερα τροφικά επίπεδα των υδρόβιων οργανισμών καθώς και σε οστρακοειδή και θαλάσσια θηλαστικά [39-42].

Οι παράγοντες βιομεταφοράς για τις οργανικές χημικές ουσίες στο βοδινό κρέας και στο γάλα είναι ανάλογοι των τιμών K_{ow} . Ο παράγοντας βιομεταφοράς του Aroclor 1254 (συγκέντρωση τροφίμου [mg/kg]/ημερήσια πρόσληψη Aroclor [mg/ημέρα]) για το βοδινό κρέας και το γάλα εκτιμάται σε 0,052 και 0,011 kg/ημέρα αντίστοιχα [39,43]. Η εκτιμώμενη μέση τιμή BCF (ο λόγος της συγκέντρωσης των PCBs σε ιστούς προς τη συγκέντρωση των PCBs στη διατροφή) για τα PCB στο ανθρώπινο λίπος είναι 128 με βάση το βάρος του υγρού και 192 με βάση το βάρος του λιπιδίου [44]. Η βιοσυσσώρευση των PCBs στην επίγεια τροφική αλυσίδα συμβαίνει μέσω της συσσώρευσης τους από το εδάφος/φυτό στους γαιοσκώληκες και στα πτηνά [45] και από τα φύλλα βελανιδιάς σε κάμπιες και στα πτηνά [46].

1.5.2 Μετασχηματισμός και αποικοδόμηση

Η ικανότητα των PCBs να αποικοδομούνται ή να μετασχηματίζεται στο περιβάλλον εξαρτάται από το βαθμό της χλωρίωσης του διφαινυλίου και του μοτίβου χλωρίωσης [46-49]. Σε γενικές γραμμές, η διατήρηση των ομόλογων σειρών PCBs αυξάνει όσο αυξάνεται ο βαθμός χλωρίωσης και η στερεοχημική ομοιομορφία. Οι γειτονικοί μη χλωριωμένοι άνθρακες επιτρέπουν τον σχηματισμό ενδιάμεσων οξειδίων αρενίων και έτσι διευκολύνεται ο μεταβολισμός τους. Έχει εξεταστεί η βιοαποικοδόμηση της ομόλογης σειράς PCB 11 (3,3'-διχλωριοδιφαινύλιο) στο έδαφος [50]. Το PCB 11, επισημάνθηκε με ^{14}C και επιλέχθηκε ως μια χαμηλής χλωρίωσης συνεπίπεδη ομόλογη σειρά η οποία αποικοδομείται εύκολα από τα είδη *Pseudomonas* και *Pleurotus ostreatus*. Μετά από επώαση 2 μηνών, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ανοργανοποίηση της PCB 11 ήταν <0,4%, η μετάβαση στην αέρια κατάσταση ήταν <3,1% και το 30% της ραδιενέργειας δεσμεύτηκε στην εδαφική μήτρα. Το κύριο προϊόν της βιοαποδόμησης ήταν το 3-χλωροβενζοϊκό οξύ. Οι συγκεντρώσεις των συνεπίπεδων ομόλογων σειρών

είχαν μειωθεί σημαντικά από την αναγωγική αποχλωρίωση και από τα αναερόβια βακτήρια [51].

Στο νερό, μετασχηματισμοί όπως η υδρόλυση και η οξειδωση δεν συντελούν σημαντικά στην αποικοδόμηση των PCBs. Πιθανή διεργασία χημικής αποικοδόμησης στο νερό αποτελεί η φωτόλυση. Τα PCBs που περιέχουν μέχρι και έξι άτομα χλωρίου δεν απορροφούν σημαντικά το ηλιακό φως και οι εκτιμώμενοι χρόνοι ημιζωής των μονο- έως τετραχλωροδιφαινυλο PCBs με φωτόλυση κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε βάθος <0,5 m κυμαίνεται από 17 έως 210 ημέρες. Οι ρυθμοί της φωτόλυσης είναι ακόμα μικρότεροι κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Παρόλα αυτά, καθώς αυξάνει ο αριθμός των ατόμων χλωρίου η απορρόφηση του φωτός μετατοπίζεται προς μεγαλύτερα μήκη κύματος και αυξάνεται ο ρυθμός φωτόλυσης από τα επτά- έως τα δεκαχλωροδιφαινύλια.

Η βιοαποικοδόμηση των PCBs στο νερό, αν και αργή, συμβαίνει τόσο με αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες (Σχήμα 1.4). Ωστόσο, η βιοαποικοδόμηση είναι περισσότερο σημαντική στο έδαφος και στα ιζήματα παρά στο νερό, εξαιτίας του μεγαλύτερου αριθμού μικροοργανισμών. Η χρήση προσαρμοσμένων μικροβιακών πληθυσμών και η προσθήκη συμβατών υποστρωμάτων για συνμεταβολικούς και συνοξειδωτικούς βιομετασχηματισμούς ενισχύει το βιομετασχηματισμό και τη βιοαποικοδόμηση των PCBs (Σχήμα 1.4).

1.6 Περιβαλλοντικά επίπεδα και ανθρώπινη έκθεση

Τα αποτελέσματα για την ανθρώπινη έκθεση σε PCBs-DDTs εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αξιοπιστία των αναλυτικών δεδομένων από τα περιβαλλοντικά δείγματα και τα βιολογικά είδη. Για παράδειγμα, οι συγκρίσεις μεταξύ των διαφόρων μελετών περιπλέκεται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των PCBs αναφέρονται ως συγκεντρώσεις Aroclors ή ομόλογων σειρών.

1.6.1 Επίπεδα συγκεντρώσεων PCBs-DDTs στο περιβάλλον

Στον Πίνακα 1.6 παρατίθενται τα επίπεδα PCBs που σχετίζονται με την έκθεση του ανθρώπου από τον αέρα σε διάφορες χώρες, όπως αυτές παρουσιάζονται σε διάφορες μελέτες [52-55].

Αξίζει να σημειωθεί ότι η συγκέντρωση για διάφορα Aroclors στον αέρα εργαστηρίων, γραφείων, σπιτιών ακόμα και χώρων που φιλοξενούν ευαίσθητες ομάδες όπως παιδιά βρέθηκε μεγαλύτερη τουλάχιστον κατά 1 τάξη μεγέθους από την αντίστοιχη συγκέντρωση στον αέρα του εξωτερικού περιβάλλοντος [56,57]. Για παράδειγμα, τα μέσα επίπεδα PCBs ήταν 100 ng/m^3 μέσα σε ένα βιομηχανικό κτίριο και 210 ng/m^3 μέσα σε ένα εργαστήριο σε σχέση με τα $<20 \text{ ng/m}^3$ στον αέρα εκτός του κτιρίου. Η μέση συγκέντρωση PCBs στον αέρα των εσωτερικών χώρων ενός σπιτιού ήταν 310 ng/m^3 , ενώ ο μέσος όρος του αέρα εκτός, την ίδια ημέρα, ήταν 4 ng/m^3 . Ορισμένες ηλεκτρικές συσκευές και υλικά ανοικοδόμησης τα οποία περιέχουν PCBs ενδέχεται να τα εκπέμπουν στον εσωτερικό αέρα με αποτέλεσμα την αύξηση των επιπέδων PCBs.

Πίνακας 1.6: Ενδεικτικές περιεκτικότητες PCBs στον αέρα σε διάφορες χώρες.

Χώρα	Πόλη	PCBs (pg/m ³)	Έτος	Αναφορά
Ελλάδα	Θεσσαλονίκη, αστική περιοχή	<0,04 - 103	2001	52
N. Αφρική	KwaZulu-Natal Province, αστική περιοχή	128,4	2004-2005	53
Μεξικό	Chiapas, Veracruz, Tabasco, αστικές και αγροτικές περιοχές	34-213	2002-2004	54
Ιταλία	Brescia, βιομηχανική και αστική περιοχή	14,9-708,4	2013	55

1.6.2 Ανθρώπινη έκθεση

Ο γενικός πληθυσμός εκτίθεται σε PCBs μέσω του αέρα, του πόσιμου νερού και των τροφίμων. Γενικά, ο εξωτερικός αέρας στις αστικές περιοχές περιέχει PCBs έως περίπου και 1,0 ng/m³ (Πίνακας 1.6). Δεδομένου ότι η μέση εισπνοή ενός ενήλικου άνδρα είναι 23 m³ ημερησίως (IPCS 1994) η μέση ημερήσια έκθεση μέσω της εισπνοής είναι περίπου 25 ng. Ωστόσο, η συγκέντρωση των PCBs μπορεί να είναι τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη στον αέρα των εσωτερικών χώρων από ότι στον αέρα των εξωτερικών χώρων. Οι συγκεντρώσεις PCBs στον αέρα ενός τυχαίου χώρου εργασίας απόθεσης απορριμμάτων στις ΗΠΑ κυμαίνονταν από 850 έως 40.000

ng/m³. Στα 95 από τα 96 δείγματα αέρα που συλλέχθηκαν για ανάλυση από παρόμοιες εγκαταστάσεις οι συγκεντρώσεις των PCBs ξεπέρασαν τα 1000 ng/m³ [58]. Με βάση την EPA [18] τα επίπεδα σε PCBs δειγμάτων πόσιμου νερού ήταν κάτω από 100 ng/L και σε αρκετά από αυτά δεν ανιχνεύθηκαν PCBs. Με βάση ένα ρυθμό κατανάλωσης 2L /ημέρα για τους ενήλικες, η έκθεση για το γενικό πληθυσμό των ΗΠΑ από το πόσιμο νερό είναι <200 ng PCBs/ημέρα.

Η κύρια οδός της έκθεσης είναι μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων, ιδίως κρέατος, θαλασσινών και πουλερικών [8]. Μόλις το 2012 η Ευρωπαϊκή αρχή για την ασφάλεια των τροφίμων με επίσημη έκθεση της αναφέρει πως στην κορυφή της πυραμίδας των τροφίμων με υψηλά επίπεδα PCBs βρίσκεται το χοιρινό λίπος, τα αυγά, και γενικά το κρέας χοίρου και αμνού, τα οποία μάλιστα παρουσιάζουν σημαντική αύξηση σε σχέση με τα αντίστοιχα επίπεδα της προηγούμενης δεκαετίας [59]. Όπως αναφέρει χαρακτηριστικά η συγκεκριμένη έκθεση οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCB) παραμένουν στο περιβάλλον και η παρουσία τους σε τρόφιμα και ζωοτροφές που διατίθενται στην ευρωπαϊκή αγορά έχουν συσχετιστεί με επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Στη συγκεκριμένη έκθεση συνολικά 13.797 δείγματα αξιολογήθηκαν για τις διοξίνες και τα παρόμοια με τις διοξίνες PCBs (DLPCBs) και 19.181 δείγματα για τα μη παρόμοια με τις διοξίνες PCBs (NDL-PCB). Αυτά τα δείγματα υποβλήθηκαν μεταξύ 1995 και 2010 από 26 ευρωπαϊκές χώρες. Τουλάχιστον μία χημική ένωση της ομόλογης σειράς των DL-PCBs βρέθηκε σχεδόν σε όλα τα δείγματα, ενώ τουλάχιστον ένα NDL-PCB ποσοτικοποιήθηκε στο 68,4% των ζωοτροφών και 82,6% των δειγμάτων τροφίμων. Το κρέας από χέλια» και το συκώτι των ψαριών καθώς και παράγωγα προϊόντα περιείχαν τα υψηλότερα μέσα επίπεδα περιεκτικότητας για PCBs. Επίπεδα DL-PCB, και NDL-PCB, πάνω από τα επιτρεπτά ανώτατα επίπεδα προσδιορίστηκαν στο 10% και 3% των δειγμάτων τροφίμων, αντίστοιχα. Ο μέσος όρος έκθεσης σε DL-PCBs, εκτιμήθηκε να είναι μεταξύ 0,57 και 2,54 pg TEQ_{WHO05} / kg σ.β. ανά ημέρα ενώ η μέση έκθεση σε NDL-PCBs εκτιμήθηκε ότι είναι μεταξύ 4,3 και 25,7 ng / kg σ.β. ανά ημέρα. Τα ψάρια, το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα φαίνεται να είναι οι ομάδες τροφίμων που συμβάλλουν περισσότερο στη διατροφική έκθεση. Μια γενική μείωση των διατροφικών έκθεσης DL-PCBs, παρατηρήθηκε

μεταξύ 2002-2004 και 2008-2010, ενώ μικρότερη ήταν η μείωση που παρατηρήθηκε για τα NDL-PCB [59].

Από μια ανάλυση 120 ειδών διατροφής που αγοράστηκαν στην Ιαπωνία από το 1997-1998 εκτιμήθηκε η πρόσληψη χημικών ενώσεων παρόμοιων με τις διοξίνες (Toyoda et al 1999a,b). Οι συγκεντρώσεις των συνεπίπεδων PCBs 3,3',4,4' tetrachlorobiphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl και 3,3',4,4',5,5' hexachlorobiphenyl ήταν οι υψηλότερες στα θαλασσινά είδη (8.39-25.7 pg /g υγρού βάρους). Η συνολική πρόσληψη των τριών αυτών συνεπίπεδων PCBs από όλα τα είδη διατροφής ήταν 1,45 pg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα (θεωρώντας ένα βάρος σώματος 50 kg) η οποία συμβάλλει στο 60% της συνολικής TEQ πρόσληψης. Αυτή η πρόσληψη αντιπροσωπεύει ένα σχετικά υψηλό επίπεδο μόλυνσης από PCBs στην Ιαπωνία.

Επιπλέον, σε επιφανειακά ύδατα, το DDT δεσμεύεται στα σωματίδια του νερού, καθιζάνουν και εναποτίθενται στο ίζημα. Στη συνέχεια το DDT παραλαμβάνεται κυρίως από τους μικροοργανισμούς και τα ψάρια, όπου συσσωρεύεται σε υψηλά επίπεδα κυρίως στα θαλάσσια θηλαστικά (όπως οι φώκιες και φάλαινες), φθάνοντας σε επίπεδα πολλές χιλιάδες φορές υψηλότερες σε σχέση με το νερό. Σε αυτά τα ζώα, τα υψηλότερα επίπεδα του DDT βρίσκονται στο λιπώδη ιστό τους. Το DDT στο έδαφος μπορεί επίσης να απορροφηθεί από ορισμένα φυτά και από ζώα ή τους ανθρώπους που τρώνε τα γεωργικά προϊόντα. Η ποσότητα του DDT στα τρόφιμα έχει μειωθεί σημαντικά από τη στιγμή απαγόρευσης του. Κατά τα έτη 1986 έως 1991, ο μέσος όρος των ενηλίκων στις Ηνωμένες Πολιτείες κατανάλωναν κατά μέσο όρο 0,8 μικρογραμμάρια του DDT την ημέρα μέσω της διατροφής τους, ενώ τα συγκεκριμένα ποσά είχαν άμεση σχέση με την ηλικία και το φύλο τους. Το μεγαλύτερο μέρος του DDT στη διατροφή ενός ατόμου προέρχεται από το κρέας, τα πουλερικά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, και τα ψάρια. Τα φυλλώδη λαχανικά περιέχουν γενικά περισσότερο DDT σε σχέση με άλλα λαχανικά, πιθανώς επειδή το DDT στον αέρα αποτίθεται πάνω στα φύλλα. Τα βρέφη μπορεί να εκτίθενται πίνοντας μητρικό γάλα. Σήμερα, το DDT ή τα προϊόντα διάσπασής του εξακολουθούν να υπάρχουν στον αέρα, το νερό και το έδαφος. Ωστόσο, τα επίπεδα συγκέντρωσης τους είναι πολύ χαμηλότερα σε σχέση με προηγούμενες δεκαετίες.

1.6.3 Συγκεντρώσεις στον ορό

Ένας μεγάλος αριθμός μελετών αναφέρεται στις συγκεντρώσεις PCBs στον ορό [8]. Στις ΗΠΑ, η μέση συγκέντρωση κυμαίνεται μεταξύ 4-8 µg/L, με το 95% των ατόμων να έχουν επίπεδα χαμηλότερα από 20 µg/L [60]. Βρέθηκε μια άμεση σχέση μεταξύ των επιπέδων PCBs στον ορό και της ποσότητας των θαλασσινών που καταναλώνονται [61]. Το εύρος των γεωμετρικών μέσων επιπέδων PCBs στον ορό για άτομα που δεν καταναλώνουν θαλασσινά από νερά μολυσμένα με PCBs είναι 0,9-15 ng/mL [8]. Σε δείγματα [62] βρέθηκε ότι το 66,4% των ατόμων είχε συγκεντρώσεις χαμηλότερες από 1 mg/kg, το 28,9% είχε συγκεντρώσεις PCBs μεγαλύτερες από 1 mg/kg και το 5,1% είχε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 3 mg/kg στο λιπώδη ιστό τους.

1.7 Κινητική και μεταβολισμός σε πειραματόζωα και ανθρώπους

Οι άνθρωποι μπορούν να απορροφήσουν PCBs από την εισπνοή, από το στόμα και από το δέρμα. Τα PCBs απορροφώνται εύκολα από πειραματόζωα όταν χορηγούνται από το στόμα και σε μικρότερο βαθμό όταν χορηγούνται από το δέρμα. Γενικά, τα δεδομένα για την απορρόφηση από την εισπνοή είναι ανεπαρκή για την εκτίμηση των ποσοστών απορρόφησης. Στο γαστρεντερικό σωλήνα, τα PCBs διαχέονται παθητικά μέσα στις μεμβράνες των λιπόφιλων κυττάρων και εντός των αιμοφόρων αγγείων και μέσω των λιπιδίων απορροφώνται στο λεμφικό σύστημα που εκβάλλει στη υποκλείδια φλέβα.

Οι κυρίαρχοι φορείς PCBs στο ανθρώπινο πλάσμα είναι στο κλάσμα λιποπρωτεΐνης. Το μοτίβο κατανομής των PCBs δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ανθρώπων των ζώων και των άλλων ζωικών ειδών. Εξαιτίας του λιπόφιλου χαρακτήρα τους, τα PCBs, ειδικά οι πολύ χλωριωμένες ομόλογες σειρές, έχουν την τάση να συσσωρεύονται σε λιπώδεις ιστούς. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις PCBs βρίσκονται συνήθως στο ήπαρ, στο λιπώδη ιστό, στον εγκέφαλο και το δέρμα. Μέση συγκέντρωση 5.1, 3.2 και 0,76 mg/kg λίπους προσδιορίστηκαν σε δείγματα κοιλιακού λίπους, ήπατος και εγκεφάλου αντίστοιχα από πτώματα σε αυτοψία [63]. Οι συγκεντρώσεις των PCBs είναι πολύ υψηλότερες στο αίμα του ομφάλιου λώρου στον άνθρωπο από ότι στο μητρικό γάλα. Οι συγκεντρώσεις στον πλακούντα (κατά μέσο όρο 5027 ng/g

λίπους) ήταν 2,8 φορές υψηλότερες από εκείνες στο μητρικό γάλα (1770 ng/g λίπους) [64].

Σε ζώντες οργανισμούς, τα PCBs μετασχηματίζονται σε υδροξυ- και μεθυλο σουλφόνο- μεταβολίτες που δεν αποβάλλονται άμεσα αλλά διατηρούνται και συσσωρεύονται σε συγκεκριμένους ιστούς και υγρά του σώματος. Αυτοί οι μεταβολίτες έχουν ταυτοποιηθεί στον άνθρωπο καθώς και σε άγρια είδη ζώων. Ορισμένα ένζυμα του P450 και ειδικά αυτά της ομάδας CYP2B είναι γνωστό ότι εμπλέκονται στο σχηματισμό αυτών των μεταβολιτών. Τα μοτίβα των μεθυλοσουλφονο PCBs που έχουν εντοπιστεί σε διαφορετικές βιολογικές μήτρες, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που προέρχονται από τον άνθρωπο, υποδεικνύουν ότι ο βιολογικός χρόνος ημιζωής εξαρτάται από τη δομή του αρχικού PCB [38,65].

Τα PCBs μεταβολίζονται από το σύστημα της μικροσωματικής μονοοξυγενάσης και καταλύονται από το κυτόχρωμα P450 σε πολικούς μεταβολίτες οι οποίοι συνδέονται με γλουταθειόνη και γλυκουρονικό οξύ. Ένα περιορισμένης ροής φαρμακοκινητικό μοντέλο περιγράφει τη διάθεση ορισμένων ομόλογων σειρών PCBs στα ενήλικα άτομα διαφόρων ειδών ζώων [66]. Ο όρος της περιορισμένης ροής στην πρόσληψη από το αίμα χρησιμοποιήθηκε επειδή τα πειραματικά δεδομένα δείχνουν ότι τα PCBs εισάγονται ταχύτατα από το αίμα στον ιστό. Σε αυτό το μοντέλο, ο μεταβολισμός των PCBs θεωρήθηκε ότι συμβαίνει στο ήπαρ σε ένα και μοναδικό στάδιο που οδηγεί στο σχηματισμό ενός μεταβολίτη, ο οποίος εκκρίνεται στα ούρα και στη χολή με τη μορφή του συζευγμένου γλυκουρονιδίου. Ενώ υπάρχουν πολλές ομοιότητες από είδος σε είδος εμφανίζονται και ορισμένες σημαντικές διαφορές. Η σημαντικότερη παράμετρος στο μοντέλο φαίνεται να είναι ο ρυθμός του μεταβολισμού. Η γνώση αυτής της παραμέτρου σε κάθε είδος ενδιαφέροντος είναι ιδιαίτερης σημασίας για αξιόπιστες προβλέψεις της διάθεσης των PCBs.

Ο ρυθμός του μεταβολισμού καθορίζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

1. η υδροξυλίωση ευνοείται σε παρα- θέση στο λιγότερο χλωριωμένο δακτύλιο φαινυλίου εκτός εάν αυτή η θέση παρεμποδίζεται στερεοχημικά (όπως στην 3.5-διχλωρο υποκατάσταση),

2. στις χαμηλότερες ομόλογες σειρές χλωριωμένων διφαινυλίων, η παραθήκη και των δύο δακτυλίων φαινυλίου και των ατόμων άνθρακα που είναι σε παραθήκη ως προς την χλωρο- υποκαταστάτη, μπορεί να υδροξυλιωθεί,
3. η διαθεσιμότητα δύο γειτονικών μη υποκατεστημένων ατόμων άνθρακα (κυρίως C5 και C4) διευκολύνει τον οξειδωτικό μεταβολισμό του υποστρώματος των PCBs, αλλά δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση για το μεταβολισμό του,
4. όσο αυξάνεται ο βαθμός χλωρίωσης στους δύο δακτυλίους φαινυλίου τόσο ελαττώνεται ο ρυθμός του μεταβολισμού και
5. ο μεταβολισμός συγκεκριμένων PCB ισομερών από διαφορετικά είδη οδηγεί σε σημαντικές διακυμάνσεις στην κατανομή του μεταβολίτη.

Τα τριχλωροδιφαινύλια μεταβολίζουν ταχύτερα και σχηματίζουν περισσότερους μεταβολίτες από τετρα- ή πένταχλωροδιφαινύλια. Έτσι, για παράδειγμα, στο ήπαρ προβάτων τα μικροσώματα μετατρέπουν το 2,2',5'-τριχλωροδιφαινύλιο σε τουλάχιστον 5 ακόμη πολικούς μεταβολίτες μέσα σε 1 λεπτό και σε τουλάχιστον 10 μεταβολίτες εντός 15 λεπτών. Ωστόσο, εντός της ομόλογης σειράς 2,2',5,5'-τετραχλωροδιφαινύλιο και 2,2',4,5,5'-πενταχλωροδιφαινύλιο οξειδώνονται σε μόνο τρεις μεταβολίτες με ρυθμούς 7 και 14 φορές βραδύτερους, αντίστοιχα, από ότι το 2,2',5-τριχλωροδιφαινύλιο [67].

Η ημιζωή μίγματος PCBs σε παιδιά φαίνεται να είναι μικρότερη από ότι στις μητέρες τους μετά την διατροφική έκθεση σε Kanechlor 300. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την ανάπτυξη των παιδιών (η εναπόθεση των PCBs στον αυξανόμενο ιστό έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της συγκεντρώσεως των PCBs στο αίμα εξαιτίας της αραίωσης παρά της απομάκρυνσης) [68]. Οι κύριες οδοί απομάκρυνσης των PCBs είναι μέσω των κοπράνων, των ούρων και του μητρικού γάλατος.

1.8 Επίδραση σε θηλαστικά και in-vitro συστήματα ελέγχου

1.8.1 Συγκεντρώσεις στον λιπώδη ιστό

Οι τιμές LD50, μιας στοματικής δόσης, για τα Aroclors 1242, 1254 και 1260 είναι 4250, 1010-1295 και 1315 mg/kg βάρους σώματος αντίστοιχα, σε τρωκτικά. Οι τιμές LD50 σε μινκ για τα Aroclors 1221, 1242, και 1254 είναι

750-1000, >3000 και 4000 mg/kg σωματικού βάρους αντίστοιχα [69-75]. Οι διακυμάνσεις των τιμών LD50 σχετίζονται με παράγοντες όπως το είδος του ζώου, την ηλικία, το φύλο ή την καθαρότητα του σκευάσματος. Για παράδειγμα, υπάρχει η ένδειξη ότι οι ανήλικοι αρουραίοι (3-4 εβδομάδων) είναι πιο επιρρεπείς σε PCBs από ότι οι ενήλικες [72,73]. Τα κλινικά συμπτώματα σε αρουραίους περιλαμβάνουν διάρροια, αναπνευστική καταστολή, αφυδάτωση, μειωμένη απόκριση σε ερεθίσματα πόνου, ασυνήθιστο βάδισμα και στάση, ολιγουρία και κώμα. Μετά από υψηλή δόση μίγματος PCBs παρατηρήθηκε εκφυλισμός και λιπώδης ενδοδιήθηση σε νεφρικά και ηπατικά κύτταρα [70] και μειωμένη συγκέντρωση ντοπαμίνης στον πυρήνα [76]. Τα παθολογικά ευρήματα σε νεκρούς αρουραίους είναι η αιμορραγία στον πνεύμονα, στο στομάχι και στο πάγκρεας. Εστίες έλκους που περιβάλλονται από σοβαρές φλεγμονές, κυρίως στο δωδεκαδάκτυλο και στο αδενικό μέρος του στομάχου παρατηρήθηκαν κατά τη νεκροψία [73]. Η δερματική έκθεση σε Aroclor 1254 2.273 mg/kg σωματικού βάρους προκαλεί θάνατο στους αρουραίους [77].

1.8.2 Βραχυχρόνια έκθεση

Σε αρουραίους Sprague-Dawley (έξι θηλυκά) χορηγήθηκε από το στόμα 0 ή 25 mg Aroclor 1221/kg βάρους ανά ημέρα σε σησαμέλαιο τις ημέρες του τοκετού 25, 27, 29 και 31. Οι αρουραίοι θανατώθηκαν 18 ώρες μετά την τελευταία δόση. Η χορήγηση Aroclor 1221 είχε μικρή και στατιστικά ασήμαντη επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην ανάπτυξη του μαστικού αδένου, στο σωματικό βάρος, στο βάρος της μήτρας και στο μέγεθος του μαστικού αδένου. Σε αρουραίους Wistar (η = 4) χορηγήθηκε Aroclor 1254 σε δόσεις των 0, 2,5 ή 7,5 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα για 7 ημέρες. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στο βάρος του ήπατος και μείωση στην ενεργότητα της glucose-6-phosphatase και της thyroxine (T4). Η δόση των 2.5 mg /kg βάρους σώματος ημερησίως προσδιορίστηκε ως το LOAEL για το βάρος του ήπατος και τα επίπεδα T4 [78].

1.8.3 Μακροχρόνια έκθεση και καρκινογένεση

Οι περισσότερες από τις μακροπρόθεσμες μελέτες τοξικότητας σε PCBs έχουν πραγματοποιηθεί με τη χρήση εμπορικών μιγμάτων PCBs, των οποίων η ακριβής σύνθεση δεν είναι γνωστή.

Στον πίνακα 1.9 απεικονίζονται τα αποτελέσματα μιας ολοκληρωμένης μελέτης της χρόνιας τοξικότητας και της καρκινογένεσης σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους Sprague-Dawley (650 ανά φύλο) [79,80]. Οι αρουραίοι εκτέθηκαν σε Aroclor 1016, 1242, 1254 και 1260 σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 25-200 mg/kg. Η συνολική συγκέντρωση των PCDD που αναλύθηκε ήταν 0,6, 0,20 και 0,0 μg/kg, αντίστοιχα, και οι συνολικές συγκεντρώσεις PCDF ήταν 0,05, 2,20, 0,13 και 5,50 mg/kg, αντίστοιχα. Τα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων (ασπαρτική αμινοτρανσφεράση, αμινοτρανσφεράσης της αλανίνης, γ-GT τρανσφεράση), τα σωματικά βάρη, η θνησιμότητα, και ιστοπαθολογικές εξετάσεις διεξήχθησαν για 2 χρόνια. Όλα τα Aroclors που δοκιμάστηκαν προκάλεσαν μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση στους ηπατικούς όγκους των θηλυκών αρουραίων. Η καρκινογόνος δραστηριότητα ακολουθεί την παρακάτω φθίνουσα σειρά: Aroclor 1254 > 1260 ≈ 1242 >> 1016. Σημαντική επίδραση παρατηρήθηκε στα αρσενικά μετά από τη χορήγηση Aroclor 1260 στο υψηλότερο επίπεδο δόσης [79]. Δεν υπήρξαν αλλαγές στην εμφάνιση, τη συμπεριφορά, και στα ποσοστά θνησιμότητας που να υποδεικνύουν συστηματική τοξικότητα. Το σύνολο των όγκων του θυρεοειδούς μεταξύ των αρσενικών ήταν σημαντικά ($P < 0,05$) υψηλότερη από ότι στην ομάδα ελέγχου στην οποία χορηγήθηκε Aroclor 1242 και 1254 και χαμηλότερες δόσεις Aroclor 1260. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική αύξηση σε όγκους του θυρεοειδούς μετά τη χορήγηση του Aroclor 1016 [79]. Μια στατιστικά σημαντική πτωτική τάση στη συχνότητα των μαστικών νεοπλασματικών βλαβών του αδένου παρατηρήθηκε μετά τη χορήγηση Aroclor 1242, 1254 ή 1260.

Σε ομάδες αρουραίων Fischer (344, 24 ανά φύλο ανά επίπεδο δόσης) χορηγήθηκε Aroclor 1254 σε δόσεις των 0, 25, 50, ή 100 mg/kg για 104 εβδομάδες. Μια χαμηλή και στατιστικά μη σημαντική συχνότητα ηπατοκυτταρικών αδενωμάτων και καρκινωμάτων (≤ 3 ανά ομάδα δόσης) παρατηρήθηκε στις ομάδες, οι όγκοι αυτοί δεν παρατηρήθηκαν στους ελέγχους. Μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση των μη νεοπλασματικών υπερπλαστικών οζιδίων στο ήπαρ παρατηρήθηκε σε αρσενικά και θηλυκά (Πίνακας 1.9). Η συνδυασμένη συχνότητα εμφάνισης λεμφωμάτων και λευχαιμιών παρουσίασαν σημαντική δοσοεξαρτώμενη τάση στα αρσενικά, αν

και καμία από τις διαφορές μεταξύ των επιμέρους ομάδων και των αντίστοιχων ελέγχων δεν ήταν σημαντική [82].

Σε αρσενικούς και θηλυκούς αρουραίους Sprague-Dawley (63 έλεγχοι και 70 εκθέσεις ανά φύλο) χορηγήθηκε Aroclor 1260 σε δόσεις των 0 ή 100 mg/kg για διάστημα 16 μηνών, ακολουθούμενη από 50 mg/kg για 8 μήνες. Ηπατοκυτταρικά νεοπλάσματα αναπτύχθηκαν σε 52/93 και 1/81 αρουραίους ελέγχου που επιβίωσαν τουλάχιστον για 18 μήνες. Υψηλή συχνότητα εμφάνισης νεοπλασμάτων στο ήπαρ παρατηρήθηκαν σε ομάδες θηλυκών (95%) σε σύγκριση με τα αρσενικά (15%), υποδεικνύοντας αποτελέσματα που σχετίζονται με το φύλο [83].

Οι βλάβες στο ήπαρ εξελίχθηκαν ως εξής: κεντρολοβιακή κυτταρική υπετροφία στον 1 μήνα, εστίες αλλοίωσης κυττάρων στους 3 μήνες, στους τομείς της μετατροπής κυττάρων στους 6 μήνες και αδενοκαρκίνωμα στους 24 μήνες. Αυτές οι αλλοιώσεις ήταν σχετικά μη επιθετικά κακοήθεις επειδή δεν έκαναν μεταστάσεις στους πνεύμονες ή να διεισδύσουν στα αιμοφόρα αγγεία. Σε ομάδες αρσενικών αρουραίων Wistar (n = 139-152 ανά ομάδα κατά την έναρξη του πειράματος) χορηγήθηκε Clophen A-60 και A-30 σε 100 mg/kg για 832 ημέρες. Στη διατροφή της ομάδας ελέγχου δεν έγινε προσθήκη PCBs. Μελετήθηκε το ποσοστό θνησιμότητας σε διαστήματα 100 ημερών. Το πρώτο ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα εντοπίστηκε μετά από 700 ημέρες και αναπτύχθηκε σε 61/115 (53%), 4/107 (4%) και 1/92 (1%) αρουραίων που τους χορηγήθηκε Clophen A-60, A-30 και των ομάδων ελέγχου αντίστοιχα. Νεοπλασματικά οζίδια άρχισαν να εμφανίζονται μετά από 500 ημέρες και παρατηρήθηκαν σε 62/125 (50%), 38/130 (29%) και 5/122 (4%) [83]. Σε τρεις ομάδες αρσενικών αρουραίων Wistar χορηγήθηκε Aroclor 1260 σε 0.50 και 100 mg/kg για 120 ημέρες. Η χορήγηση αύξησε σημαντικά την εμφάνιση νεοπλασματικών οζιδίων στο ήπαρ των 50 mg/kg (24/32) και των 100 mg/kg (16/32) ομάδων. Δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικές μεταβολές σε ιστούς εκτός του ήπατος [84]

Σε μελέτες καρκινογένεσης διαπιστώθηκε ότι το Aroclor 1254 και άλλα PCBs παρόμοιας περιεκτικότητας σε χλώριο συντελούν στη δημιουργία όγκων στο ήπαρ σε αρουραίους και ποντίκια [85] και του πνεύμονα σε ποντίκια με ακόλουθη δημιουργία διαφόρων γονοτοξικών καρκινογόνων

ουσιών. Συνοψίζοντας, τα PCBs, ιδίως τα υψηλά χλωριωμένα μίγματα ($\geq 42\%$) είναι ηπατοκαρκινογόνα στα ζώα.

Πίνακας 1.7. Ηπατικοί όγκοι σε αρουραίους μετά από χορήγηση μιγμάτων PCBs.

Μείγμα PCBs	Φύλο αρουραίου	Δόση σε mg/kg σ.β ανά ημέρα	Διάρκεια	Ζώα με όγκο/συνολικό αριθμό ζώων	Αναφορά
Aroclor 1260	Θ	Ελέγχου	23 μήνες	1/173	[69]
		5,0		170/184	
	A	Ελέγχου	105 εβδομάδες	7/98	[79,80]
		1,0		3/50	
		2,0		6/49	
		4,1		10/49	
		Ελέγχου		1/85	
		1,4		10/49	
	Θ	2,8	105 εβδομάδες	11/45	[79,80]
		5,8		24/50	
Ελέγχου			0/24		
1,5		104 εβδομάδες	5/24	[81]	
Aroclor 1254	A	2,5	104 εβδομάδες	9/24	[81]
		5,0		15/24	
		Ελέγχου		0/23	
	Θ	1,5	104 εβδομάδες	6/24	[81]
		2,5		10/24	
		5,0		19/24	
	A	Ελέγχου	105 εβδομάδες	7/98	[79,80]
		1,0		4/48	
2,0		4/49			
4,3		6/47			
Ελέγχου		1/85			
Θ	1,0	105 εβδομάδες	19/45	[79,80]	
	2,9		28/49		

		6,6		28/49	
		Ελέγχου		7/98	
	A	2,0	105 εβδομάδες	2/48	[79,80]
		4,0		4/46	
Aroclor 1242		Ελέγχου		1/85	
	Θ	2,8	105 εβδομάδες	11/49	[79,80]
		5,7		15/45	
		Ελέγχου		7/98	
	A	2,0	105 εβδομάδες	2/48	[79,80]
		4,0		2/50	
		8,0		4/49	
Aroclor 1016		Ελέγχου		1/85	
	Θ	2,7	105 εβδομάδες	1/48	[79,80]
		5,4		6/45	
		11,2		5/50	
		Ελέγχου		1/92	
Clophen A-30	A	5,0	832 ημέρες	4/107	[79,80]
Clophen A-60	A	5,0	832 ημέρες	61/115	[81]

1.9 Γενοτοξικότητα και σχετικές παράμετροι

Τα PCBs δεν εμφανίζουν μεταλλαξιογόνο δράση όταν δοκιμάστηκαν στον προκαρυωτικό οργανισμό της *Salmonella typhimurium* με ή χωρίς συστήματα ενεργοποίησης. Σε *in vitro* δοκιμές σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς (κύτταρα V79 hamster) δεν οδήγησαν σε μεταλλαξιογόνα αποτελέσματα [86]. Παρόλα αυτά τα PCB 52 και 77 οδήγησαν σε διάσπαση του DNA σε ανθρώπινα λεμφοκύτταρα [87]. Επίσης τα PCBs 153, 138, 101 και 118 προκάλεσαν βλάβες σε κύτταρα ψαριών [88].

Γενικά, οι δοκιμές για την γενοτοξικότητας των PCBs *in vivo* σε αρουραίους και ποντίκια έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα. Η χορήγηση εφάπαξ δόσεων ≤ 500 mg Aroclor 1242/kg βάρους σώματος σε αρουραίους δεν προκάλεσε χρωμοσωμικές βλάβες στα κύτταρα του μυελού των οστών ή στα σπερματογόνα κύτταρα [89]. Στην ίδια μελέτη, δόσεις Aroclor 1254 ≤ 750 mg/kg ανά ημέρα χορηγούμενη για μια περίοδο 5 ημερών δεν αύξησε τη συχνότητα των χρωμοσωμικών ανωμαλιών στα κύτταρα του μυελού των οστών.

Ο Whysner και οι συνεργάτες του (1998) [90] χορήγησαν Aroclor 1260 σε ποντικούς είτε ως εφάπαξ δόση 50 mg/kg σωματικού βάρους ή ως ημερήσια δόση των 37.5 mg/kg σωματικού βάρους για 14 ημέρες. Το βάρος του ήπατος αυξήθηκε σε αυτούς που τράφηκαν για 14 ημέρες αλλά όχι σε εκείνες που τους χορηγήθηκε η εφάπαξ δόση. Ανθρώπινα λεμφοκύτταρα στο αίμα ή σε απομονωμένες καλλιέργειες εκτέθηκαν σε PCB 77 σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,1 και 100 $\mu\text{g/ml}$ σε μια *in vitro* δοκιμή κυτοχλασίνης μικροπυρήνων [91]. Το PCB 77 δεν προκάλεσε θραύση των χρωμοσωμάτων ή την παραγωγή μικροπυρήνων. Ο Dubois και οι συνεργάτες του (1995) [92] χρησιμοποίησαν ^{32}P για την ανίχνευση προϊόντων προσθήκης DNA στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά Hep G2 με την έκθεση σε Aroclor 1254 ή 3,3',4,4' tetrachlorobiphenyl. Βρέθηκαν προϊόντα προσθήκης στο DNA μετά από έκθεση στο 3,3',4,4'-τετραχλωροδιφαινύλιο αλλά όχι στο Aroclor 1254.

Συνοπτικά, τα αποτελέσματα των *in vitro* και *in vivo* μελετών της γενοτοξικότητας των PCBs δείχνουν ότι δεν αποτελούν άμεση γενοτοξική απειλή για τον άνθρωπο. Αν και ο μηχανισμός πρόκλησης του καρκίνου στο

ήπαρ σε τρωκτικά δεν είναι πλήρως κατανοητός, δεν οφείλεται στη γενετοξικότητα.

1.10 Αναπαραγωγική τοξικότητα

1.10.1 Επιπτώσεις στη γονιμότητα

Σε σχετικά υψηλές δόσεις PCBs έχουν παρατηρηθεί επιδράσεις σε αρουραίους, ποντίκια και πιθήκους. Έχουν παρατηρηθεί δυσμενείς επιδράσεις στην αναπαραγωγή τόσο στους αρσενικούς όσο και στους θηλυκούς απογόνους με τη χορήγηση Aroclor 1254 κατά τη διάρκεια της γαλουχίας τους γεγονός που υποδηλώνει ότι τα PCBs που μεταφέρονται κατά τη διάρκεια του θηλασμού έχουν μακροχρόνια επίδραση. Αρουραίοι Holtzman εκτέθηκαν για μία φορά την ημέρα σε 0, 8, 32 και 64 mg Aroclor 1254/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα τις ημέρες 1, 3, 5, 7 και 9 της γαλουχίας.. Στη συνέχεια εξετάστηκαν οι 2-4,5 μηνών (νέοι), οι 5-8 μηνών (ώριμοι) και 8.5-13 μηνών (ενήλικες μεγαλύτερης ηλικίας). Οι νέοι αρουραίοι αντιστοιχούν σε αρσενικά ηλικίας 112 ημερών, σε ώριμα αρσενικά 200 ημερών και ηλικιωμένα ηλικίας 350 ημερών. Τελέστηκαν αυτοψίες την 11^η και τη 12^η ημέρα της κυοφορίας. Στους απογόνους, η ημέρα του κοιλιακού ανοίγματος και η ημέρα της πρώτης περιόδου καθυστέρησε σημαντικά στις δόσεις των 32 και 64 mg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα. Μία δόσοεξαρτώμενη μείωση στην απογαλακτική αύξηση παρατηρήθηκε και ήταν στατιστικά σημαντική. Το ποσοστό του ζευγαρώματος δεν μεταβλήθηκε σημαντικά στους μικρούς και μεγάλους απογόνους, αλλά μειώθηκε σημαντικά στους ώριμους απογόνους σε κάθε επίπεδο δόσης.

Σε πέντε ομάδες θηλυκών πιθήκων (16 πίθηκους ανά ομάδα) χορηγήθηκε 0, 5, 20, 40 και 80 μg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα Aroclor 1254 που περιείχε 5,2 mg PCDFs/ kg και PCDDs σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα [92]. Μια φαρμακοκινητική σταθεροποιημένη κατάσταση επιτεύχθηκε στο 25ο μήνα. Στον 27ο μήνα κάθε θηλυκό συζεύχθηκε με ένα συμβατό αρσενικό. Υπήρξε μια σημαντική μείωση στο ποσοστό σύλληψης για τα τρία υψηλότερα επίπεδα δόσης. Μετά την προσαρμογή για το συνολικό αριθμό των ζευγαρωμάτων, παρατηρήθηκαν επιδράσεις και τη χαμηλότερη δόση (5 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα) αλλά δεν ήταν στατιστικά σημαντικές ($p = 0,085$) και ως εκ τούτου χαρακτηρίστηκαν ως NOAEL.

Σε αρσενικά νεογνά αρουραίων χορηγήθηκε, για 25 ημέρες, Aroclor 1242 (0,4, 1,6, και 3,3 mg/ημέρα) και Aroclor 1254 (0,4 και 1,6 mg/ημέρα) σε 0,04 mL ελαίου καλαμποκιού. Η ομάδα ελέγχου έλαβε μόνο το έλαιο. Τα νεογνά, μετά τον απογαλακτισμό τους, στεγάστηκαν 3-4 μαζί για 135 ημέρες. Μετρήθηκαν το βάρος των όρχεων, το σωματικό βάρος, η T4 στον ορό και η ημερήσια παραγωγή σπέρματος. Η δόση των 0.4 mg/ημέρα Aroclor 1242 δεν αύξησε σημαντικά το βάρος των όρχεων και ως εκ τούτου θεωρήθηκε ως NOAEL. Οι δόσεις του Aroclor 1254 (0.4 και 1.6 mg/ημέρα) αύξησαν σημαντικά το βάρος των όρχεων σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επίσης, αυξήθηκε σημαντικά ($p < 0,05$) η ημερήσια παραγωγή σπέρματος για τη δόση των 1,6 mg Aroclor 1242/ημέρα και για τις δόσεις των 0,4 και 1,6 mg Aroclor 1254/ημέρα συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου [95]. Επίσης αξιολογήθηκαν το βάρος των όρχεων και τα επίπεδα τεστοστερόνης σε αρουραίους των οποίων η διατροφή περιείχε μίγμα PCBs παρόμοιο με αυτό που βρέθηκε στο ανθρώπινο μητρικό γάλα. Το ενήλικο αρσενικό (170 ημερών) παρουσίασε μείωση κατά 30% στο βάρος των όρχεων και μία μείωση 60% των επιπέδων τεστοστερόνης του ορού. Υπήρξε επίσης μια μείωση στην ενεργότητα της αρωματάσης στους εγκεφάλους των αρσενικών νεογέννητων και παρατηρήθηκε μια θηλυκή συμπεριφορά μεταξύ των ενήλικων αρσενικών απογόνων [95].

1.10.2 Επίδραση στο ενδοκρινικό σύστημα

Σε αρκετές μελέτες έχει διερευνηθεί η επίδραση των PCBs στα οιστρογόνα. Η χορήγηση 1,4 mg Aroclor 1242/kg σωματικού βάρους σε αρουραίους αύξησε σημαντικά το βάρος της μήτρας αποτέλεσμα παρόμοιο με την επίδραση της 17β- οιστραδιόλη. Αυτή η επίδραση προκαλείται και από το δι-όρθο-2,2', 5,5 -τετραχλωροδιφαινύλιο αλλά όχι από το 3,3',4,4'- τετραχλωροδιφαινύλιο που περιόριζε την αύξηση του βάρους της μήτρας. Το συμπέρασμα είναι ότι τα PCBs προκαλούν οιστρογονικό ή αντιοιστρογονικό αποτελέσματα, ανάλογα με τη σύσταση του μίγματός τους. Ο Jansen και οι συνεργάτες του (1993) ανέφεραν ότι το Aroclor 1242 αυξάνει τη βασική απελευθέρωση γοναδοτροπίνης από τα κύτταρα της υπόφυσης *in vitro* και ενισχύει την ανταπόκριση προς την απελευθέρωση της ορμόνης γοναδοτροπίνης [96]. Ο Nesaretnam και οι συνεργάτες του (1996) ανέφεραν την οιστρογονική επίπτωση της 3,3',4,4' τετραχλωροβισφαινύλιο *in vitro* και *in*

νίνο [97]. Οι ομόλογες σειρές εμφάνισαν δραστικότητα σύζευξης με τον υποδοχέα του οιστρογόνου, ικανότητα σύζευξης του οιστρογόνου με το DNA, ρύθμιση των γονιδίων του οιστρογόνου, επιδράσεις στην κυτταρική ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων (MCF-7 και ZR-75-1) στο ανθρώπινο στήθος και μητροτροφική επιδράσεις in vivo σε ποντίκια. Σε αυτές τις μελέτες δεν παρατηρήθηκε οιστρογονική δραστηριότητα για το 2,2',5,5'-τετραχλωροβισφαινύλιο. Οι Krishnan και Safe (1993) μελέτησαν τα αποτελέσματα διαφόρων μιγμάτων Aroclor στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού. Η μετρούμενη απόκριση ήταν η αναστολή της 17β-ιστραδιόλης επαγόμενη από την έκκριση της πρωτεΐνης 52 kDa προκαθεψίνη D. Η σειρά της αντιοιστρογονικής δραστικότητας των PCBs ήταν 3,3', 4,4',5-πενταχλωροδιφαινύλιο > 3,3',4,4',5,5'-εξαχλωροδιφαινύλιο ~ 3,3',4,4'-τετραχλωροδιφαινύλιο > 2,3,3',4,4',5'-εξα-,2,3,3',4,4'-πεντα- και 2,3,4,4',5-πενταχλωροδιφαινύλιο. Τα Aroclors 1221, 1232, 1248, 1254 και 1260 ήταν ανενεργά ως αντιοιστρογόνα στις υψηλότερες δόσεις. Τα αποτελέσματα από μελέτες in vitro με ωκύτταρα ποντικίων από υπερωορρηξία έδειξαν ότι τα Aroclors 1221, 1254, 1268 και 3,3',4,4'-τετραχλωροβισφαινύλιο μειώνουν σημαντικά το ποσοστό γονιμοποίησης, αυξάνοντας παράλληλα τη συχνότητα εμφάνισης εκφυλιστικών ωαρίων και έμβρυα δύο κυττάρων. Το Aroclor 1254 ήταν το περισσότερο δραστικό. Στην περιοχή συγκεντρώσεων (1-10 µg/mL) το Aroclor 1254 δεν παρουσίασε επίδραση στη λειτουργία του σπέρματος [98].

1.10.3 Επίδραση στην ανάπτυξη

Σε θηλυκούς πιθήκους (n = 8) χορηγήθηκαν 2,5 mg Aroclor 1248/kg σωματικού βάρους για 18,2 μήνες κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας [99-100]. Τα ζώα αφέθηκαν να συλλάβουν σε διάστημα 12 μηνών (ομάδα I) (δοκιμές σε τέσσερις απογόνους ηλικίας 6 ετών και τέσσερις έλεγχοι) και πάλι στους 32 μήνες μετά το τέλος της χορήγησης Aroclor 1248 (ομάδα II) (δοκιμές σε τρεις απογόνους ηλικίας 4 ετών και έξι έλεγχοι). Δεν υπάρχουν εμφανή σημάδια της μητρικής τοξικότητας. Στην ομάδα I, επτά από τους οκτώ πιθήκους γέννησαν ζωντανά βρέφη. Ένα βρέφος πέθανε από λοίμωξη *Shigella* αμέσως μετά τον απογαλακτισμό και η νεκροψία έδειξε σαφή σημάδια ανοσοτοξικότητας και κερατινοποίησης των θυλάκων τριχών του προσώπου και των βλεφαρίδων. Ένα άλλο βρέφος πέθανε στους 16

μήνες της ηλικίας αλλά δεν σχετίστηκε με τη χορήγηση PCBs. Στην ομάδα II, τρεις από τις επτά μητέρες γέννησαν ζωντανά βρέφη. Οι τρεις απογόνοι δοκιμάστηκαν σε ηλικία 4 ετών, με έξι ελέγχους. Σε αμφότερες τις ομάδες των βρεφών ανιχνεύτηκε σημαντική υστέρηση στη χωρική μεταβολή (delayed spatial alternation) σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Η επίδραση αυτή συνδέεται με την απομείωση της προσοχής ή οργανοσιακές διαδικασίες και όχι σε μια απομείωση στη διαδικασία της μνήμης. Επίσης κατά το διάστημα της δοκιμής (6 έτη για την ομάδα I και 4 έτη για την ομάδα II) οι απόγονοι των θηλυκών που είχαν εκτεθεί είχαν ήπια δερματολογικές βλάβες και υπέρχρωση τριχών. Η τιμή LOAEL για Aroclor 1248 καθορίστηκε στα 0,03 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα.

Επίσης παρατηρήθηκαν νευροαναπτυξιακά ελλείμματα σε θηλυκούς αρουραίους μετά από έκθεση σε υψηλά επίπεδα (≥ 4 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα) ορθο-υποκατεστημένων PCB ισομερών (2,4,4'-τριχλωροδιφαινύλιο, 2,3',4,4',5- πενταχλωροδιφαινύλιο και 2,2,5,5'-εξαχλωροδιφαινύλιο), αλλά όχι μετά από έκθεση σε συνεπίπεδα PCBs (3,3',4,4'-τετραχλωροδιφαινύλιο και 3,3',4,4',5- πενταχλωροδιφαινύλιο). Η υγεία των μητέρων εκτιμήθηκε και βρέθηκε να μην επηρεάζεται από την έκθεση στα PCBs [101].

Νευροαναπτυξιακά ελλείμματα αναφέρθηκαν και σε απογόνους αρουραίων που έλαβαν κατά τη διάρκεια της κύησης και της γαλουχίας τους σχετικά χαμηλές δόσεις Fenclor 42 [102]. Θηλυκοί αρουραίοι Fischer (οκτώ ανά ομάδα) εκτεθηκαν σε Fenclor 42 κατά τα ακόλουθα διαστήματα: 2 εβδομάδες πριν το ζευγάρωμα (για 5 ημέρες), κατά τη διάρκεια της κύησης (6-15 ημέρες) και μετά τη γέννηση (από την ημέρα 1 έως την ημέρα 21). Τους χορηγήθηκαν 5-10 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα πριν από τη σύλληψη (σε έλαιο καλαμποκιού), 2-4 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και 1-2 mg/kg βάρους σώματος κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η ημέρα της γέννησης θεωρήθηκε ως ημέρα μηδέν. Παρατηρήθηκαν δοσοεξαρτώμενες διαφορές στη συμπεριφορά μεταξύ των απογόνων ελέγχου και των ομάδων του Fenclor 42. Οι διαφορές εντοπίστηκαν στην ανάπτυξη της αντίδρασης αποφυγής γκρεμού, στις ικανότητες κολύμβησης και στις δραστηριότητες πεδίου. Οι δόσεις των 2 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα και των 4 mg/kg βάρους σώματος ανά

ημέρα αναγνωρίστηκαν ως η NOAEL και η κύρια LOAEL για τις διαφοροποίηση της συμπεριφοράς, αντίστοιχα [102].

Οι Rice & Hayward (1997) [103] μελέτησαν τα αποτελέσματα της μεταγεννητικής έκθεσης σε ένα μίγμα 15 ομόλογων σειρών PCBs τα οποία είναι παρόμοια με αυτά του ανθρώπινου γάλακτος (80%) στη μάθηση των πιθήκων *cynomolgus*. Σε οκτώ αρσενικούς πιθήκους χορηγήθηκε, από τη γέννηση έως 20 εβδομάδες, 0,0075 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα. Πέντε πίθηκοι χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδα ελέγχου. Η ημερήσια δόση λαμβανόταν 3 φορές/ημέρα για 7 ημέρες/εβδομάδα. Δείγματα λήφθηκαν από το αυχενικό λίπος στις 20 εβδομάδες και στη συνέχεια αναλύθηκαν για τα επίπεδα PCBs. Επίσης δείγματα αίματος συλλέχθηκαν στις 20 εβδομάδες. Στις 20 εβδομάδες τα επίπεδα PCBs ήταν 1,7-3,6 mg/kg και 2-3 µg/L στο λίπος και στο αίμα αντίστοιχα. Στις αρχές του 3ου έτους τους, οι πίθηκοι που είχαν εκτεθεί είχαν μειωμένη μέση λανθάνουσα απόκριση και μεταβλητές αυξήσεις στη μέση λανθάνουσα απόκριση σε τρεις μη χωρικές αντιστροφές διάκρισης (non spatial discrimination reversal). Δεν υπήρξε διαφορά στην ακρίβεια κατά τις δοκιμές.

Ο Rice (1997) [104] μελέτησε πιθήκους που εμφάνιζαν μικρότερο μέσο χρόνο απόκρισης σε σύγκριση με αυτούς του ελέγχου. Η αύξηση του χρόνου παύσης για απόδοση συγκεκριμένου διαστήματος εμφανίστηκε πιο αργά σε 48 δοκιμές στους πιθήκους που είχαν λάβει PCBs. Η δόση των 0,0075 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα θεωρήθηκε ως LOAEL για τη συμπεριφορά των πιθήκων. Από την ημέρα 7 έως την ημέρα 18 της κύησης, ο Hany και οι συνεργάτες του (1999) [95] χορήγησαν σε αρουραίους Long-Evans PCB 77 (0,5 και 1,5 mg/kg βάρους σώματος), PCB 47 (1,5 mg/kg βάρους σώματος) και ένα μείγμα (0,5 mg PCB 77/kg βάρους σώματος + 1,0 mg PCB 47/kg βάρους σώματος). Στην ομάδα των PCBs παρατηρήθηκε μία αύξηση της διανυόμενης απόστασης και της μεταγεννητικής διατροφικής συμπεριφοράς την 340η ημέρα.

Έκθεση *in utero* και μέσω θηλασμού οδηγεί σε νευροσυμπεριφορικά ελλείμματα σε απογόνους ποντικίων. Οι Eriksson & Fredriksson (1998) [105] μελέτησαν τα μεταγεννητικά αποτελέσματα της έκθεσης σε δόσεις των 0,23, 0,46 και 4,6 mg/kg βάρους σώματος των PCBs 105 και 126 σε MRI ποντίκια.

Παρατηρήθηκαν διαταραχές στη συμπεριφορά (μάθηση και μνήμη) σε αρσενικά ποντίκια που εκτέθηκαν σε 0,46 mg/kg βάρους σώματος PCB126. Οι νευροχημικές αλλαγές, αν και σε σχετικά υψηλές δόσεις, όπως επίσης και τα νευροσυμπεριφορικά ελλείμματα σε ποντίκια και σε πιθήκους που έλαβαν PCBs παρόμοια με εκείνα που βρέθηκαν στο ανθρώπινο μητρικό γάλα ενισχύουν τα αποτελέσματα παρόμοιων μελετών σε ανθρώπους.

Τα υψηλότερα χλωριωμένα Aroclors έχουν πιο ανοσοκατασταλτική επίδραση σε ποντικούς από εκείνα με τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε χλώριο [106,107]. Πειραματικά αποτελέσματα σε ζώα υποδεικνύουν ότι η έκθεση *in utero* και μέσω θηλασμού οδηγεί σε ανοσολογικές ανωμαλίες, όπως υπανάπτυκτο θύμο αδέν (thymus), κυτταρικές αλλοιώσεις στους λεμφαδένες και υποκυτταροβρίθεια του μυελού των οστών στους απογόνους σε τοξικά επίπεδα δόσης [108,109].

Συνοπτικά, τα PCBs επηρεάζουν αρκετούς στόχους του νευρικού συστήματος που μπορούν να συνδεθούν, και μπορεί να είναι υπεύθυνες για τις παρατηρούμενες αλλαγές συμπεριφοράς των πειραματόζωνων. Αποδείχτηκε ότι τα PCB επηρεάζουν τα επίπεδα της ντοπαμίνης και της σεροτονίνης στον εγκέφαλο. Μεταγενέστερες μελέτες έδειξαν ότι οι μηχανισμοί μεταφοράς των νευροδιαβιβαστών φαίνεται να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι σε PCBs. Επιπλέον, τα PCBs επηρεάζουν σημαντικά τα ενδοκυτταρικά επίπεδα ασβεστίου και επάγουν το σχηματισμό δραστικών ειδών οξειδωτικού, τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*, και έτσι μειώνεται η βιωσιμότητα των κυττάρων. Νευροενδοκρινικές λειτουργίες, ιδιαίτερα το σύστημα των θυρεοειδικών ορμονών, είναι επίσης ευαίσθητες στην παρουσία PCBs. Εξάγεται επομένως το συμπέρασμα ότι τα PCBs είναι ιδιαίτερα τοξικά κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης και ότι οι τοξικές επιδράσεις είναι ένας συνδυασμός πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένης της διαταραχής της ομοιόστασης ασβεστίου, του οξειδωτικού στρες, και η επιρροή επί των νευροδιαβιβαστών μεταφορών [107].

1.10.4 Ανοσοτοξικότητα

Οι ανοσολογικές επιδράσεις των PCBs έχουν αξιολογηθεί σε πειραματόζωα με τον προσδιορισμό του ρυθμού μόλυνσης, με την παρακολούθηση του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων σε σχέση με τη

διέγερση του μιτογόνου και με την αξιολόγηση των μορφολογικών αλλαγών στο θύμο αδένα, στη σπλήνα και στους λεμφαδένες. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι ορισμένες ανοσολογικές παράμετροι όπως η παραγωγή αντισωμάτων σε σχέση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου, είναι κρίσιμες για την αξιολόγηση της επίδρασης των PCBs.

Θηλυκοί πίθηκοι (16 ανά ομάδα) εκτέθηκαν για 55 μήνες σε Aroclor 1254 που περιείχε 5,2 mg PCDFs/kg και μη ανιχνεύσιμα επίπεδα PCDDs σε δόσεις των 0, 0,005, 0,02, 0,04 και 0,08 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα. Τα PCBs χορηγήθηκαν σε κάψουλες ζελατίνης που περιείχαν γλυκερόλη/έλαιο καλαμποκιού. Η αναλογία μεταξύ των ελαίων και των PCBs ήταν 1:1. Στους πίθηκους έγινε ένεση ερυθρών αιμοσφαιρίων προβάτου στους 23 και 55 μήνες έκθεσης. Είχε επιτευχθεί μια φαινομενική φαρμακοκινητική σταθερή κατάσταση στους 23 μήνες με βάση τις συγκεντρώσεις στο αίμα και στο λίπος. Η χορήγηση Aroclor 1254 προκάλεσε σημαντική (όλες τις δόσεις) και δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων των αντισωμάτων (IgG και IgM) σε σχέση με την ανοσοποίηση με τα ερυθρά κύτταρα του αίματος προβάτου. Η χαμηλότερη δόση (0,005 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα) θεωρήθηκε ως LOAEL [110]. Σε ακόλουθη μελέτη [111] διαπιστώθηκε ότι οι ίδιοι πίθηκοι είχαν μειωμένη αναμνησιακή απόκριση ακολουθούμενη από δευτερογενή ανοσοποίηση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου μετά από 55 μήνες. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι το Aroclor 1254 επηρεάζει μόνο το σύστημα των T-λεμφοκυττάρων επειδή οι άλλες ανοσολογικές παράμετροι που παρακολουθήθηκαν δεν επηρεάστηκαν σημαντικά. Δεν υπάρχουν ενδείξεις μικροβιακής λοίμωξης στη διάρκεια της χορήγησης PCBs. Η χορήγηση έως 0,08 mg Aroclor 1254/kg βάρους σώματος ανά ημέρα δεν μεταβάλλει την απόκριση στο αντιγόνο του πνευμονιόκοκκου αν και οι πίθηκοι δεν προσβλήθηκαν με ζωντανά βακτήρια.

Συνοπτικά, οι ανοσολογικές επιδράσεις σε ενήλικα ζώα εξαρτώνται από τη δόση και την ομόλογη σειρά και συμβαίνουν σε όλα τα είδη που εξετάστηκαν σε υψηλές δόσεις και σε ορισμένα είδη, όπως ο πίθηκος, σε χαμηλά επίπεδα δόσης. Τα PCBs προκαλούν μείωση της παραγωγής αντισωμάτων σε σχέση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια προβάτου (εμφανίζεται ως μειωμένη IgG και IgM) και άλλες ανοσολογικές επιδράσεις, όπως η αυξημένη ευαισθησία σε ασθένειες, η μειωμένη αναμνησιακή απόκριση, το μειωμένο βάρος του θύμου

αδένα και η ατροφία του θύμου αδένα. Τα ενήλικα ζώα εμφανίζονται να είναι λιγότερο ευαίσθητα από τα έμβρυα ως προς τις επιπτώσεις των PCBs. Τέλος, πρόσφατη έρευνα αποδεικνύει πως τα PCBs προκαλούν καταστολή του πολλαπλασιασμού των λεμφοκυττάρων στα θαλάσσια θηλαστικά [112].

1.10.5 Νευρολογικές επιδράσεις

Τα PCBs 153 και 128 καθώς και τα Aroclors 1254 και 1260 προκάλεσαν μεταβολές στους νευροδιαβιβαστές και στα επίπεδα των μεταβολιτών τους σε διαφορετικές περιοχές του κεντρικού νευρικού συστήματος αρουραίων. Τα επίπεδα της ντοπαμίνης ήταν επίσης μειωμένα σε διάφορες ανατομικές περιοχές του εγκεφάλου σε πιθήκους που τους χορηγήθηκε Aroclor 1016 [8]. Η έκθεση στο DDT και στους μεταβολίτες του κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης μπορεί να αλλάξει τον τρόπο λειτουργίας του αναπαραγωγικού και νευρικού συστήματος. Αυτό φαίνεται να προκαλείται από την ιδιότητα του DDT και των μεταβολιτών του να μιμούνται τη δράση των φυσικών ορμονών.

1.11 Μηχανισμοί δράσης

Τα PCBs παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα μηχανισμών δράσης που εξαρτώνται από το μοτίβο των υποκαταστάσεων χλωρίου στο μόριο. Η πιο αξιοσημείωτη διαφορά στο μηχανισμό δράσης οφείλεται στην παρουσία ή απουσία ατόμου χλωρίου στις ορθο- (2, 2', 6, 6') θέσεις. Τα PCBs που δεν περιέχουν άτομο χλωρίου σε ορθο- θέση και έχουν δύο γειτονικά σε μετα- και παρα- θέσεις έχουν μεγαλύτερη τάση δέσμευσης με τον υποδοχέα Ah (PCBs 77, 126 και 169). Τόσο ο βιοχημικός όσο και ο τοξικολογικός μηχανισμός δράσης μοιάζουν με αυτούς των χλωριωμένων 2,3,7,8 υποκατεστημένων διοξινών (PCDD) και των διφαινυλοφουρανίων (PCDF) [113]. Με την αύξηση του αριθμού των ορθο- χλωρίων η επίπεδη διαμόρφωση του μορίου γίνεται δυσκολότερη. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη μείωση της τάσης δέσμευσης των ορθο- PCBs με τον υποδοχέα Ah. Σε αυτή την ομάδα ορθο-υποκατεστημένων ομόλογων σειρών, μόνο μερικά μονο-ορθο- υποκατεστημένα PCBs (PCB 105 και 118) εμφανίζουν τάση σύνδεσης με το υποδοχέα Ah η οποία οδηγεί σε τοξικότητα παρόμοια με αυτή των διοξινών και βιοχημικές επιδράσεις [114]. Οι ομόλογες σειρές PCBs που έχουν δύο ή περισσότερα ορθο- άτομα χλωρίου (PCB 153) δεν εμφανίζουν παρόμοια με τις διοξίνες τοξικότητα λόγω της

έλλειψης της σχετικής τάσης δέσμευσης στον υποδοχέα Ah. Παρόλα αυτά, τα πολλαπλά ορθο- υποκατεστημένα PCBs έχουν άλλους μηχανισμούς δράσης, συμπεριλαμβανομένων των επιπτώσεων στην νευρολογική ανάπτυξη, τα επίπεδα της ντοπαμίνης και πρόκλησης καρκίνου τα οποία θα περιγραφούν παρακάτω.

Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα των πολλαπλά ορθο- PCBs εμφανίζονται σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα δόσης από ότι αυτά των διοξινών που συνδέονται με ορισμένα μη- και μονο- ορθο- PCBs που είναι ισχυροί ανταγωνιστές του υποδοχέα Ah. Η περισσότερο ευδιάκριτη διαφορά μεταξύ των διαφόρων ομόλογων σειρών PCBs βρίσκεται στον τρόπο με τον οποίο επάγουν τα ένζυμα του κυτοχρώματος P450. Τα PCBs που έχουν μεγάλη τάση δέσμευσης με τον υποδοχέα Ah, όπως τα μη-ορθο- PCBs, είναι ισχυροί επαγωγείς της ομάδας CYP1, συμπεριλαμβανομένων των CYP1A1, CYP1A2 και CYP1B1. Σε αντίθεση, τα PCBs που έχουν ορθο-μοτίβο υποκατάστασης επάγουν ένζυμα από τις ομάδες CYP2 και CYP3 που μοιάζουν με την επαγωγή από φαινοβαρβιτάλη. Έτσι, τα μονο- ορθο- PCBs λαμβάνουν μια ενδιάμεση θέση, δεδομένου ότι επάγουν ένζυμα τόσο από την CYP1 ομάδα όσο και από τις CYP2 και CYP3, μια ιδιότητα που δεν εμφανίζεται στα δι- ορθο υποκατεστημένα PCBs [38,113,114]. Επιπλέον, η ενεργοποίηση του υποδοχέα Ah οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων και στη μεταγωγή του σήματος, επάγοντας αλλαγές στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση, την αναστολή της αύξησης του βάρους του σώματος και ατροφία του θύμου αδένου. Μια εναλλακτική δράση για το μηχανισμό τοξικότητας του υποδοχέα Ah [115] περιλαμβάνει μια αυξημένη ευαισθησία στην ενδοτοξίνη και μια αυξημένη ευπάθεια σε ένα παράσιτο της ελονοσίας σε ποντικούς που τους χορηγήθηκε Aroclor 1242, γεγονός που υποδηλώνει ότι η ανοσοκατασταλτική δράση προκαλείται από έναν αποκλεισμό των PCBs από τα συστατικά του ήπατος, της σπλήνας και του θύμου του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος.

Οι παρόμοιες με οιστρογόνα ομόλογες σειρές PCBs και οι ενδοκρινικοί διαταράκτες δεσμεύονται στους υποδοχείς οιστρογόνου. Αυτά τα PCBs προκαλούν ενδοκρινικές διαταραχές και επηρεάζουν αρνητικά την αναπαραγωγική απόδοση. Μερικές ομόλογες σειρές PCBs αυξάνουν την ορμόνη απελευθέρωσης γοναδοτροπίνης. Επιπλέον, τα PCBs επηρεάζουν

την παραγωγή και την απελευθέρωση της ωχρινοτρόπου ορμόνης από την υπόφυση με μηχανισμούς που δεν σχετίζονται με την οιστρογονική δράση. Μελέτες σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού [116] υποδεικνύουν ότι ο υποδοχέας Ah είναι σημαντικός στη ρύθμιση της αντιοιστρογονικής απόκρισης.

Ορισμένες μελέτες [117] υποδεικνύουν ότι τα μονο- και δι-ορθο υποκατεστημένα PCBs έχουν έντονες επιπτώσεις στην νευρολογική ανάπτυξη. Αυτή η τοξικότητα ρυθμίζεται από ένα μηχανισμό ανεξάρτητο του υποδοχέα Ah. Ο Schantz και οι συνεργάτες του (1997) [118] πρότειναν ότι οι νευρολογικές επιπτώσεις ρυθμίζονται μερικώς από τη δέσμευση στον υποδοχέα ρυανοδίνης. Η μηχανιστική δράση των PCBs που προκαλούν ηπατοκαρκινογένεση σε τρωκτικά δεν είναι γνωστή αλλά δεν οφείλεται σε γενετοξικότητα [119-124]. Ωστόσο, η αναστολή της ενδοκυτταρικής επικοινωνίας έχει προταθεί ως ένας πιθανός μηχανισμός για την επαγόμενη από PCBs δημιουργία όγκων [125,126]. Ένας άλλος μηχανισμός που αφορά το οξειδωτικό στρες προτάθηκε από το Brunner και τους συνεργάτες του (1996) [80] και το Mayes και οι συνεργάτες του (1998) [79].

1.12 Επίδραση στον άνθρωπο

Η σχέση μεταξύ της έκθεσης σε PCBs και των επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία αντιστακτά τη μεγάλη διακύμανση της έκθεσης του ανθρώπου στις διάφορες ομόλογες σειρές και επιμολύνσεων που υπάρχουν στα PCBs και στα υποπροϊόντα της καύσης τους. Τα στοιχεία υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε PCBs συνδέεται με την αύξηση του καρκίνου στο πεπτικό σύστημα, κυρίως του ήπατος και με το κακοήθες μελάνωμα. Ωστόσο, οι περιορισμοί των πληροφοριών της έκθεσης και η παρουσία, σε ορισμένες περιπτώσεις, περαιτέρω ασαφών αποτελεσμάτων αποκλείει τον πλήρη προσδιορισμό της σχέσης έκθεσης-απόκρισης. Η έκθεση σε PCBs συνδέεται επίσης με την αναπαραγωγική ανικανότητα, όπως οι μειωμένοι συντελεστές ανάπτυξης, η καθυστερημένη ανάπτυξη, με νευρολογικές επιδράσεις, με ανοσολογικές μεταβολές, που εκδηλώνονται ως αυξημένοι ρυθμοί μόλυνσης και αλλαγές στους πληθυσμούς λεμφοκυττάρων, με δερματολογικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων χλωρακμής και διαταραχές της μελάγχρωσης του δέρματος, των νυχιών, καθώς και παραμόρφωση των νυχιών μετά από έκθεση σε πολύ χλωριωμένες ομόλογες σειρές.

1.12.1 Καρκινογένεση

Ο Sinks και οι συνεργάτες του (1992) [127] πραγματοποίησαν μια αναδρομική ανάλυση θνησιμότητας 3588 εργαζομένων που εργάστηκαν για τουλάχιστον 1 ημέρα σε ένα εργοστάσιο παραγωγής πυκνωτών στις ΗΠΑ όπου χρησιμοποιήθηκε Aroclor 1242 από το 1957 έως το 1970 και Aroclor 1016 από το 1971 έως το 1977. Η θνησιμότητα από όλες τις αιτίες (παρατηρήθηκαν 192 έναντι 283,3 αναμενόμενων, SMR = 70, CI = 60-80) και από τον καρκίνο (παρατηρήθηκαν 54 έναντι 63,7 αναμενόμενων, SMR = 80, CI = 60-110) ήταν χαμηλότερη από το αναμενόμενο. Υπήρχε μια στατιστικά σημαντική αύξηση της θνησιμότητας από κακοήθες μελάνωμα του δέρματος (παρατηρήθηκαν 7 έναντι 2 αναμενόμενων, SMR = 350, CI = 140-730). Δεν βρέθηκε σχέση μεταξύ της αύξησης και της λανθάνουσας ή μέσης εκτιμώμενης έκθεσης σε PCBs. Ωστόσο, η ισχύς της σχέσης αυξάνεται με τη διάρκεια της απασχόλησης. Επίσης, παρατηρήθηκε μια μη σημαντική αύξηση της θνησιμότητας από καρκίνους του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος (SMR = 180, CI = 60-420). Υπήρξε συν-έκθεση σε διαλύτες όπως οι 1,1,1-τριχλωροαιθάνιο, τριχλωροαιθυλένιο, τολουόλιο, μεθυλο-αιθυλ-κετόνη και ξυλένιο αλλά η έκθεση σε μέταλλα από τις συγκολλήσεις θεωρήθηκε ελάχιστη. Ο Greenland και οι συνεργάτες του (1994) [128] πραγματοποίησαν μια διερευνητική μελέτη ελέγχου του θανάτου από καρκίνο των εργαζομένων ενός εργοστασίου συναρμολόγησης μετασχηματιστών από το 1969 έως το 1984. Η έκθεση σε πυρανόλη (αποτελείται από 50% χλωριωμένων PCBs, τριχλωροβενζόλιο και ιχνοστοιχείων διβενζοφουρανίων), σε βενζόλιο, σε τριχλωροαιθυλένιο και άλλους διαλύτες, σε υγρά κατεργασίας, σε αμίαντο και σε ρητίνες αξιολογήθηκε σε περισσότερες από 1000 θέσεις εργασίας από 50 διαφορετικές υπηρεσίες σε 100 κτιριακές εγκαταστάσεις. Για την έκθεση σε πυρανόλη, η μεγαλύτερη πιθανότητα καρκίνου παρατηρήθηκε στο ήπαρ και στη χολή (OR = 2,40, CI = 0,59-9,71) και στα λεμφώματα (OR = 3,26, CI = 1,14-9,32).

Ο Kimbrough και οι συνεργάτες του (1999) [129] διεξήγαγαν μια μελέτη θνησιμότητας 7075 εργαζομένων που εκτέθηκαν σε PCBs για τουλάχιστον 90 ημέρες από το 1946 έως το 1977. Οι εργαζόμενοι απασχολούνταν σε δύο εργοστάσια κατασκευής/επισκευής πυκνωτών στις ΗΠΑ. Στο ένα εργοστάσιο εμπλέκονται 2.567 εργαζόμενοι [130,131]. Η έκθεση αφορά κυρίως τα Aroclor 1254 μεταξύ 1946-1954, Aroclor 1242 μεταξύ 1954-1971 και Aroclor 1016

μεταξύ 1971-1977. Οι εκθέσεις σε PCBs χαρακτηρίστηκαν ως υψηλές (227-1500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), χαμηλές (3-50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) και ακαθόριστες, σύμφωνα με τις θέσεις εργασίας, της περιοχής, τις δυνατότητες άμεσης δερματικής επαφής ή εισπνοής και κάποιες μετρήσεις περιοχών. Στη μελέτη διαπιστώθηκαν χαμηλότερα από τα αναμενόμενα ποσοστά θνησιμότητας από όλες τις μορφές καρκίνου και στατιστικά σημαντική αύξηση της θνησιμότητας σε εντερικούς καρκίνους μεταξύ γυναικών ηλικίας μεγαλύτερης των 20 ετών (SMR =189, P <0,05)

Ο Kuratsune και οι συνεργάτες του (1987) [132] πραγματοποίησαν μια αναδρομική μελέτη σε 887 άνδρες και 874 γυναίκες. Σε σύγκριση με τα τοπικά ποσοστά θανάτου, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της θνησιμότητας από καρκίνο του ήπατος στους άνδρες (παρατηρήθηκαν 9 έναντι 2,34 αναμενόμενων, SMR = 385, $p < 0,01$) για τις περιπτώσεις που εμφανίστηκαν σε λιγότερο από 9 χρόνια μετά την κατανάλωση του μολυσμένου ελαίου ρυζιού, μια χαμηλότερη θνησιμότητα παρατηρήθηκε (παρατηρήθηκαν 4 έναντι 1,04 αναμενόμενων, SMR = 385, $p < 0,05$). Αυξημένη θνησιμότητα, αν και όχι στατιστικά σημαντική, παρατηρήθηκε από καρκίνο του ήπατος επίσης σε γυναίκες (παρατηρήθηκαν 2 έναντι 0,79 αναμενόμενων, SMR = 253, $p > 0,05$). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ($p < 0,05$) αυξημένη θνησιμότητα από καρκίνο του στομάχου του οισοφάγου ή από λευχαιμία τόσο στους άνδρες όσο και στις γυναίκες. Ο Hsieh και οι συνεργάτες του (1996) [133] πραγματοποίησαν μια αναδρομική μελέτη της θνησιμότητας (929 άνδρες, 1011 γυναίκες) 12 χρόνια μετά την έκθεση (μεταξύ 1980 και 1991). Η μέση ηλικία των ανθρώπων στην έναρξη της μελέτης ήταν 27 έτη. Στη μελέτη αναφέρθηκε μια σημαντική αύξηση της θνησιμότητας από μη κακοήθεις παθήσεις του ήπατος (SMR = 3,22, CI = 1,8-5,1). Για όλες τις μορφές καρκίνου, παρατηρήθηκε μια μη σημαντική στατιστικά έλλειψη (SMR = 0,8, CI = 0,29-1,04). Η θνησιμότητα από καρκίνο στο ήπαρ ήταν αυξημένη στις γυναίκες (SMR = 1,08, CI = 0,03-6,02) αλλά όχι στους άντρες (SMR = 0,29, CI = 0,01-1,62). Τέλος, πρόσφατες έρευνες συσχετίζουν χωρίς να αποδεικνύουν τη συσχέτιση της έκθεσης σε PCBs με την εμφάνιση καρκίνου του στήθους στις γυναίκες [134,135].

1.12.2 Γενοτοξικότητα

Οι πληροφορίες σχετικά με τη γενοτοξική επίπτωση στον άνθρωπο μετά από έκθεση σε PCBs είναι περιορισμένες. Σε μια μελέτη περιγράφεται μια μέτρια αύξηση στις αλλαγές χρωματιδίων και διάσπαση στο χρωμόσωμα των λεμφοκυττάρων μετά από έκθεση σε PCBs και άλλες ενώσεις σε μια εγκατάσταση παραγωγής ηλεκτρισμού [136]. Σε μια άλλη μελέτη αναφέρθηκε αύξηση σε χρωμοσωμικές εκτροπές και ανταλλαγές χρωματιδίων στα λεμφοκύτταρα στους εργαζόμενους σύνθεσης PCBs. Οι εργαζόμενοι εκτίθονταν επίσης σε βενζόλιο και φορμαλδεΐδη [137].

1.12.3 Αναπαραγωγική τοξικότητα

Ο Emmett και οι συνεργάτες του (1988a,b) [138,139] σε μια μελέτη 55 επισκευαστών μετασχηματισμών (εκτέθηκαν κυρίως σε Aroclor 1260 και λιγότερο σε Aroclor 1242 για 3,75 χρόνια (μέση τιμή) και με ένα ρυθμό 8 ώρες/ημέρα, 5 ημέρες/εβδομάδα) και 56 μη εκτεθειμένων ανθρώπων (ομάδες ελέγχου) αξιολόγησαν τις αναπαραγωγικές και νευρολογικές επιδράσεις. Οι μέσες συγκεντρώσεις PCBs στον αέρα χωρίστηκαν σε τέσσερις περιοχές: 0,0167-0,0240, 0,0032-0,0070, 0,0001-0,0004 και 0,0007- 0,0124 mg/m³. Στη μελέτη δεν διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε PCBs και του αριθμού των σπερματοζωαρίων.

Ο Bush και οι συνεργάτες του (1986) [140] συγκέντρωσαν 170 δείγματα σπέρματος από γόνιμους άνδρες, άνδρες με ιδιοπαθή ολιγοσπερμία ή αζωοσπερμία και άνδρες με εκτομή σπερματικού πόρου που είχαν εκτεθεί σε PCBs. Η μέση ολική συγκέντρωση PCBs στον ορό ήταν 5,8 ng/g υγρού βάρους. Οι συγκεντρώσεις των τριών συνεπίπεδων PCBs (2,2',4,4',5,5'-εξαχλωροδιφαινύλιο, 2,2',3',4,4',5-εξαχλωροδιφαινύλιο και 2,3',4,4',5-πενταχλωροδιφαινύλιο) ήταν αντιστρόφως ανάλογες με το δείκτη κινητικότητας του σπέρματος σε δείγματα με σπέρμα με λιγότερο από 20 εκατομμύρια σπερματοζωάρια ανά χιλιοστόλιτρο. Ο Pines και οι συνεργάτες του (1987) [141] ανέφεραν υψηλότερα επίπεδα τετρα- και πενταχλωροδιφαινύλιο σε υπογόνιμους άνδρες σε σύγκριση με τον πληθυσμό ελέγχου. Το DDE προσδιορίστηκε να είναι ένα δευτερεύον συστατικό σε αυτά τα δείγματα. Εξαιτίας των περιορισμών σε αυτές τις μελέτες, συμπεριλαμβανομένου και του περιορισμένου αριθμού ατόμων, καθώς και της

έκθεσης σε DDT και άλλα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα, οι πιθανές επιδράσεις στην ποσότητα και στην κινητικότητα του σπέρματος δεν μπορούν να αποδοθούν αποκλειστικά στην έκθεση με PCBs.

1.12.4 Ανάπτυξη και εξέλιξη

Οι νευροαναπτυξιακές επιπτώσεις της προγεννητικής έκθεσης σε PCBs έχουν μελετηθεί σε μια διαχρονική μελέτη 242 ζευγών μητέρα-βρέφος, με τις μητέρες να έχουν εκτεθεί σε απροσδιόριστες συγκεντρώσεις PCBs (όπως επίσης σε PCDDs και PCDFs), από τη διατροφή τους σε διάστημα 6 ετών και 71 ζεύγη ελέγχου μητέρα-βρέφος [142,143]. Συλλέχθηκαν δείγματα ορού από τον ομφάλιο λώρο, τη μήτρα και γάλακτος μεταξύ της 1^{ης} και 16^{ης} εβδομάδας μετά τον τοκετό. Η συνολική κατανάλωση τροφής και τα επίπεδα των PCBs στον ορό του ομφάλιου λώρου σχετίστηκαν με χαμηλότερο σωματικό βάρος γέννησης, μικρότερο περίμετρο κεφαλιού, μικρότερη ηλικία κύησης και με νευρομυϊκή ανωριμότητα, με διαταραχή της αυτόνομης λειτουργίας και αυξημένο αριθμό ασυνήθιστα αδύναμων αντανεκλαστικών [144]. Τα επίπεδα PCBs στον ομφάλιο λώρο αποτελεί έναν ισχυρό προγνωστικό παράγοντα της φτωχότερης μέσης οπτικής μνήμης αναγνώρισης [143].

Το 75% των παιδιών της αρχικής μελέτης επανεξετάστηκαν σε ηλικία 4 ετών [145,146]. Η προγεννητική έκθεση σε PCBs, η οποία αξιολογείται από τα επίπεδα των PCBs στον ορό του λώρου, συνδέθηκε με χαμηλότερες επιδόσεις σε δύο συγκεκριμένες εξετάσεις που αφορούν τη βραχυπρόθεσμη μνήμη. Δεν υπήρξε καμία ένδειξη για έλλειψη αντίληψης ή αλλοίωση της μακροχρόνιας μνήμης. Στη ηλικία των 11 ετών παρατηρήθηκαν χαμηλότερες βαθμολογίες IQ. Τα παιδιά που είχαν εκτεθεί παρουσίαζαν τρεις φορές περισσότερες πιθανότητες να έχουν χαμηλό IQ ($p < 0,001$) και δυο φορές περισσότερες πιθανότητες να είναι τουλάχιστον δυο χρόνια πίσω στην κατανόηση γραπτού λόγου ($p = 0,03$) [142].

Ο Winneke και οι συνεργάτες του (1998) [147] ερεύνησαν τη νευροαναπτυξιακή τοξικότητα του συνόλου των PCBs (138, 153 και 180 στον ορό του λώρου και στο μητρικό γάλα) σε 170 υγιή ζεύγη μητέρα-βρέφος. Οι συγκεντρώσεις που βρέθηκαν ήταν 0,52 (0,17-1,36) ng/mL και 389,6 (97-1011,0) ng/g στο λώρο και στο λίπος του γάλακτος αντίστοιχα. Στα βρέφη σε

ηλικία 7 μηνών πραγματοποιήθηκε έλεγχος οπτικής αναγνώρισης μαζί με τον έλεγχο Bayley-Scales στον οποίο καθορίζονται η πνευματική (MDI) και η ψυχοκινητική (PDI) κλίμακα. Η MDI αξιολογεί τη μνήμη, τη μάθηση, την επίλυση προβλημάτων, τη γλώσσα, την προσωπική/κοινωνική ανάπτυξη ενώ η PDI αξιολογεί την κινητική ανάπτυξη των παιδιών. Από τη στατιστική ανάλυση παλινδρόμησης και μετά από προσαρμογή για παράγοντες (η εκπαίδευση της μητέρας, η ποιότητα του σπιτικού περιβάλλοντος, το λεκτικό IQ της μητέρας, η ηλικία της, η διάρκεια και το είδος της τροφής) διαπιστώθηκε σχέση μεταξύ του ΣPCBs στο γάλα και στην κλίμακα MDI.

Ο Stewart και οι συνεργάτες του (2000) [148] εξέτασαν 141 νεογνά των οποίων οι μητέρες κατανάλωσαν PCBs στη διατροφή τους (κατά τη διάρκεια της ζωής τους) και 152 νεογνά των οποίων οι μητέρες δεν είχαν καταναλώσει PCBs. Μετρήθηκαν τα PCBs του αίματος στον ομφάλιο λώρο, τα DDE, το εξαχλωροβενζόλιο, ο μόλυβδος και ο υδράργυρος της τρίχας. Στο αίμα οι συνολικές συγκεντρώσεις PCBs ήταν 0,174, 0,525 και 1,11 ng/g υγρού βάρους για τα τεταρτημόρια δεδομένων 25, 50 και 75, αντίστοιχα. Τα επίπεδα των υψηλά χλωριωμένων PCBs στο αίμα (C17-C19) συσχετίστηκαν σημαντικά με τις συγκεντρώσεις τόσο των υψηλά χλωριωμένων ($p < 0,05$) όσο και του συνόλου ($p < 0,05$) των PCBs στο μητρικό γάλα. Η μειωμένη απόδοση συσχετίστηκε με την κατανάλωση PCBs από τη διατροφή. Επίσης παρατηρήθηκε μια γραμμική σχέση απόκρισης της δόσης μεταξύ της έκθεσης σε υψηλά χλωριωμένα PCBs και τα προβλήματα απόδοσης.

1.12.5 Επιδράσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα

Ο Svensson και οι συνεργάτες του (1994) [149] πραγματοποίησαν μια αναδρομική ανοσολογική μελέτη σε 23 άνδρες (μέση ηλικία 39,4 έτη, εύρος 23-62 έτη) που κατανάλωσαν μεγάλες ποσότητες θαλασσινών και μια ομάδα ελέγχου από 20 άνδρες (μέση ηλικία 45,9 έτη, εύρος 23-69 έτη) οι οποίοι δεν κατανάλωσαν θαλασσινά. Το εύρος της μέσης συγκέντρωσης PCBs στο πλάσμα του αίματος ήταν 0,2-3,6 pg/g για τους καταναλωτές και 0,08-1,7 pg/g για τους μη καταναλωτές. Οι καταναλωτές είχαν μικρότερες αναλογίες και αριθμό φυσικών φονικών κυττάρων στο αίμα από ότι η ομάδα ελέγχου, που φανερώνει μια αρνητική σχέση μεταξύ της εβδομαδιαία πρόσληψης θαλασσινών και των φυσικών φονικών κυττάρων ($R_s = 0,32$, $p = 0,04$). Σε μια

υποομάδα 11 ατόμων διαπιστώθηκε σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των φυσικών φονικών κυττάρων και του μη-ορθο PCB 126 ($R_s = 0,68$, $p = 0,02$) και του μονο-ορθο PCB 118 ($R_s = 0,76$, $p = 0,01$).

1.12.6 Νευρολογικές επιδράσεις

Οι πληροφορίες σχετικά με τις νευρολογικές επιδράσεις σε ενήλικους ανθρώπους μετά από έκθεση σε PCBs είναι περιορισμένες. Εργαζόμενοι που εκτέθηκαν σε PCBs ανέφεραν συμπτώματα όπως πονοκέφαλο, ζάλη, κατάθλιψη και κόπωση [138]. Τα άτομα που κατανάλωσαν θαλασσινά μολυσμένα με PCBs είχαν χαμηλές επιδόσεις στα τεστ που απαιτούσαν γνωστική ικανότητα, ονοματολογία λέξεων, ανάκληση ακουστικών ερεθισμάτων και πολύπλοκων καθηκόντων [150]. Ο περιορισμός αυτής της έρευνας είναι ότι τα μολυσμένα με PCBs θαλασσινά είναι συνήθως μολυσμένα και με βαρέα μέταλλα, παρασιτοκτόνα και άλλες χημικές ουσίες. Υψηλές συγκεντρώσεις των PCB 153, 180 καθώς και των συνολικών PCBs βρέθηκαν στον κερκοφόρο πυρήνα ασθενών με τη νόσο Πάρκινσον σε σχέση με τις ομάδες ελέγχου. Η έκθεση σε PCBs/DDEs μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων θαλασσινών δεν επηρέασε σημαντικά τη μείωση του οπτικού συντονισμού σε άτομα μεταξύ 50 και 90 ετών.

1.13 Εκτίμηση επικινδυνότητας

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της σχέσης μεταξύ δόσης-απόκρισης για την έκθεση σε PCBs, η προσέγγιση των μειγμάτων ήταν αυτή που επιλέχθηκε για τα ανεκτά όρια σε PCBs. Η λήψη αυτής της απόφασης στηρίζεται στο ότι τα αναλυτικά στοιχεία των παραπάνω αναλύσεων είναι διαθέσιμα και ότι τα άτομα έχουν εκτεθεί σε παρόμοια μείγματα Aroclor με αυτά ομάδων του γενικού πληθυσμού. Επίσης ο γενικός πληθυσμός έχει εκτεθεί σε μεγάλο εύρος μειγμάτων PCBs, από τα τρόφιμα, τον αέρα και το νερό λόγω της παγκόσμιας περιβαλλοντικής μεταφοράς και κατανομής. Παρόλο που η σύσταση αυτών των PCBs δεν είναι πανομοιότυπη με αυτή των εμπορικών μειγμάτων, μελέτες αποδεικνύουν συγκρίσιμη τοξικότητα. Μια εναλλακτική προσέγγιση είναι η μέθοδος TEQ, η οποία βασίζεται στην ανάλυση ομόλογων σειρών με γνωστούς ισοδύναμους συντελεστές τοξικότητας (TEF) σε σχέση με τις επιδράσεις στην υγεία που προκαλούνται από τον υποδοχέα Ah. Αυτή η μέθοδος αξιολογεί την

τοξικότητα μιας μεμονωμένης ομόλογης σειράς για ένα συγκεκριμένο τελικό σημείο και εκτιμά το συνδυασμένο αποτέλεσμα για όλη την ομόλογη σειρά [151]. Μια άλλη προσέγγιση είναι η μέθοδος της συνολικής επιβάρυνσης του σώματος στα μίγματα PCBs. Τα δεδομένα προέρχονται από ανθρώπους παρά από πειραματόζωα ή *in vitro* μελέτες [152].

1.13.1 Εκτίμηση κινδύνου και αξιολόγηση δόσης-απόκρισης

Οι μελέτες σε ανθρώπους συσχετίζουν τη έκθεση σε μίγματα PCBs με ανοσολογικές, αναπαραγωγικές και δερματολογικές επιδράσεις όπως επίσης και με τον καρκίνο. Ωστόσο, οι μελέτες σε ανθρώπους περιορίζονται από τα περιορισμένα δεδομένα, την ασυνέπεια μεταξύ μερικών αποτελεσμάτων και την παρουσία παραγόντων που συντελούν σε συναποτελέσματα. Αυτοί οι περιορισμοί καθιστούν αδύνατη τη χρήση τους για την ποσοτική εκτίμηση του κινδύνου. Έτσι για την εκτίμηση του κινδύνου έχει επιλεγεί η χρησιμοποίηση πειραματόζωων. Σε αρκετές μελέτες τα μείγματα των PCBs και κυρίως τα περισσότερο χλωριωμένα, προκαλούν καλοήθεις και κακοήθεις ηπατικούς όγκους σε τρωκτικά. Ο καρκίνος εξαρτάται από τη δόση, το χρόνο και το μείγμα των PCBs. Τα περισσότερο χλωριωμένα PCBs συνήθως εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφικής αλυσίδας, και προκαλούν σοβαρές διαταραχές. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει θέσει ανώτερες επιτρεπτές τιμές για διάφορα τρόφιμα. Οι τιμές αυτές εκφρασμένες σε τιμές WHO-TEQ (ng/kg) δεν ξεπερνούν τα 0,120 ng/kg για κανένα τρόφιμο. Οι λιγότερο χλωριωμένες ενώσεις εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της αναπνοής και της έκθεσης σε PCBs στο χώρο εργασίας ή σε «άρρωστα» κτίρια [153-156].

Όπως ήδη αναφέρθηκε σε προηγούμενες ενότητες, τα στοιχεία από επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η έκθεση σε PCBs σχετίζεται με την αύξηση του κινδύνου καρκίνου στο πεπτικό σύστημα, κυρίως του ήπατος και με το κακοήθες μελάνωμα. Ωστόσο, οι περιορισμοί των πληροφοριών της έκθεσης και η παρουσία, σε ορισμένες περιπτώσεις συναποτελεσμάτων αποκλείει τον προσδιορισμό της σχέσης έκθεσης-απόκρισης. Για παράδειγμα, σε πίθηκους που έλαβαν ημερήσιες δόσεις Aroclor 1254 για αρκετούς μήνες εμφανίστηκε μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση του βάρους του ήπατος και μειώσεις στην απόκριση των IgG και IgM στην πρόκληση από ερυθρά

κύτταρα προβάτου. Η χαμηλότερη δόση που μελετήθηκε 0,005 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, χαρακτηρίστηκε ως LOAEL. Σε άλλη μελέτη αναφέρθηκε η θετική συσχέτιση μεταξύ ορισμένων PCBs και λοιμώξεων του μέσου ωτός όπως επίσης και ανεμοβλογιάς στα πρώτα χρόνια της ζωής. Τέλος, έχει περιγραφεί και η σχέση μεταξύ της προγεννητικής έκθεσης σε PCBs και των αλλαγών στο πληθυσμό των λεμφοκυττάρων.

1.13.2 Κριτήρια για τον καθορισμό της ανεκτής πρόσληψης και συγκεντρώσεων για τα PCBs

Οι μελέτες των Tryphonas et al (1989, 1991) αποτέλεσαν τη βάση για τον καθορισμό του ανεκτού ορίου πρόσληψης PCBs. Στις μελέτες αυτές διαπιστώθηκε η έκθεση πιθήκων σε Aroclor 1254 είχε δυσμενείς επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό τους σύστημα. Οι μελέτες αυτές επιλέχθηκαν με βάση τα εξής: (α) μακροπρόθεσμες μελέτες (5 έτη), (β) σχετικά μεγάλος αριθμός ζώων σε κάθε ομάδα έκθεσης, (γ) ο πίθηκος είναι ένα καλό μοντέλο για τον άνθρωπο και (δ) καλός πειραματικός σχεδιασμός, ανάλυση δεδομένων και στήριξη των συμπερασμάτων.

Πιο αναλυτικά, σε πίθηκους (Rhesus) χορηγήθηκαν ημερήσιες δόσεις Aroclor 1254 για αρκετούς μήνες υποδεικνύοντας μια δόσοεξαρτώμενη αύξηση του βάρους του ήπατος και μειώσεις στην απόκριση της ανοσοσφαιρίνης IgG και IgM σε πρόκληση από ερυθρά κύτταρα προβάτου. Η χαμηλότερη δόση που μελετήθηκε, 0,005 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα, χαρακτηρίστηκε ως LOAEL. Χρησιμοποιώντας ένα συντελεστή αβεβαιότητας 300 προκύπτει ένα ανεκτό όριο των 0,02 μg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα για τα μείγματα των PCBs. Σε μία μελέτη νευροτοξικότητας σε πιθήκους, παρατηρήθηκαν μικρές αλλαγές στη λειτουργία του νευρικού συστήματος στο επίπεδο έκθεσης των 0,0075 mg/kg βάρους σώματος ανά ημέρα. Σε αυτή τη μελέτη, το μείγμα που χορηγήθηκε είχε σχεδιαστεί στο να πλησιάζει τη σύσταση των PCBs του μητρικού γάλακτος. Δεδομένου ότι οι LOAELs από τις δύο μελέτες συγκλίνουν αυξάνεται η εμπιστοσύνη στη δυνατότητα εφαρμογής μιγμάτων για την προσέγγιση στη διατροφική έκθεση, τουλάχιστον για τα βρέφη.

Η μέση τιμή WHO-TEQ εκφρασμένη σε ng / kg νωπού βάρους για κάθε ομάδα τροφίμων εκτιμήθηκε κάθε ομάδα τροφίμων. λαμβάνοντας υπόψη τις

περιεκτικότητες που ανιχνεύτηκαν σε κάθε τρόφιμο και την ποσότητα κατανάλωσης του συγκεκριμένου τροφίμου σε συνδυασμό πάντα με επιδημιολογικές μελέτες. Έτσι, κατά φθίνουσα σειρά οι τιμές WHO-TEQ (ng / kg νωπού προϊόντος) είναι οι εξής: ψάρια και θαλασσινά (0,120), έλαια και λίπη (0,086), γάλα (0,005), γαλακτοκομικά προϊόντα (0,056), αυγά (0,032), προϊόντα αρτοποιίας (0,023), κρέας (0,011), δημητριακά (0,007), όσπρια (0,003), φρούτα (0,003), και λαχανικά (0,002) [153]. Το σύνολο από όλες τις πηγές είναι μεταξύ 1-8 ng/kg βάρους σώματος ανά ημέρα το οποίο είναι περίπου 1.000 φορές χαμηλότερο από το επίπεδο που προκάλεσε δυσμενείς επιδράσεις σε ζώα (5000 ng/kg βάρους σώματος ανά ημέρα) και 4 φορές χαμηλότερο από το ανεκτό επίπεδο πρόσληψης (20 ng/kg βάρους σώματος ανά ημέρα) [145-156].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Ο κύκλος της τρίχας

2.1 Εισαγωγή

Το τρίχωμα, το οποίο κρατά τα περισσότερα θηλαστικά ζεστά, ξηρά και προστατευμένα από τα στοιχεία της φύσης, απαιτεί συνεχή ανανέωση με νέες τρίχες σε ολόκληρη τη διάρκεια ζωής του θηλαστικού. Για την παραγωγή νέων τριχών, οι θύλακες υφίστανται κύκλους ανάπτυξης (anagen), απόπτωσης (catagen) και ανάπαυσης (telogen). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης οι θύλακες παράγουν τον άξονα της τρίχας από την άκρη μέχρι ρίζα, κατά τη διάρκεια της παλινδρόμησης και της ανάπαυσης, οι θύλακες επαναφέρουν και προετοιμάζουν τα βλαστικά τους κύτταρα στη λήψη του σήματος για την έναρξη της επόμενης φάσης ανάπτυξης του άξονα της νέας τρίχας. Ο κύκλος της τρίχας αντιπροσωπεύει ένα αξιοσημείωτο μοντέλο για τη μελέτη της ρύθμισης της ηρεμίας και ενεργοποίησης των βλαστικών κυττάρων, της μετάβασης-ενίσχυσης του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, των επιλογών του κυττάρου, της διαφοροποίησης και της απόπτωσης του επιθηλιακού ιστού. Παρακάτω συνοψίζονται τα σημαντικότερα γεγονότα του κύκλου της τρίχας, όπως παρουσιάζονται σε διάφορες μελέτες. Οι Lavker et al. (2003), Millar (2002) και οι Muller-Rover et al. (2001) αναφέρουν περισσότερα στοιχεία για τον κύκλο της τρίχας [157-159].

2.2 Μορφογέννεση

Στο έμβρυο, το δέρμα αρχίζει ως ενιαία στιβάδα αρχέγονων επιδερμικών κυττάρων. Στη συνέχεια και όσο τα μεσεγχυματικά κύτταρα καταλαμβάνουν το δέρμα για το σχηματισμό της υποκείμενης δερμίδας κολλαγόνου, αρχίζει η μορφογέννεση των θυλάκων των τριχών [160]. Εξειδικευμένα δερμικά κύτταρα οργανώνονται σε μικρά συμπλέγματα κάτω από την επιδερμική στιβάδα, διεγείροντας τα υπερκείμενα επιθηλία βλαστικά κύτταρα να αναπτυχθούν προς τα κάτω και να δημιουργήσουν το θύλακα της τρίχας. Ο θύλακας συνορεύει με το επιθήλιο, και τα δύο διαχωρίζονται από τη δερμίδα με μια μεμβράνη πλούσια σε εξωκυτταρική μήτρα και παράγοντες ανάπτυξης που έχουν δημιουργηθεί και εναποτεθεί, στο μεγαλύτερο βαθμό, από τα επιθηλιακά κύτταρα. Δεδομένου ότι ο θύλακας μεγαλώνει προς τα

2.3 Ανάπτυξη

Ιστολογικά, οι θύλακες στην ανάπτυξη έχουν μεγάλο μήκος και σχηματίζουν γωνία επιτρέποντας το τρίχωμα να είναι επίπεδο κατά μήκος της επιφάνειας του σώματος. Η μήτρα των πολλαπλασιαστικών κυττάρων έχει διάρκεια ζωής περίπου 18 ώρες [157]. Τα θυγατρικά κύτταρα κινούνται προς τα πάνω, υιοθετώντας μία από τις έξι σειρές των IRS και HS. Από έξω προς τα μέσα οι στιβάδες αποτελούνται από τις στιβάδες Henley, Huxley και την επιδερμική στιβάδα της IRS καθώς και από την επιδερμική στιβάδα, το φλοιό και τον μυελό του HS. Όσο τα κύτταρα του HS διαφοροποιούνται, εξωθούν τα οργανίδια τους και συμπιέζονται με δέσμες νημάτων 10 nm, που έχουν δημιουργηθεί από την πλούσια σε κυστεΐνη κερατίνη τριχών, δίνοντας στον άξονα της τρίχας υψηλή αντοχή στον εφελκυσμό και ευλυγισία. Επίσης η κερατινοποίηση της IRS ενισχύει και οδηγεί τον άξονα της τρίχας κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διαφοροποίησης του, αλλά τα νεκρά του κύτταρα εκφυλίζονται καθώς φθάνουν στους ανώτερους θύλακες, απελευθερώνοντας έτσι τον HS που συνεχίζει μέσα από την επιφάνεια του δέρματος. Η διάρκεια της ανάπτυξης καθορίζει το μήκος των τριχών και εξαρτάται από το συνεχή πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση της μήτρας των κυττάρων στη βάση του θύλακα.

2.4 Μετάβαση από την ανάπτυξη στην αποτύπωση

Τα κύτταρα της μήτρας αναφέρονται ως κύτταρα ενίσχυσης-μετάβασης, επειδή υποβάλλονται σε έναν περιορισμένο αριθμό κυτταρικών διαιρέσεων πριν διαφοροποιηθούν. Όσο μειώνεται η παροχή των κυττάρων μήτρας, ο HS και η IRS διαφοροποιούνται αργά και ο θύλακας εισέρχεται σε μια καταστροφική φάση που ονομάζεται απόπτωση. Η χρονική στιγμή της έναρξης της πρώτης απόπτωσης διαφέρει ελαφρώς μεταξύ των ειδών των ποντικών και διαφέρει σημαντικά από τη μια περιοχή του δέρματος στην άλλη. Σε χρωματισμένα ποντίκια, η εξέλιξη της απόπτωσης γίνεται αντιληπτή από το χρώμα του δέρματος, το οποίο αλλάζει από το σκούρο γκρι προς μαύρο του σταδίου της ανάπτυξης στο απαλό ροζ του σταδίου της ανάπαυσης. Όπως και με τη μορφογένεση, η πρώτη απόπτωση αρχίζει σαν ένα κύμα, εξαπλώνεται από την κορυφή του κεφαλιού προς την ουρά και πλαγίως κάτω από τα πλευρά του ζώου. Η έναρξη της πρώτης απόπτωσης κυμαίνεται από P14 στο πάνω μέρος της πλάτης κοντά στο κεφάλι έως P18

στο κάτω μέρος της πλάτης κοντά στην ουρά. Η απόπτωση διαρκεί 3-4 ημέρες στα ποντίκια.

Έχουν εντοπιστεί μερικοί μοριακοί ρυθμιστές της μετάβασης από την ανάπτυξη στην απόπτωση παρόλο που η από κοινή τους λειτουργία για τη συμβολή τους στην απόπτωση ή στον τερματισμό της ανάπτυξης δεν είναι ακόμα κατανοητή. Μόρια που προωθούν τη μετάβαση στην απόπτωση περιλαμβάνουν τους παράγοντες ανάπτυξης FGF5 και EGF, νευροτροφίνες όπως τη BDNF και ενδεχομένως τον υποδοχέα νευροτροφίνης $\rho 75$, $\rho 53$ και τα μέλη της ομάδας TGF β , TGF $\beta 1$ και BMPRIa [159,162-165]. Παράγοντες που συντελούν στη διατήρηση της ανάπτυξης περιλαμβάνουν τους SGK3 και Msx2 [167,168].

2.5 Απόπτωση

Η απόπτωση είναι η δυναμική μετάβαση μεταξύ της ανάπτυξης και της ανάπαυσης [159]. Κατά τη διάρκεια της απόπτωσης, το χαμηλότερο τμήμα κάθε θύλακα τρίχας υποχωρεί εξ ολοκλήρου σε μια διαδικασία που περιλαμβάνει την απόπτωση των επιθηλιακών κυττάρων στο βολβό και την εξωτερική θήκη της ρίζας (ORS), την εξωτερική στιβάδα επιθηλίου [169]. Σταματάει η διαφοροποίηση του HS και το κάτω μέρος του άξονα κλείνει σε μια στρογγυλεμένη δομή που ονομάζεται «club», η οποία κινείται προς τα πάνω μέχρι να φτάσει στον άνω θύλακα, όπου παραμένει κατά τη διάρκεια της ανάπαυσης. Καθώς οι χαμηλότεροι θύλακες υποχωρούν, σχηματίζεται μια προσωρινή δομή, ο επιθηλιακός κλώνος, ο οποίος είναι μοναδικός κατά τη διάρκεια της απόπτωσης. Αυτό συνδέει το DP με το άνω μέρος του θύλακα της τρίχας, περιέχει πολλά κύτταρα απόπτωσης και αποβάλλεται εντελώς από τη στιγμή που το DP φτάνει τα κύτταρα που περιβάλλουν το υπόλοιπο club των τριχών.

2.6 Ανάπαυση

Μετά την απόπτωση, οι θύλακες παραμένουν αδρανείς. Στα ποντίκια, η πρώτη ανάπαυση είναι σύντομη, διαρκεί μόνο 1 ή 2 ημέρες, από περίπου P19 σε P21 στη μέση πλάτη. Ωστόσο, η δεύτερη ανάπαυση διαρκεί περισσότερο από 2 εβδομάδες, αρχίζοντας γύρω στο P42.

Παρά το γεγονός ότι δε δημιουργούνται νέοι θύλακες τριχών μετά τη γέννηση, το κατώτερο τμήμα του θύλακα της τρίχας αναγεννάται με σκοπό την

παραγωγή νέων τριχών. Για το σκοπό αυτό, καθώς και για τη διατήρηση της επιδερμίδας και των σμηγματογόνων αδένων, δεξαμενές πολυδύναμων επιθηλιακών βλαστικών κυττάρων τίθενται στην άκρη κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αυτά τα πολύτιμα κύτταρα βρίσκονται στο χαμηλότερο μόνιμο τμήμα του θύλακα της τρίχας, τη διόγκωση [171,172]. Τα βλαστικά κύτταρα των θυλάκων ενεργοποιούνται κατά τη μετάβαση από την ανάπαυση στην ανάπτυξη για να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος ανάπτυξης της τρίχας.

2.7 Μετάβαση από την ανάπαυση στην ανάπτυξη

Η μετάβαση από την ανάπαυση στην ανάπτυξη συμβαίνει όταν ένα ή δύο αδρανή βλαστικά κύτταρα στη βάση του θύλακα, κοντά στο DP, ενεργοποιούνται για να παράγουν έναν νέο άξονα τρίχας [172,173]. Τα κύτταρα αυτά αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται ταχύτατα και γίνονται τα θυγατρικά κύτταρα της ενίσχυσης-μετάβασης που θα αποτελέσουν το νέο θύλακα της τρίχας. Ο νέος θύλακας σχηματίζεται γειτονικά της παλαιάς θέσης που φιλοξενούσε τις τρίχες και τελικά θα ρίξει (exogen). Αυτό δημιουργεί τη διόγκωση και προσθέτει μια στιβάδα στη δεξαμενή των βλαστικών κυττάρων. Οι νέες τρίχες αναδύονται από την ίδια οπή προς τα πάνω όπως οι παλαιές τρίχες. Με πολλούς τρόπους, η μετάβαση από την ανάπαυση στην ανάπτυξη μοιάζει με την ενεργοποίηση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων του δέρματος που διεγείρονται για να κάνουν το θύλακα *de novo*. Με τη σήμανση ως Wnts [174-178] και ως Shh [179-181] είναι απαραίτητα για την νέα ανάπτυξη, ενώ ως Bmps [182,183] εμπλέκονται στη διαφοροποίηση του θύλακα. Τα μοριακά βήματα που εμπλέκονται είναι πιθανό να παρέχουν στοιχεία για την κατανόηση της ενεργοποίησης και των χαρακτηριστικών των βλαστικών κυττάρων.

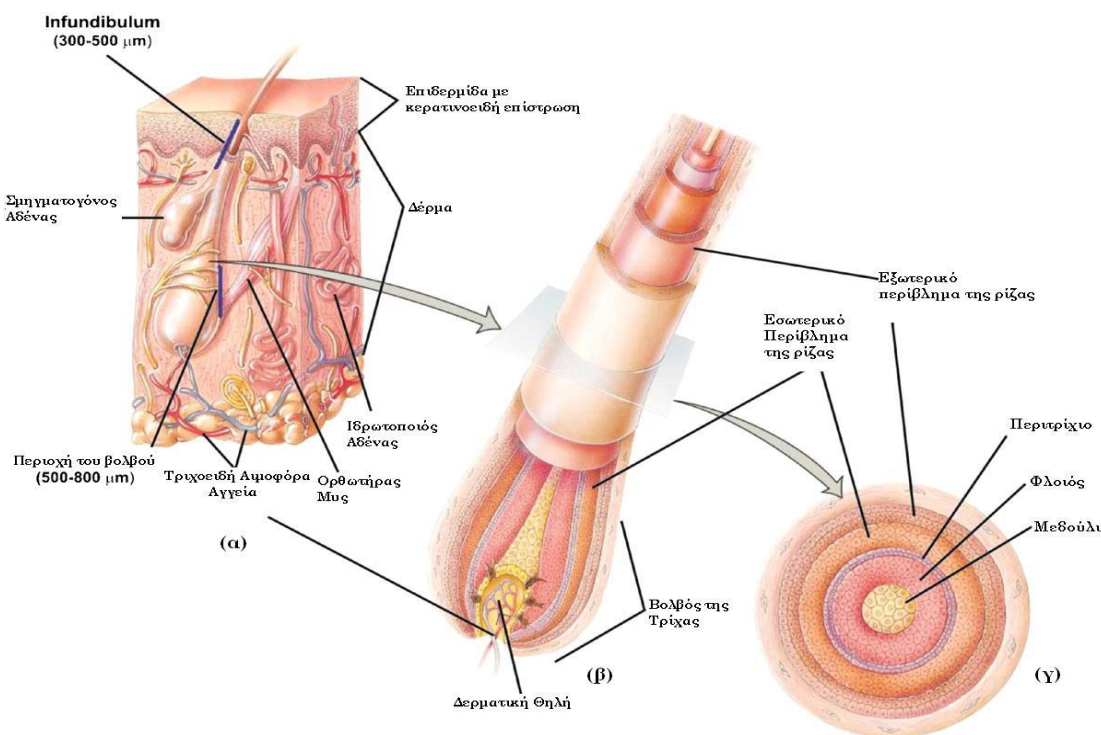
2.8 Η χρήση της τρίχας ως δείκτη ανθρώπινης έκθεσης σε ρύπους

Η τρίχα αποτελεί πλέον βασική βιολογική μήτρα για τοξικολογική ανάλυση και θεωρείται πλέον ισάξια με άλλα βιολογικά δείγματα όπως το αίμα ή τα ούρα. Η τρίχα σήμερα έχει πράγματι γίνει μια φυσική μήτρα σε πολλούς τομείς της επιστήμης, όπως η ιατροδικαστική, η κλινική και η περιβαλλοντική ανάλυση για προσδιορισμό ιατρικών φαρμάκων, ναρκωτικών αλλά και για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου σε περιβαλλοντικούς ρύπους. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον στην ανάλυση τρίχας εξηγείται από τα πολλά πλεονεκτήματα που συνδέονται με αυτή τη μήτρα, όπως η ευκολία της

δειγματοληψίας και της αποθήκευσης καθώς δεν απαιτούνται ιδιαίτερες προκατεργασίες ή προσαρμοσμένες συνθήκες. Η τρίχα, επίσης, αποτελεί αποθήκη χημικών ουσιών καθώς αποτελεί και βασική οδό απομάκρυνσης ανεπιθύμητων ουσιών από τον οργανισμό, όπως η απόδειξη ναρκωτικά εγκληματικότητα διευκολύνεται ή εκτίμηση Η σταθερότητα τόσο της ίδιας της μήτρας όσο και των ενώσεων που περιέχονται σ' αυτή, την καθιστά ως ιδιαίτερα χρήσιμο δείγμα προς μελέτη ακόμα και μετά το θάνατο ενός οργανισμού [184].

2.9 Μηχανισμός ενσωμάτωσης των ξενοβιοτικών στην τρίχα

Αν και η ανατομία, η φυσιολογία, οι φυσικές και χημικές ιδιότητες της τρίχας έχουν περιγραφεί αναλυτικά αυτή παραμένει μία αινιγματική δομή μέχρι σήμερα [185-190]. Η τρίχα είναι το κύριο συστατικό του θύλακα της τρίχας. Είναι ένας μακρύς λεπτός κύλινδρος από κερατινοποιημένα κύτταρα και συνήθως αποτελείται από τα εξής διαφορετικά και διακριτά κυτταρικά τμήματα: (α) το μυελό (μεδούλι ή πυρήνας, medulla) που βρίσκεται κατά μήκος του κεντρικού άξονα, (β) το κύριο μέρος, τον φλοιό (cortex) και (γ) το περιτρίχιο (cuticle) ή πυρήνας το οποίο αποτελεί το εξωτερικό περίβλημα. Η γενική κυτταρική διάταξη μίας ώριμης τρίχας παρουσιάζεται στο σχήμα 2.2.



Σχήμα 2.2: (α) Δομή του Δέρματος . (β) Δομή του θύλακα της τρίχας . (γ) Τομή της τρίχας [191].

Το μεδούλι σχηματίζεται σαν μία στήλη κυττάρων που παράγει πρωτεΐνες που είναι διαφορετικές από τις πρωτεΐνες του περιτρίχιου και του φλοιού, γιατί περιέχουν επιπλέον το αμινοξύ κιτροουλίνη [192,193]. Στο στάδιο του σχηματισμού του, τα κύτταρα συσσωρεύονται με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε το μεδούλι να εμφανίζεται σαν ένα δίκτυο με κυτταρικές συνδέσεις με διαστήματα και κενά, τα οποία είναι γεμάτα με αέρα [193,194]. Το μεδούλι δεν συναντάται σε όλες τις ανθρώπινες τρίχες. Ιδιαίτερα αν η τρίχα είναι πολύ λεπτή είναι πολύ πιθανό να μην έχει μεδούλι. Όταν υπάρχει μεδούλι η εμφάνισή του μπορεί να χαρακτηριστεί σαν ακανόνιστη σφαίρα. Στην ανθρώπινη τρίχα το μεδούλι μπορεί να είναι συνεχούς μορφής κατά μήκος της τρίχας (εκτός της κορυφής και της ρίζας) ή ασυνεχούς μορφής [195,196].

Ο φλοιός αποτελείται από κύτταρα τα οποία σχηματίζουν ένα ατρακτοειδές σχήμα, που έχει μήκος 80-100 μm και 5-10 μm πλάτος, στο πιο πλατύ σημείο του. Τα κύτταρα του φλοιού είναι ευθυγραμμισμένα παράλληλα στον άξονα του θύλακα της τρίχας, παρουσιάζουν διαπλεκόμενη διαμόρφωση και είναι τοποθετημένα το ένα επάνω στο άλλο, χωρίς να μεσολαβούν κενά διαστήματα. Είναι στερεά επικολλημένα μεταξύ τους με ενδοκυτταρικές επαφές που αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως ενδοκυτταρικά συμπλέγματα μεμβράνης ή συμπλέγματα κυτταρικής μεμβράνης (cell membrane complex) [197].

Η δύναμη εφελκυσμού της τρίχας εξαρτάται εν μέρει από αυτές τις επαφές. Σε μια πλήρως σχηματισμένη τρίχα, τα κύτταρα του φλοιού περιέχουν μερικά εναπομείναντα σωματίδια από τον πυρήνα και ορισμένους χρωστικούς κόκκους αλλά είναι κυρίως πληρωμένη με κερατινοειδή μακροϊνίδια διαμέτρου 0,1 έως 0,2 μm.

Τα μακροϊνίδια είναι τοποθετημένα κατά μήκος των κυττάρων του φλοιού και κατά συνέπεια είναι παράλληλα στον άξονα της τρίχας. Κάθε μακροϊνίδιο αποτελείται από κερατινοειδή μικροϊνίδια που αποκαλούνται με τον αγγλικό όρο Keratin Intermediated Filaments ή IF. Τα μικροϊνίδια αυτά είναι ενσωματωμένα σε μια μήτρα από πρωτεΐνες πλούσιες σε θείο (sulfur rich proteins) οι οποίες στη βιβλιογραφία καλούνται με τον αγγλικό όρο Keratin-associated proteins ή με το αγγλικό ακρωνύμιο KAP.

Οι πρωτεΐνες των μικροϊνιδίων (keratin IF) και οι πρωτεΐνες της μήτρας (KAP) στον φλοιό δεν είναι μοναδικής σύστασης πρωτεΐνες αλλά είναι μίγμα κερατινοειδών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες αυτές χαρακτηρίζονται από μια

υψηλή περιεκτικότητα θείου συγκρινόμενες με πολλές άλλες πρωτεΐνες. Στη φυσική μορφή της η τρίχα είναι αδιάλυτη στο νερό γιατί είναι πολυάριθμη η παρουσία δισουλφιδικών δεσμών μεταξύ γειτονικών κυστεϊνών στην πρωτεϊνική αλυσίδα. Η αδιαλυτότητα στο νερό της τρίχας είναι και η μεγαλύτερη δυσκολία στη μελέτη των κερατινοειδών πρωτεϊνών. Η διάλυση της τρίχας απαιτεί το σπάσιμο των δισουλφιδικών δεσμών. Αυτό συνήθως πραγματοποιείται με την αναγωγή των δεσμών στα υπολείμματα κυστεϊνης με διάλυμα μερκαπταναιθανόλης σε ουρία 8 M, και στη συνέχεια με αλκυλίωση των υπολειμμάτων κυστεϊνης με ιοδιοξικό, έτσι ώστε να σχηματιστεί s-καρβοξυλμεθυλκυστεϊνη για να αποφύγουμε να επανασχηματιστεί ο δισουλφιδικός δεσμός. Αν και η μεγαλύτερη γνώση που έχουμε για την κερατίνη της τρίχας προέρχεται από μελέτες σε τρίχα, σημαντική μελέτη έχει γίνει και στην ανθρώπινη τρίχα όπου είναι φανερό ότι υπάρχουν πολλές ομοιότητες μεταξύ της ανθρώπινης τρίχας και του μαλλιού από ζώα [198-200].

Η πλούσια μήτρα των πρωτεϊνών (KAP) είναι άμορφη και περιλαμβάνει το 40 τοις εκατό των πρωτεϊνών του κυττάρου. Αναφέρονται στη βιβλιογραφία ως “πρωτεΐνες υψηλής περιεκτικότητας σε θείο” με τον αγγλικό όρο “high sulfur” (HS) proteins. Τα επτά πρωτεϊνικά κλάσματα που έχουν εντοπιστεί στην τρίχα έχουν μοριακό βάρος από 26.500-43.000 [198]. Υπάρχουν δύο κατηγορίες (classes) ή τύποι (types) IF πρωτεϊνών (τύπος I και τύπος II) γνωστές ως πρωτεΐνες χαμηλής περιεκτικότητας, και αποκαλούνται με τον αγγλικό όρο LS proteins. Οκτώ συστατικά έχουν εντοπιστεί [199] που έχουν μοριακό βάρος με εύρος από 55.500-76.000 [198]. Πρόκειται για ινώδεις πρωτεΐνες που έχουν 50% α-ελικοειδή σύσταση [201]. Ο τύπος I των πρωτεϊνών είναι όξινος ενώ ο τύπος II είναι ουδέτερος-βασικός [202].

Ο φλοιός καλύπτεται μ' ένα απλό στρώμα διαφανών κυττάρων, που έχουν μορφή σαν τα λέπια, το περιτρίχιο. Αυτά τα λέπια καλύπτονται σαν «τα κεραμίδια της σκεπής». Το σκληρό περιτρίχιο προστατεύει τον πιο ευπαθή φλοιό και τον μυελό. Χωρίς το στρώμα του περιτρίχιου ο φλοιός θα ήταν ευπαθής και θα καταστρεφόταν. Το περιτρίχιο δρα επίσης σαν ασπίδα στις χημικές ουσίες. Αυτή η ασπίδα δεν είναι αδιαπέραστη. Πολλοί παράγοντες όπως το pH και θερμοκρασία χαλαρώνουν αυτό το φράγμα. Επειδή αυτό το στρώμα είναι διαφανές, το χρώμα της τρίχας καθορίζεται από τη χρωστική του φλοιού.

Η τρίχα πηγάζει από τον θύλακα της τρίχας ο οποίος βρίσκεται 3-5 mm κάτω από την επιφάνεια του δέρματος. Ο θύλακας της τρίχας περιβάλλεται από ένα πολυάριθμο τριχοειδές σύστημα που τροφοδοτεί την αναπτυσσόμενη τρίχα με το απαραίτητο μεταβολικό υλικό. Το βλαστικό κέντρο που περιβάλλει το βολβό της θηλής της τρίχας αποτελείται από μητρικά κύτταρα (κερατινοκύτταρα και μελανοκύτταρα) τα οποία βρίσκονται στην μεμβράνη της βάσης. Αυτή η διαμόρφωση δημιουργεί τα στελέχη της τρίχας, στα οποία περιλαμβάνονται, ο μυελός, ο φλοιός και το περιτρίχιο. Ο κύκλος ανάπτυξης της τρίχας είναι ένας από τους πιο γρήγορους σε σχέση με τους υπόλοιπους ανθρώπινους ιστούς. Είναι αξιοσημείωτο ότι στην τρίχα η ανάπτυξη των κυττάρων διαδραματίζεται διαφορετικά στο περιτρίχιο και στο φλοιό. Τα κύτταρα του φλοιού μεταβάλλουν το σφαιρικό τους σχήμα στο βλαστικό στάδιο σε ατρακτοειδές. Στο στάδιο αυτό δημιουργούνται τα ινίδια των πρωτεϊνών που πληρώνουν το κύτταρο και ενσωματώνονται σε αυτό. Στο στάδιο της σκλήρυνσης, του σχηματισμού των δισουλφιδικών δεσμών, της αναρρόφησης και της επανυδάτωσης όλα τα κυτοπλασμικά οργανίδια εξαφανίζονται μαζί με τα υπολείμματα από τα κύτταρα που συνδυάζονται με τις κυτταρικές μεμβράνες.

Τα κύτταρα του περιτρίχιου πηγάζουν από τα μητρικά κύτταρα της εξωτερικής σφαίρας της θηλής. Αυτά τα κύτταρα σχηματίζουν μία ομοιογενή δομή και περιέχουν άμορφη πρωτεΐνη. Το σύμπλεγμα της κυτταρικής μεμβράνης αποτελείται από πρωτεΐνες και συμπλέγματα λιπιδίων-πρωτεϊνών που προέρχονται από προηγούμενες κυτταρικές μεμβράνες. Αυτό το μέρος της τρίχας είναι το πιο ευάλωτο σε χημικές και μηχανικές επιρροές και αποτελεί το κύριο σημείο διάχυσης για την ενσωμάτωση και την αποβολή των ξενοβιοτικών. Όπως θα ήταν αναμενόμενο τα ξενοβιοτικά πορεύονται με προτίμηση για αποθήκευση στο σύμπλεγμα της κυτταρικής μεμβράνης.

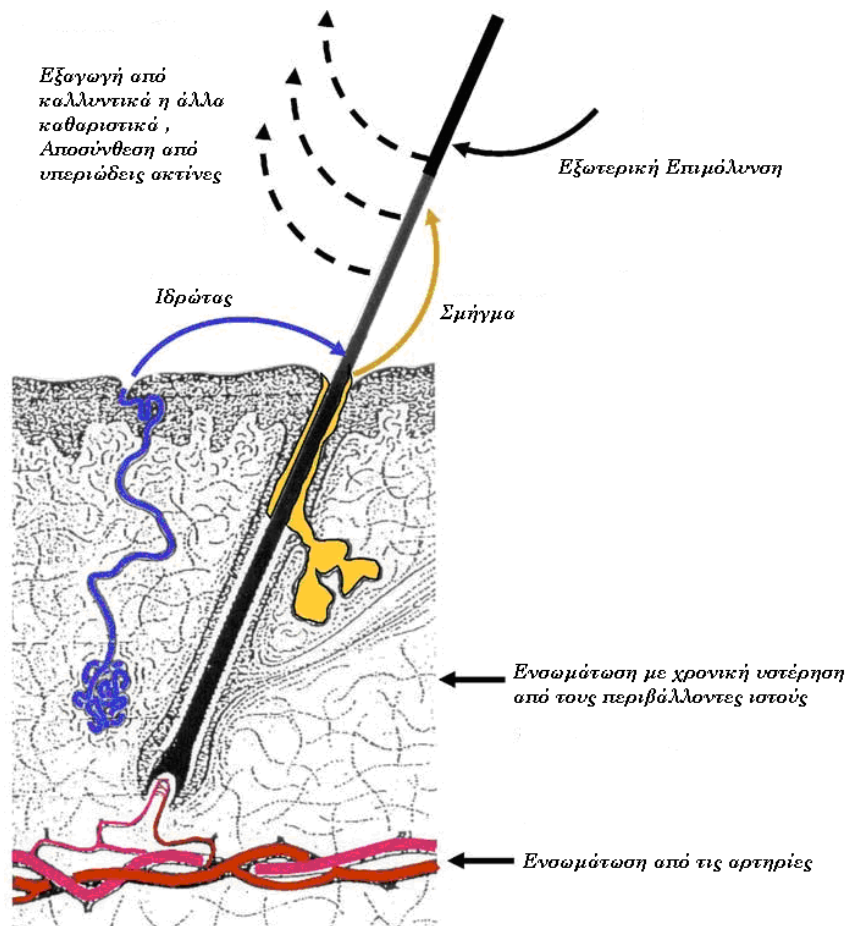
Το χρώμα της τρίχας παράγεται από τα μελανοκύτταρα που βρίσκονται στο βασικό στρώμα σε επαφή με την μεμβράνη της βάσης. Τα μελανοκύτταρα παράγουν χρωστικές μελανίνης στα μελανοσώματα. Τα μελανοκύτταρα και ο χρωματισμός που παράγουν διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην ενσωμάτωση των βασικών ξενοβιοτικών και φαρμάκων στην τρίχα.

Κάθε τρίχα βρίσκεται σε στάδιο ανόρθωσης με τη συμβολή του ορθωτήρα μύ. Σε κάθε τρίχα αντιστοιχεί ένας σημηματογόνος αδένας με ένα αγωγό που οδηγεί στο επάνω μέρος της ρίζας για να διασφαλίσει ότι η ώριμη

τρίχα θα λουστεί με σμήγμα δύο με τρεις ημέρες πριν να φτάσει στη επιφάνεια του δέρματος. Οι εκκρίσεις του ιδρωτοποιού αδένου βρίσκονται κοντά αλλά διακριτά διαχωρισμένες από τη ρίζα της τρίχας. Ο ιδρωτοποιός αδένος υγραίνει το στέλεχος της τρίχας και διευκολύνει την ενσωμάτωση των υδρόφιλων ξενοβιοτικών.

Ένα σημαντικό σημείο ενδιαφέροντος και μελέτης στη διαδικασία της εκτίμησης της έκθεσης του πληθυσμού μέσω των αναλύσεων στην τρίχα είναι ο μηχανισμός ενσωμάτωσης των ξενοβιοτικών σε αυτή. Από τη μελέτη της βιβλιογραφίας προκύπτει ότι ο ακριβής μηχανισμός της ενσωμάτωσης των ξενοβιοτικών στην τρίχα παραμένει ασαφής και χρήζει πρόσθετης μελέτης. Οι υπάρχουσες μελέτες αφορούν σε φάρμακα και ναρκωτικά των οποίων η χημική δομή και η συμπεριφορά είναι παρόμοια με αυτή των επιμολυντών.

Τα μοντέλα που έχουν μελετηθεί εισηγούνται ότι οι ξενοβιοτικές ενώσεις διεισδύουν στην τρίχα μέσω παθητικής διάχυσης από τα τριχοειδή αγγεία στα αναπτυσσόμενα κύτταρα της τρίχας σε ένα μήκος από 1,2 mm έως 1,5 mm μεταξύ του επιπέδου των κυττάρων και της κερατινοειδούς ζώνης του θύλακα της τρίχας. Η περίοδος αυτή αντιστοιχεί σε ένα χρονικό διάστημα τριών ημερών. Πολλά επιστημονικά δεδομένα όμως, δείχνουν ότι τα χημικά εισέρχονται στην τρίχα με διαφορετικούς μηχανισμούς από διαφορετικούς τύπους.



Σχήμα 2.3: Ενσωμάτωση και αποβολή των ξενοβιοτικών στην τρίχα.

Παράλληλα με την ενσωμάτωση από το αίμα μέσω των τριχοειδών αγγείων, οι χημικές ενώσεις μπορούν να διεισδύσουν, με μικρή καθυστέρηση από διάφορα μέρη του δέρματος στο στάδιο του σχηματισμού του θύλακα της τρίχας. Ο πιο σημαντικός εναλλακτικός μηχανισμός, προέρχεται από εναπόθεση μέσω παθητικής διάχυσης από τις εκκρίσεις του ιδρώτα ή του σμήγματος στο σχηματισμένο θύλακα της τρίχας. Πρόσθετα, χημικές ενώσεις μπορούν να διεισδύσουν στην τρίχα από το εξωτερικό περιβάλλον σύμφωνα με το πολυδιαμερισματικό μοντέλο το οποίο μελέτησε ο Henderson (1996) [203].

Είναι πολύ σημαντικό να επισημάνουμε ότι η φύση των ουσιών που ενσωματώνονται στην τρίχα (δομή, χημικές ιδιότητες) όπως και τα ατομικά φυσικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά του κάθε οργανισμού επηρεάζουν ισχυρά τον πιθανό επικρατέστερο μηχανισμό.

Εξετάζοντας τον μηχανισμό με βάση τα δομικά συστατικά η ενσωμάτωση των ξενοβιοτικών επηρεάζεται από την ποσοτική περιεκτικότητα της μελανίνης στον θύλακα της τρίχας και από τη λιποφιλία ή τη βασικότητα

των χημικών ουσιών. Ανεξάρτητα από την διαδρομή έκθεσης, με την ίδια συγκέντρωση φαρμάκου στο αίμα, η συγκέντρωση των βασικών φαρμάκων σε χρωματισμένες τρίχες ήταν έως και 10 φορές μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε σε μη χρωματισμένες τρίχες [204-206].

Σε ανάλογες μελέτες, παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε συγκρίσεις μαύρων, καφέ, ξανθών και κόκκινων τριχών [207], όπως επίσης σε Καυκάσιους και μη Καυκάσιους [208]. Τα αποτελέσματα που σχετίζονται με την συγκέντρωση της μελανίνης [209,210] επιβεβαιώθηκαν και από πολλές μελέτες με πειραματόζωα [211] ή με πειράματα *in vitro* [212,213]. Σε αντίθεση, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές όταν ενσωματώθηκαν ουδέτερα μόρια σε χρωματισμένες και μη χρωματισμένες τρίχες [206].

Οι λιπόφιλες οργανικές ενώσεις μπορούν εύκολα να διεισδύουν στις μεμβράνες και να διαχέονται ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους στα κύτταρα της τρίχας. Οι μεμβράνες των υδρόφιλων μορίων ή των οργανικών ιόντων με μέσο μοριακό βάρος, σχηματίζουν ένα αδιαπέραστο φράγμα. Τα βασικά ή τα όξινα φάρμακα ιονίζονται σε μεγάλο βαθμό σε φυσιολογικό pH και καταλήγουν στα κύτταρα της τρίχας μετά από αποπρωτονίωση ή πρωτονίωση αντίστοιχα, σε ουδέτερη μορφή. Κατά συνέπεια η σταθερά ιοντισμού pK_a μίας ένωσης και το αντίστοιχο pH των κυττάρων είναι πολύ σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν τον μηχανισμό ενσωμάτωσης. Το ενδοκυτταρικό pH, των κερατινοειδών κυττάρων υπολογίστηκε πιο όξινο από αυτό του πλάσματος ενώ το pH των μελανοκυττάρων μετρήθηκε μεταξύ 3 και 5 [212]. Τέλος, μία σημαντική έλξη της μελανίνης για τα βασικά φάρμακα πιστοποιήθηκε με πειράματα *in vitro* [212,213]. Όταν παρουσιάζονται και τα δύο φαινόμενα, χαμηλό pH και δέσμευση με μελανίνη, οδηγούμαστε σε αυξημένη συγκέντρωση λιπόφιλων και βασικών φαρμάκων στα κύτταρα της τρίχας με προτεραιότητα στις χρωματισμένες τρίχες, ενώ τα όξινα φάρμακα ή οι μεταβολίτες τους, βρίσκονται μόνο σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3°

Μικροεκχύλιση στερεής φάσης από την υπερκείμενη αέρια φάση (Head Space-Solid Phase Microextraction, HS-SPME)

3.1 Εισαγωγή-Αναδρομή

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης από την υπερκείμενη αέρια φάση (HS-SPME) είναι μια τεχνική κατεργασίας δείγματος χωρίς τη χρησιμοποίηση διαλύτη στην οποία μια ίνα τηγμένης silica επικαλυμμένη με οργανικό πολυμερές εισάγεται στην υπερκείμενη αέρια φάση πάνω από το δείγμα [214]. Οι οργανικοί αναλύτες οι οποίοι έχουν μεταβεί στην αέρια κατάσταση αρχικά εκχυλίζονται και συγκεντρώνονται στην επικάλυψη της ίνας και στη συνέχεια μεταφέρονται στο αναλυτικό όργανο για εκρόφηση και ανάλυση. Αυτή η τροποποίηση της τεχνικής της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) μειώνει το χρόνο εκχύλισης και διευκολύνει την εφαρμογή της στην ανάλυση στερεών δειγμάτων.

Η ανάλυση οργανικών ρύπων στον αέρα, το νερό και το έδαφος είναι σημαντική, εξαιτίας της αυξανόμενης περιβαλλοντικής ανησυχίας. Η ανάπτυξη μιας απλής, αποτελεσματικής και ανέξοδης αναλυτικής τεχνικής για την παρακολούθηση και αξιολόγηση του περιβάλλοντος είναι ιδιαίτερης σημασίας. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την ανάλυση οργανικών ρύπων όπως η εκχύλιση υπερκείμενης αέριας φάσης, η εκδίωξη και παγίδευση (purge & trap), η εκχύλιση υγρής-υγρής φάσης, η εκχύλιση στερεής φάσης και πολλές άλλες είναι αποτελεσματικές αλλά εμφανίζουν περιορισμούς [215-217]. Η τεχνική SPME, όπως ήδη αναφέρθηκε, χρησιμοποιεί μια δίχως επικάλυψη λεπτή ίνα τηγμένης silica ή μια λεπτή ίνα silica επικαλυμμένη με μια επιλεκτική λεπτή στιβάδα, η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή, για την άμεση εκχύλιση οργανικών ενώσεων από υδατικά δείγματα και ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC) ή με αέρια χρωματογραφία/ φασματοσκοπία μάζας (GC/MS). Η SPME βασίζεται σε μια διαδικασία ισορροπίας κατανομής του αναλύτη μεταξύ της επικάλυψης της ίνας και του υδατικού διαλύματος. Για μια υγρή επικάλυψη, η ποσότητα που απορροφάται από την επικάλυψη υπολογίζεται από την εξίσωση :

$$n=C_0V_1V_2K/(KV_1+V_2) \quad (1)$$

όπου n είναι η μάζα που απορροφάται από την επικάλυψη, V_1 και V_2 είναι οι όγκοι της επικάλυψης και υδατικού διαλύματος αντίστοιχα, K είναι ο συντελεστής κατανομής του αναλύτη μεταξύ της επικάλυψης και του υδατικού διαλύματος και C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο υδατικό διάλυμα. Η αποτελεσματικότητα του χρόνου, η φορητότητα, η ακρίβεια, το όριο ανίχνευσης όπως επίσης και χαμηλό κόστος της τεχνικής SPME έχουν βελτιωθεί σημαντικά συγκριτικά με τις παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης στερεής φάσης.

Για ενώσεις που έχουν υψηλό συντελεστή επικάλυψης ανά υδατικό διάλυμα, ο χρόνος δειγματοληψίας αυξάνεται εξαιτίας μιας λεπτής, στατικής στιβάδας ύδατος που περιβάλλει την επικάλυψη της ίνας. Αυτή η στατική στιβάδα ύδατος είναι εξαιρετικά δύσκολο να απομακρυνθεί ακόμη και όταν το υδατικό διάλυμα αναδεύεται ταχύτατα. Ο υψηλός συντελεστής κατανομής του αναλύτη μεταξύ της επικάλυψης και της υδατικής φάσης σημαίνει ότι περισσότερα μόρια αναλύτη πρέπει να περάσουν μέσα από αυτό τη λεπτή στατική στιβάδα ύδατος, με πολύ χαμηλό συντελεστή διάχυσης, για να φθάσουν στην επικάλυψη. Ένας τρόπος για να αντιμετωπιστεί αυτός ο κινητικός περιορισμός είναι η χρησιμοποίηση περισσότερο αποτελεσματικών τεχνικών ανάδευσης, όπως οι υπέρηχοι, αλλά αυτή η προσέγγιση απαιτεί εξειδικευμένο εξοπλισμό. Παρακάτω περιγράφεται ότι οι χρόνοι εκχύλισης μειώνονται σημαντικά με δειγματοληψία αναλυτών έμμεσα από την υπερκείμενη φάση του δείγματος αντί της δειγματοληψίας απευθείας από το υδατικό διάλυμα επειδή η διάχυση των αναλυτών στην αέρια φάση είναι τέσσερις τάξεις μεγέθους υψηλότερη από ότι στην υδατική φάση. Μια ταχύτατη ισορροπία μεταξύ της υδατικής και της αέριας φάσης επιτυγχάνεται με συνεχή ανάδευση για τη δημιουργία μιας συνεχώς νέας επιφάνειας. Με τη δειγματοληψία από την υπερκείμενη φάση επεκτείνεται η τεχνική SPME σε πιο πολύπλοκα δείγματα τα οποία περιέχουν στερεά ή υλικά υψηλού μοριακού βάρους.

Η δειγματοληψία από υπερκείμενη αέρια φάση έχει ερευνηθεί εκτενώς και σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση πτητικών οργανικών ενώσεων σε τομείς όπως των τροφίμων, των ποτών, της κλινικής βιοχημείας, και της περιβαλλοντικής παρακολούθησης [218-221].

Στις προηγούμενες τεχνικές εκχύλισης υπερκείμενης φάσης, ο εμπλουτισμός των ενώσεων συνήθως διεξάγεται από μία προσθήκη ή από μια ψυχόμενη παγίδα υγρού αζώτου και στη συνέχεια οι παγιδευμένες ενώσεις μεταφέρονται στη στήλη αέριας χρωματογραφίας για ανάλυση. Συνήθως για τα δείγματα υψηλής συγκέντρωσης χρησιμοποιείται μια αεροστεγής σύριγγα για τη δειγματοληψία του αέριου δείγματος. Η διαδικασία δειγματοληψίας περιλαμβάνει αρκετές φορές πολύπλοκο εξοπλισμό όπως στην περίπτωση της τεχνικής εκδίωξη και παγίδευση (purge & trap) ή ένα μόνο δείγμα μπορεί να αναλυθεί αρκετές φορές όταν χρησιμοποιείται η μέθοδος της σταθερής προσθήκης. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι η συσκευή δειγματοληψίας είναι μη εκλεκτική για ενώσεις στην αέρια φάση. Στην περίπτωση της δειγματοληψίας με σύριγγα, το οξυγόνο και η υγρασία εισάγονται συχνά στη στήλη, με αποτέλεσμα τη μείωση της διάρκειας ζωής της. Επίσης υπάρχουν προβλήματα με την απορρόφηση ορισμένων αναλυτών στο εσωτερικό τοίχωμα της σύριγγας. Η εφαρμογή της συσκευής SPME για τη δειγματοληψία της υπερκείμενης φάσης εξαλείφει όλα τα παραπάνω προβλήματα των προηγούμενων τεχνικών και επεκτείνει τη δειγματοληψία σε λιγότερο πτητικές ενώσεις εξαιτίας της συγκέντρωσης στην επικάλυψη της ίνας. Παρακάτω περιγράφονται η ισορροπία και η κινητική της τεχνικής HS-SPME.

3.2 Φυσικοχημική βάση της εκχύλισης

Αν και η τεχνική HS-SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανικών ενώσεων σε διάφορες μήτρες και η επικάλυψη της ίνας μπορεί να είναι στερεή ή υγρή, η κατανόηση της θεωρίας ισορροπίας και κινητικής γίνεται με τη θεώρηση ενός συστήματος τριών φάσεων το οποίο αποτελείται από την υγρή πολυμερική επικάλυψη, την υπερκείμενη φάση και το υδατικό διάλυμα. Η ποσότητα των αναλυτών που απορροφάται από την επικάλυψη σχετίζεται με την συνολική ισορροπία των αναλυτών στο σύστημα των τριών φάσεων. Επειδή η συνολική ποσότητα του αναλύτη θα πρέπει να είναι η ίδια κατά την εκχύλιση ισχύει η εξίσωση (2) :

$$C_0V_2 = C_1^\infty V_1 + C_2^\infty V_2 + C_3^\infty V \quad (2)_3$$

όπου C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση του αναλύτη στο υδατικό διάλυμα, C_1^∞ , C_2^∞ και C_3^∞ είναι οι συγκεντρώσεις ισορροπίας του αναλύτη στην επικάλυψη,

στο υδατικό διάλυμα και στην υπερκείμενη αέρια φάση αντίστοιχα, V_1 , V_2 και V_3 είναι οι όγκοι της επικάλυψης, του υδατικού διαλύματος και της υπερκείμενης αέριας φάσης αντίστοιχα. Αν καθορισθεί ο συντελεστής κατανομής επικάλυψης/αέριας φάσης ως:

$$K_1 = C_1^\infty / C_3^\infty$$

και ο συντελεστής κατανομής αέριας φάσης/υδατικού διαλύματος ως

$$K_2 = C_3^\infty / C_2^\infty,$$

η ποσότητα του αναλύτη που απορροφάται από την επικάλυψη (η χωρητικότητα της επικάλυψης),

$$n = C_1^\infty V_1,$$

εκφράζεται από την εξίσωση (3) :

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K_1 K_2}{K_1 K_2 V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (3)$$

Το χημικό δυναμικό του αναλύτη στην υπερκείμενη αέρια φάση εκφράζεται από την εξίσωση (4) :

$$\mu_v = \mu^0(T) + RT \ln(p_v / p^0) \quad (4)$$

όπου μ_v είναι το χημικό δυναμικό του αναλύτη στην υπερκείμενη αέρια φάση, p_v είναι η τάση ατμών του αναλύτη στην υπερκείμενη αέρια φάση, $\mu^0(T)$ είναι το χημικό δυναμικό του αναλύτη στην πρότυπη τάση ατμών p^0 (συνήθως $p^0 = 1 \text{ atm}$) και θερμοκρασία T .

Το χημικό δυναμικό του αναλύτη στην επικάλυψη και στο υδατικό διάλυμα εκφράζονται ως εξής :

$$\mu_f = \mu^0(T) + RT \ln(p_f / p^0) \quad (5)$$

$$\mu_w = \mu^0(T) + RT \ln(p_w / p^0) \quad (6)$$

όπου μ_f και μ_w είναι τα χημικά δυναμικά του αναλύτη στην επικάλυψη και στο υδατικό διάλυμα αντίστοιχα, p_f και p_w είναι οι τάσεις ατμών του αναλύτη σε

ισορροπία με τον αναλύτη στην επικάλυψη και το υδατικό διάλυμα, αντίστοιχα. Σύμφωνα με το νόμο του Henry [222] ισχύει:

$$p_f = K_F C_1^\infty \quad (7)$$

$$p_w = K_H C_2^\infty \quad (8)$$

όπου K_F και K_H είναι οι σταθερές Henry του αναλύτη στην επικάλυψη και στο υδατικό διάλυμα αντίστοιχα. Όταν το σύστημα των τριών φάσεων είναι σε ισορροπία τα χημικά δυναμικά του αναλύτη στις τρεις φάσεις πρέπει να είναι ίσα.

$$\mu_f = \mu_v = \mu_w \quad (9)$$

Από τις εξισώσεις (4)-(6) και (9) έχουμε :

$$p_f = p_v = p_w \quad (10)$$

Αν υποθέσουμε ότι ισχύει ο νόμος των ιδανικών αερίων

$$p_v V_3 = n_v RT$$

(όπου n_v είναι ο αριθμός των moles του αναλύτη στην υπερκείμενη αέρια φάση) για τον αναλύτη στην υπερκείμενη αέρια φάση, ισχύει η εξίσωση (11).

$$p_v = C_3^\infty RT \quad (11)$$

Από τις εξισώσεις (7), (8), (10) και (11) συνδέονται οι συντελεστές κατανομής με τις σταθερές Henry ως εξής :

$$K_1 = \frac{C_1^\infty}{C_3^\infty} = \frac{RT}{K_F} \quad (12)$$

$$K_2 = \frac{C_3^\infty}{C_2^\infty} = \frac{K_H}{RT} \quad (13)$$

Στην περίπτωση της άμεσης SPME δειγματοληψίας από το υδατικό διάλυμα [223] στην ισορροπία ισχύει:

$$\mu_f = \mu_w \quad \text{ή}$$

$$p_f = p_w$$

Ο συντελεστής κατανομής του αναλύτη, K , μεταξύ της επικάλυψης και του υδατικού διαλύματος στην εξίσωση (1) εκφράζεται, επειδή από τις εξισώσεις (7) και (8) ισχύει

$$p_f = K_F C_1^\infty$$

$$\text{και } p_w = K_H C_2^\infty,$$

ως εξής :

$$K = C_1^\infty / C_2^\infty = K_H / K_F$$

Από τις εξισώσεις (12) και (13) προκύπτει:

$$K = \frac{K_H}{K_F} = K_1 K_2 \quad (14)$$

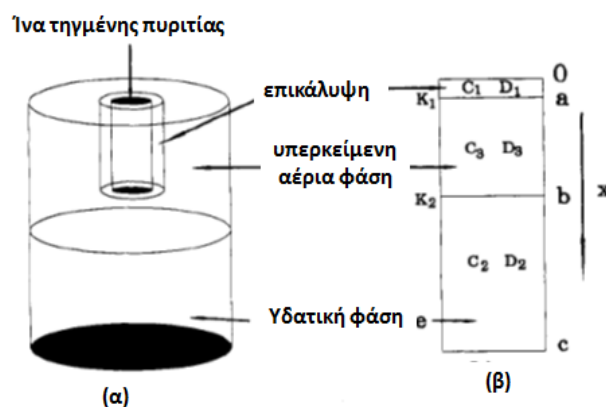
Έτσι η εξίσωση (3) γράφεται ως εξής :

$$n = \frac{C_0 V_1 V_2 K}{K V_1 + K_2 V_3 + V_2} \quad (15)$$

Σε σύγκριση με την εξίσωση (1), προκύπτει ότι εκτός από τον επιπλέον όρο $K_2 V_3$, ο οποίος σχετίζεται με τη χωρητικότητα της υπερκείμενης φάσης, οι δύο εξισώσεις είναι ίδιες. Και οι δύο εξισώσεις περιγράφουν τη μάζα που απορροφάται από την πολυμερική επικάλυψη μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας. Για τους περισσότερους αναλύτες, ο K_2 είναι σχετικά μικρός (για παράδειγμα, το βενζόλιο έχει τιμή K_2 0,26) και η δειγματοληψία από την υπερκείμενη φάση δεν θα επηρεάσει την ποσότητα που απορροφάται από την επικάλυψη, εάν ο όγκος της υπερκείμενης φάσης είναι πολύ μικρότερος από τον όγκο του υδατικού διαλύματος ($V_3 \ll V_2$). Συνεπώς, τα όρια ανίχνευσης της τεχνικής SPME υπερκείμενης φάσης αναμένεται να είναι παρόμοια με αυτά της άμεσης τεχνικής SPME από υδατικά δείγματα. Η τεχνική SPME από την υπερκείμενη φάση βασίζεται στην ισορροπία των αναλυτών μεταξύ των φάσεων. Η εξίσωση (15) δίνει τη μάζα των αναλυτών που απορροφάται από την πολυμερική επικάλυψη μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας. Η κινητική της μεταφοράς μάζας στην οποία οι αναλύτες μετακινούνται από την υδατική φάση στην υπερκείμενη και τελικά στην

επικάλυψη είναι ιδιαίτερα σημαντική επειδή καθορίζει το χρόνο δειγματοληψίας της τεχνικής SPME από την υπερκείμενη φάση.

Η γεωμετρία της τεχνικής HS-SPME απεικονίζεται στο Σχήμα 3.1α. Ένα υδατικό δείγμα στο οποίο έχουν προστεθεί οργανικές ενώσεις μεταφέρεται σε ένα κλειστό περιέκτη. Μετά την αποκατάσταση της χημικής ισορροπίας μεταξύ του υδατικού διαλύματος και της υπερκείμενης φάσης μια ίνα από τηγμένη silica της οποίας η επιφάνεια επικαλύπτεται από συγκεκριμένο οργανικό πολυμερές εισάγεται στην υπερκείμενη φάση του περιέκτη (η ίνα δεν εφάπτεται άμεσα με την υδατική φάση). Στην επικάλυψη της ίνας συντελείται η απορρόφηση των οργανικών αναλυτών από την υπερκείμενη φάση. Οι αναλύτες υποβάλλονται σε σειρά διαδικασιών μεταφοράς : από την υδατική στην αέρια φάση και τελικά στην επικάλυψη, έως ότου το σύστημα φτάσει τελικά σε ισορροπία. Η διαδικασία της διάχυσης δε συμβαίνει μόνο κατά την αξονική κατεύθυνση αλλά και κατά την ακτινική. Ένα απλό μονοδιάστατο μοντέλο διάχυσης όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 3.1β, επεξηγεί το φαινόμενο της διάχυσης. Στο μοντέλο αυτό η διάχυση συμβαίνει μόνο προς μία κατεύθυνση (άξονας x), όπου a είναι το πάχος της πολυμερικής επικάλυψης, $b-a$ είναι το μήκος της υπερκείμενης φάσης και $c-b$ είναι το μήκος του υδατικού διαλύματος των αναλυτών.



Σχήμα 3.1: (α) Η γεωμετρία της τεχνικής HS-SPME. (β) Μονοδιάστατο μοντέλο της διάχυσης των τριών φάσεων. Όπου K_1 και K_2 είναι οι συντελεστές κατανομής της επικάλυψης/υπερκείμενης φάσης και υπερκείμενης φάσης/υδατικού διαλύματος, αντίστοιχα, D_1 , D_2 και D_3 είναι οι συντελεστές διάχυσης του αναλύτη στην επικάλυψη, στην υπερκείμενη φάση και στην υδατική φάση αντίστοιχα, C_1 , C_2 και C_3 είναι οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στην επικάλυψη, στην υπερκείμενη φάση και στην υδατική φάση αντίστοιχα, a , $b-a$, και $c-b$ είναι το πάχος της επικάλυψης, της υπερκείμενης φάσης και της υδατικής φάσης αντίστοιχα,

Η διάχυση περιγράφεται από το δεύτερο νόμο διάχυσης του Fick:

$$\frac{\partial C(x,t)}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C(x,t)}{\partial x^2} \quad (16)$$

όπου $C(x,t)$ είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στη θέση x και στο χρόνο t και D είναι ο συντελεστής διάχυσης του αναλύτη. Η μάζα του αναλύτη που απορροφάται από την πολυμερική επικάλυψη σε κάθε χρονική στιγμή (t) υπολογίζεται από την εξίσωση (17):

$$M(t) = \int_0^a C(x,t) dx \quad (17)$$

Στην περίπτωση διάχυσης με στατική υδατική φάση ισχύει η εξίσωση (16) με τις παρακάτω συνθήκες :

- (1) Για $x=0$, δε συμβαίνει μεταφορά του αναλύτη εκτός συστήματος, αυτό σημαίνει ότι:

$$\frac{\partial C_1}{\partial x}(x=0,t) = 0 \quad (18)$$

- (2) Στη διεπιφάνεια μεταξύ της επικάλυψης και της υπερκείμενης φάσης, $x=a$, συμβαίνει κατανομή του αναλύτη μεταξύ των δύο φάσεων :

$$C_1(x=a,t) = K_1 C_3(x=a,t) \quad (19)$$

- (3) Για $x=b$, συμβαίνει κατανομή μεταξύ της υπερκείμενης και της υδατικής φάσης :

$$C_3(x=b,t) = K_2 C_2(x=b,t) \quad (20)$$

- (4) Για $x=0$ και για $x=c$, δε συμβαίνει μεταφορά του αναλύτη εκτός συστήματος, αυτό σημαίνει ότι :

$$\frac{\partial C_2}{\partial x}(x=c,t) = 0 \quad (21)$$

Στις διεπιφάνειες επικάλυψης/υπερκείμενης φάσης και υπερκείμενης φάσης/υδατικής φάσης συμβαίνει συνεχής μεταφορά του αναλύτη, έτσι ισχύουν οι εξισώσεις (22) και (23):

$$D_1 \frac{\partial C_1}{\partial x}(x=a,t) = D_3 \frac{\partial C_3}{\partial x}(x=a,t) \quad (22)$$

και

$$D_3 \frac{\partial C_3}{\partial x}(x=b,t) = D_2 \frac{\partial C_2}{\partial x}(x=b,t) \quad (23)$$

Επίσης σύμφωνα με την αρχική συνθήκη, δηλαδή στην αρχή της εκχύλισης η συγκέντρωση του αναλύτη στην επικάλυψη ισούται με μηδέν, ισχύει:

$$C_1(x,t=0) = 0 \quad (24)$$

Αν θεωρήσουμε ότι η αρχική συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος που μεταφέρεται στον περιέκτη είναι C_0 και ότι η ισορροπία μεταξύ της υπερκείμενης φάσης και του υδατικού διαλύματος λαμβάνει χώρα πριν την SPME εκχύλιση, οι συγκεντρώσεις στην υπερκείμενη φάση C_3^0 και στο υδατικό διάλυμα C_2^0 πριν την εκχύλιση υπολογίζονται από την εξίσωση:

$$C_0(c-b) = C_3^0(b-a) + C_2^0(c-b)$$

$$\text{όπου } C_3^0 = K_2 C_2^0.$$

Συνεπώς για τις αρχικές συνθήκες ισχύουν οι εξισώσεις (25) και (26):

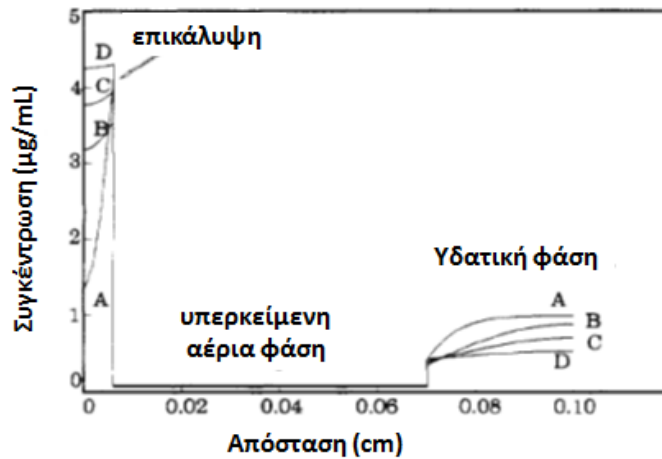
$$C_2(x,t=0) = C_2^0 \quad (25)$$

$$C_3(x,t=0) = C_3^0 \quad (26)$$

Στις παραπάνω εξισώσεις, D_1 , D_2 και D_3 είναι οι συντελεστές διάχυσης του αναλύτη στην επικάλυψη, στην υδατική φάση και στην υπερκείμενη φάση, αντίστοιχα, C_1 , C_2 και C_3 είναι οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στην επικάλυψη, στην υδατική φάση και στην υπερκείμενη φάση, αντίστοιχα, K_1 είναι ο συντελεστής κατανομής του αναλύτη μεταξύ της επικάλυψης και της υπερκείμενης φάσης και K_2 είναι ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της υπερκείμενης φάσης και της υδατικής φάσης. Η μερική διαφορική εξίσωση (16) και οι εξισώσεις των αρχικών συνθηκών είναι πολύ δύσκολο να επιλυθούν αναλυτικά. Για την επίλυσή της χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της πεπερασμένης διαφοράς (finite difference method) [224,225]. Με την

εφαρμογή της μεθόδου εκφράζεται η αρχική μερική διαφορική εξίσωση και οι εξισώσεις αρχικών συνθηκών με ένα σύνολο εξισώσεων που περιέχουν μια σειρά από άγνωστες συγκεντρώσεις σε διάφορες θέσεις του x και σε διαφορετικούς χρόνους. Με την επίλυση αυτών των εξισώσεων, λαμβάνονται οι συγκεντρώσεις του αναλύτη σε οποιαδήποτε θέση του x σε κάθε δεδομένη χρονική στιγμή.

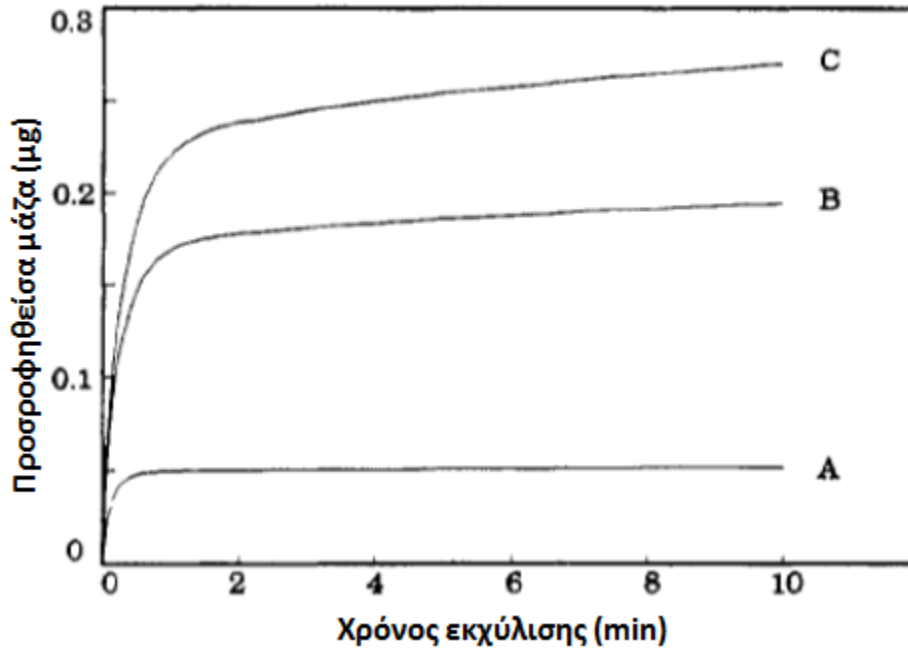
Στο Σχήμα 3.2 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις από $x=0$ έως $x=c$ (0,1 cm) για διάφορους χρόνους εκχύλισης (η μικρή κλίμακα x έχει επιλεγεί για την καλύτερη απεικόνιση των συγκεντρώσεων σε κάθε μια από τις τρεις φάσεις με βενζόλιο ως αναλύτη και πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο ως επικάλυψη στην ίνα). Οι συντελεστές διάχυσης του βενζολίου ισούνται με : $D_1 = 2.8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ για την επικάλυψη, $D_3 = 0.077 \text{ cm}^2 / \text{s}$ στην υπερκείμενη φάση και $D_2 = 1.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 / \text{s}$ για την υδατική φάση [225,226]. Το πάχος της επικάλυψης είναι $a = 56 \mu\text{m}$. Όσο παχύτερη είναι η επικάλυψη τόσο περισσότερο απορροφάται ο αναλύτης και το πάχος επηρεάζει το όριο ανίχνευσης της τεχνικής SPME. Η καμπύλη A είναι το προφίλ της συγκέντρωσης σε κάθε μια από τις τρεις φάσεις στην αρχή της εκχύλισης ($t = 3 \text{ s}$). Όσο εξελίσσεται η διάχυση η συγκέντρωση σε κάθε φάση μεταβαίνει σε κατάσταση ισορροπίας (από την καμπύλη B στην καμπύλη D). Επίσης οι συγκεντρώσεις στην επικάλυψη και στην υδατική φάση μεταβάλλονται με την απόσταση στα αρχικά στάδια της εκχύλισης ενώ η συγκέντρωση στην υπερκείμενη φάση είναι σχεδόν σταθερή. Αυτό οφείλεται στο ότι ο συντελεστής διάχυσης στην υπερκείμενη φάση είναι 4-5 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερος σχετικά με τις άλλες δύο φάσεις.



Σχήμα 3.2: Προφίλ συγκεντρώσεων στις τρεις φάσεις σε διαφορετικά στάδια διάχυσης σε στατική υδατική φάση.

Η εκχύλιση SPME είναι μια αναλυτική τεχνική που βασίζεται στην ισορροπία. Η ισορροπία επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση του αναλύτη είναι ομογενής σε κάθε μια από τις τρεις φάσεις και οι διαφορές συγκεντρώσεις μεταξύ των διεπιφανειών των φάσεων ικανοποιούν τις τιμές των συντελεστών κατανομής. Γενικά, ο χρόνος ισορροπίας είναι ο χρόνος όταν το 90% της συνολικής τελικής μάζας του αναλύτη έχει απορροφηθεί από την επικάλυψη, για t_e , $M(t_e) = 90\% M(\infty)$, όπου t_e είναι ο χρόνος ισορροπίας.

Στο Σχήμα 3.3 απεικονίζεται ο χρόνος για τη μάζα που απορροφάται στην επικάλυψη σε διαφορετικό συντελεστή κατανομής επικάλυψης/υπερκείμενης φάσης, K_1 , σε σταθερό συντελεστή κατανομής υπερκείμενης φάσης/ υδατικής φάσης, $K_2 = 0,2$.



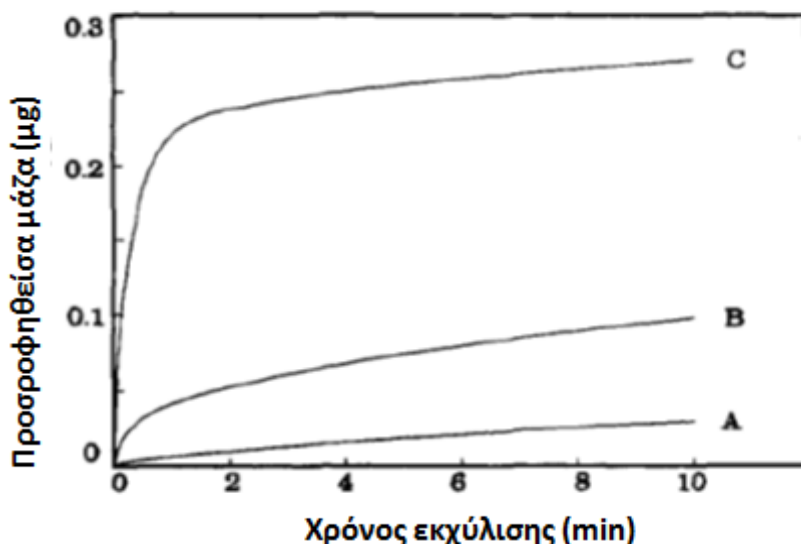
Σχήμα 3.3. Προφίλ χρόνου της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε στατική υδατική φάση, για: (A) $K_1 = 100$, (B) $K_1 = 1000$ και (C) $K_1 = 10000$.

Όσο αυξάνεται ο K_1 , τόσο περισσότεροι αναλύτες απορροφώνται στην επικάλυψη αλλά απαιτείται περισσότερος χρόνος για την επίτευξη της τελικής ισορροπίας. Για $K_1 = 100$ (καμπύλη A) ο χρόνος ισορροπίας t_e είναι 20s ενώ για $K_1 = 10000$ (καμπύλη C), ο χρόνος έως το σημείο ισορροπίας είναι αρκετά μεγαλύτερος. Ο μεγάλος χρόνος ισορροπίας στην περίπτωση της μεγάλης K_1 είναι αποτέλεσμα της αργής διάχυσης των μορίων του αναλύτη στην υδατική φάση. Αν και ο συντελεστής διάχυσης στην επικάλυψη είναι συνήθως μικρότερος από τον αντίστοιχο στην υδατική φάση, το πάχος της επικάλυψης είναι σχετικά μικρό συγκριτικά με τις άλλες φάσεις και κατά συνέπεια η διάχυση στην επικάλυψη είναι ταχύτερη. Επίσης η μάζα που απορροφάται στην επικάλυψη, αρχικά αυξάνεται ταχύτατα και στη συνέχεια ελαττώνεται. Αν οριστεί ως t_T ο χρόνος που απαιτείται για την επίτευξη του σημείου αλλαγής στην καμπύλη, για $K_2 = 0,2$ και $K_1 = 100$ (καμπύλη A), το 90% της συνολικής μάζας έχει απορροφηθεί στην επικάλυψη στο σημείο αλλαγής ($t_T = t_e$). Ωστόσο, λιγότερο από το 70% της συνολικής μάζας έχει προσροφηθεί στην επικάλυψη σε t_T για $K_2 = 0,2$ και $K_1 = 10000$ (καμπύλη C). Αν και οι τιμές του

K_1 μεταβάλλονται σημαντικά ο t_T μεταβάλλεται ελάχιστα, από 20 s για $K_1 = 100$ έως 60s για $K_1 = 10000$.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η μάζα που απορροφάται στην επικάλυψη έχει φτάσει στην ισορροπία [90% της $M(\infty)$] στο σημείο αλλαγής της καμπύλης. Το σημείο αυτό οφείλεται στην ταχύτερη διάχυση στην υπερκείμενη φάση και την αντίστοιχη αργή στην υδατική φάση. Ένα από τα κύρια χαρακτηριστικά της SPME είναι ότι η επικάλυψη της ίνας έχει μικρό όγκο, περίπου 10^{-4} cm^3 . Για πτητικούς αναλύτες, όπως το βενζόλιο, το οποίο έχει σχετικά μικρό K_1 και σχετικά μεγάλο K_2 , η ποσότητα του αναλύτη που εκχυλίζεται στην επικάλυψη είναι ασήμαντη με την ποσότητα του αναλύτη στην υπερκείμενη φάση. Κατά συνέπεια η συγκέντρωση στην υδατική φάση παραμένει σχεδόν σταθερή κατά τη διάρκεια της εκχύλισης. Ως αποτέλεσμα, ο χρόνος εκχύλισης καθορίζεται κυρίως από τη διάχυση στην αέρια φάση και ο χρόνος δειγματοληψίας είναι σχετικά σύντομος.

Στο Σχήμα 3.4 απεικονίζεται η επίδραση του συντελεστή κατανομής αέριας φάσης/υδατικής φάσης στην εκχύλιση. Στις καμπύλες A-C εμφανίζεται ο χρόνος για την απορρόφηση της μάζας από την επικάλυψη με $K_2 = 0,002$, 0,02 και 0,2 αντίστοιχα και $K_1 = 10000$ για όλες τις καμπύλες. Όταν ο αναλύτης έχει μικρή τιμή K_2 , η συγκέντρωσή του στην υπερκείμενη φάση είναι χαμηλή, η εκχύλιση επηρεάζει τη συγκέντρωση στην υδατική φάση και απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για την επίτευξη της ισορροπίας. Όσο μικρότερη είναι η ποσότητα του αναλύτη στην υπερκείμενη φάση τόσο μικρότερη από την $M(t_e)$ είναι η μάζα που απορροφάται στο σημείο αλλαγής της καμπύλης.



Σχήμα 3.4: Προφίλ της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε στατική υδατική φάση, για (A) $K_2 = 0,2$, (B) $K_2 = 0,02$ και (C) $K_2 = 0,002$.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η τεχνική HS-SPME μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αναλύτες με μεγάλες τιμές σταθερών Henry (πτητικοί και υδροφοβικοί αναλύτες) και με μικρούς συντελεστές κατανομής μεταξύ της επικάλυψης της ίνας και της υπερκείμενης αέριας φάσης. Οι πτητικοί οργανικοί αναλύτες πληρούν αυτές τις προϋποθέσεις.

3.3 Διάχυση σε αναδευόμενη υδατική φάση

Σε αυτή την περίπτωση, θεωρείται μια ιδανική κατάσταση στην οποία η υδατική φάση είναι πλήρως αναμίξιμη. Πρακτικά, μια καλά αναδευόμενη υδατική φάση σημαίνει ότι η μεταφορά μάζας στην υδατική φάση είναι ταχύτερη από ότι στις άλλες δύο φάσεις και δεν αποτελεί περιοριστικό στάδιο για τη διαδικασία διάχυσης. Αυτό επιτυγχάνεται με την ταχύτατη ανάδευση της υδατικής φάσης. Οι εξισώσεις (21) και (23) δεν ισχύουν σε αυτή την περίπτωση και δεν χρειάζεται να είναι γνωστή η κατανομή της συγκέντρωσης στην υδατική φάση επειδή σε κάθε χρονική στιγμή θα ισούται με :

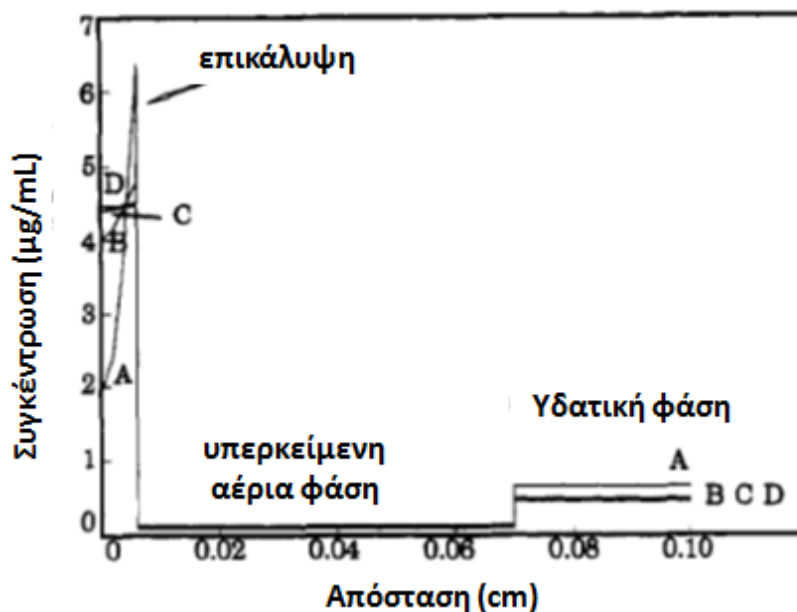
$$C_2(x,t) = C_2(t) \quad (27)$$

Από την ισορροπία μάζας εξάγεται η εξίσωση :

$$\int_0^a C_1(x,t) dx + \int_a^b C_3(x,t) dx + (c-b)C_2(t) = C_3^0(b-a) + C_2^0(c-b) \quad (28)$$

Η αρχική συγκέντρωση στην επικάλυψη, C_1^0 , ισούται με μηδέν. Οι εξισώσεις (27) και (28) αντικαθιστούν τις εξισώσεις (21) και (23). Με τη χρησιμοποίηση της μεθόδου πεπερασμένης διαφοράς υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις σε κάθε x και σε κάθε χρονική στιγμή.

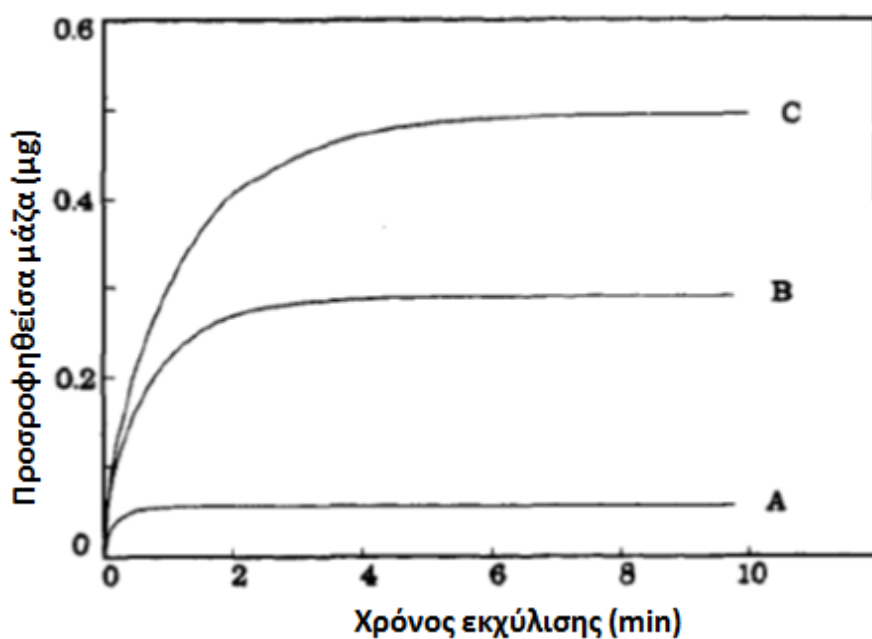
Στο Σχήμα 3.5 απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις κάθε φάσης σε διαφορετικούς χρόνους εκχύλισης. Ο συντελεστής κατανομής (D_2) του αναλύτη στην υδατική φάση δεν υφίσταται εξαιτίας της ταχύτατης ανάδευσης. Συγκριτικά με το Σχήμα 2, η ισορροπία επιτυγχάνεται ταχύτερα. Οι μεγάλες αρχικές συγκεντρώσεις στην άκρη της επικάλυψης (καμπύλη Α) οφείλεται στην ταχύτατη διάχυση στην υπερκείμενη αέρια και υδατική φάση και στο μικρό όγκο των δύο αυτών φάσεων. Αρχικά η εξωτερική επιφάνεια της επικάλυψης εκχυλίζει μεγάλη ποσότητα αναλύτη από τον περιέκτη και δεν επαρκεί ο χρόνος για βαθύτερη διάχυση στο εσωτερικό της επικάλυψης.



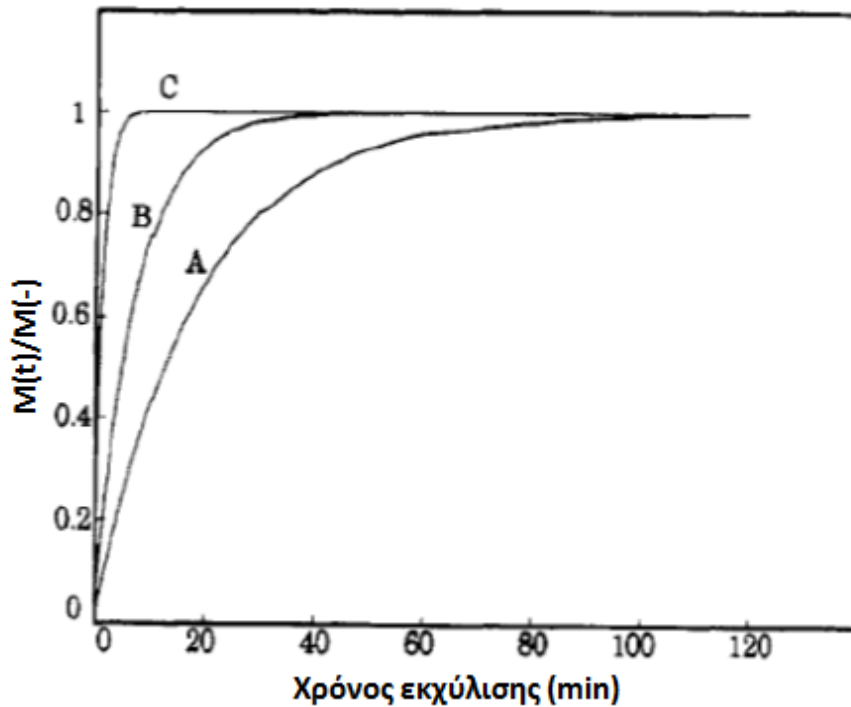
Σχήμα 3.5: Προφίλ της συγκέντρωσης στις τρεις φάσεις σε διαφορετικά στάδια της διάχυσης σε καλά αναδευόμενη υδατική φάση, σε: (A) $t = 3s$, (B) $t = 9s$, (C) $t = 15s$ και (D) $t = 21s$.

Στο Σχήμα 3.6 απεικονίζεται ο χρόνος της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη σε διαφορετικές τιμές συντελεστή κατανομής επικάλυψης/αέριας φάσης, K_1 , και σε σταθερή τιμή συντελεστή επικάλυψης αέριας φάσης/υδατικής φάσης, $K_2 = 0,2$. Όσο μεγαλύτερες είναι οι τιμές του K_1 τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ισορροπίας επειδή χρειάζεται

μεγαλύτερη ποσότητα αναλύτη να μετακινηθεί στην αέρια φάση. Ο χρόνος ισορροπίας αυξάνεται από τα 20s για $K_1=100$ (καμπύλη A) σε 130s για $K_1=10000$ (καμπύλη C). Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι με μια καλά αναδευόμενη υδατική φάση και σχετικά μεγάλες τιμές K_2 , επιτυγχάνεται ισορροπία σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα ακόμα και όταν ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της επικάλυψης και της υπερκείμενης αέριας φάσης, K_1 , είναι μεγάλος.



Σχήμα 3.6: Προφίλ της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε αναδευόμενη υδατική φάση για: (A) $K_1 = 100$, (B) $K_1 = 1000$ και (C) $K_1 = 10000$.



Σχήμα 3.7: Προφίλ της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη της ίνας σε αναδευόμενη υδατική φάση για: (A) $K_2 = 0,2$, (B) $K_2 = 0,02$ και (C) $K_2 = 0,002$.

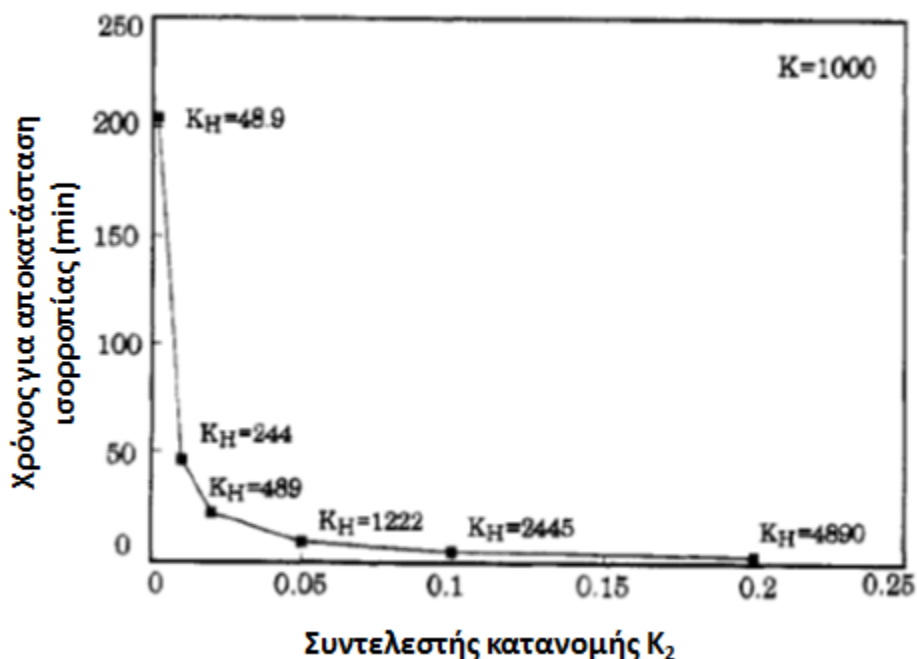
Στο Σχήμα 3.7 απεικονίζεται ο χρόνος της μάζας που απορροφάται από την επικάλυψη σε διαφορετικές τιμές K_2 με την ίδια τιμή K_1 . Ο χρόνος ισορροπίας αυξάνεται όσο ελαττώνεται η σταθερά Henry των οργανικών αναλυτών. Για $K_2 = 0,2$ και $K_1 = 10000$ (καμπύλη C), ο χρόνος ισορροπίας είναι 130 s, ενώ για $K_2 = 0,002$ και $K_1 = 10000$ (καμπύλη A), ο χρόνος ισορροπίας είναι 60 min. Επειδή η υδατική φάση αναδεύεται και η επικάλυψη είναι λεπτή, το περιοριστικό στάδιο είναι αυτό της διάχυσης στην υπερκείμενη αέρια φάση. Σύμφωνα με τον 1^ο νόμο διάχυσης του Fick, η ταχύτητα διάχυσης εξαρτάται τόσο από το συντελεστή διάχυσης όσο και από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης.

$$J = -D \frac{\partial C}{\partial x} \quad (29)$$

όπου J είναι η ροή του αναλύτη. Στην υπερκείμενη αέρια φάση, οι συντελεστές διάχυσης των αναλυτών είναι σχετικά μεγάλοι, αλλά οι συγκεντρώσεις, και οι διαβαθμίσεις των συγκεντρώσεων, μικραίνουν όσο μικραίνουν οι σταθερές Henry αν το πάχος της υπερκείμενης αέριας φάσης παραμείνει αμετάβλητο. Ως αποτέλεσμα, η μεταφορά των αναλυτών στην υπερκείμενη φάση είναι

πολύ αργή, και για την επίτευξη της ισορροπίας απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα.

Στο Σχήμα 3.8 απεικονίζεται η επίδραση του K_2 στο χρόνο ισορροπίας. Ο συντελεστής κατανομής μεταξύ της επικάλυψης και της υδατικής φάσης, $K = K_1 K_2$, έχει διατηρηθεί ο ίδιος. Κατά την ανάλυση υδατικών δειγμάτων που περιέχουν οργανικές ενώσεις, είναι προτιμότερη η χρησιμοποίηση των συντελεστών κατανομής των αναλυτών μεταξύ της επικάλυψης και της υδατικής φάσης αντί των K_1 και K_2 επειδή οι τιμές του K είναι συνήθως κοντά στις τιμές του K_{ow} (συντελεστής κατανομής αναλύτη μεταξύ 1-οκτανόλης και νερού). Αν η K διατηρείται σταθερή, όσο μεγαλύτερος είναι ο K_1 τόσο μικρότερος είναι ο K_2 και αντίστροφα. Στο σχήμα φαίνονται και οι αντίστοιχες σταθερές Henry ($atm \cdot cm^3 / mol$), K_H . Για $K = 1000$, όταν $K_2 = 0,002$ (το οποίο αντιστοιχεί σε $K_H = 48,9 \text{ atm} \cdot cm^3 / mol$ σε $T = 298K$ και $K_1 = 5 \times 10^6$), ο χρόνος ισορροπίας θα μπορούσε να είναι περισσότερο από 3 ώρες, ακόμη και σε μια καλά αναδευόμενη υδατική φάση. Επίσης στο Σχήμα 3.8 φαίνεται η σχέση μεταξύ των συντελεστών κατανομής επικάλυψης/υδατικής φάσης (K), των σταθερών Henry (K_H) και του χρόνου ισορροπίας.



Σχήμα 3.8: Σχέση μεταξύ χρόνου ισορροπίας και K_2 με $K = 1000$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Αέρια χρωματογραφία/Φασματομετρία μάζας (GC/MS)

4.1 Εισαγωγή

Η τεχνική GC/MS αποτελεί τη σύζευξη δύο επιμέρους τεχνικών: της αέριας χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας. Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται μια τριχοειδής στήλη με διάφορες διαστάσεις (μήκος, διάμετρος, πάχος φιλμ) καθώς και ιδιότητες στατικής φάσης. Η διαφορά στις χημικές ιδιότητες μεταξύ των διαφόρων συστατικών ενός μίγματος και της σχετικής συγγένειας τους με την στατική φάση της στήλης οδηγεί στο διαχωρισμό των συστατικών καθώς το μίγμα κινείται κατά μήκος της στήλης. Τα συστατικά συγκρατούνται από τη στήλη και στη συνέχεια εκκλύονται από την στήλη σε διαφορετικές χρονικές στιγμές επιτρέποντας το φασματόμετρο μάζας να ιονίσει, να επιταχύνει, να εκτρέψει και να ανιχνεύσει τα ιονισμένα συστατικά ξεχωριστά. Αυτό γίνεται από το φασματόμετρο μάζας με τη διάσπαση των συστατικών σε ιονισμένα θραύσματα και την ανίχνευση αυτών των θραυσμάτων με τη χρησιμοποίηση του λόγου της μάζας προς φορτίο τους [228].

4.2 Φασματόμετρο μαζών

Το φασματόμετρο μαζών είναι ένα όργανο που διαχωρίζει ταχύτατα κινούμενα ιόντα με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Επειδή τα περισσότερα ιόντα στη φασματομετρία μαζών είναι μονοφορτισμένα ο όρος του λόγου της μάζας προς το φορτίο συχνά αντικαθίσταται από τον όρο μάζα.

Το φασματόμετρο μαζών αποτελείται συνήθως από τα παρακάτω τμήματα: το στόμιο εισαγωγής, την πηγή ιόντων, τον αναλυτή μάζας, τον μεταλλάκτη ιόντων και τον επεξεργαστή του σήματος. Ο ρόλος του στομίου είναι η εισαγωγή μικρής ποσότητας του συστατικού στην πηγή ιόντων, όπου γίνεται η μετατροπή σε ιόντα μετά το βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια. Το ρεύμα των θετικών ιόντων που δημιουργούνται στην πηγή επιταχύνεται στη συνέχεια στον αναλυτή μάζας. Ο ρόλος του αναλυτή είναι η διασπορά των ιόντων με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους. Ο μεταλλάκτης μετατρέπει την ιοντική δέσμη σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο μπορεί να υποστεί περαιτέρω επεξεργασία και να παρουσιαστεί με διάφορους τρόπους. Η πίεση στο χώρο

της πηγής ιόντων, του αναλυτή μάζας και του μεταλλάκτη ιόντων διατηρείται σε πολύ χαμηλά επίπεδα [228].

Η διαδικασία λειτουργίας του είναι η ακόλουθη [229]:

1. Μια μικρή ποσότητα της ένωσης εξατμίζεται. Ο ατμός οδηγείται στο θάλαμο ιονισμού όπου η πίεση διατηρείται στα 10^{-7} mbar.

2. Τα μόρια σε μορφή ατμού ιονίζονται από μία δέσμη ηλεκτρονίων. Μια θερμαινόμενη κάθοδος (πυρακτωμένο νήμα) παράγει αυτή τη δέσμη. Ο ιονισμός επιτυγχάνεται κυρίως από επαγωγικά φαινόμενα παρά από άμεσες συγκρούσεις. Με τον τρόπο αυτό παράγονται πολλά θετικά ιόντα.

3. Τα θετικά ιόντα οδηγούνται σε εξαναγκασμένη έξοδο από το θάλαμο ιονισμού με ένα μικρό θετικό φορτίο (μερικά Volts). Μετά την απομάκρυνση των ιόντων από τον θάλαμο ιονισμού, αυτά επιταχύνονται από ένα ηλεκτροστατικό πεδίο μερικών εκατοντάδων ή χιλιάδων volt πριν να εισαχθούν στον αναλυτή.

4. Ο διαχωρισμός των ιόντων λαμβάνει χώρα στον αναλυτή σε πίεση περίπου 10^{-8} mbar. Αυτός επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο κάθετο στην διεύθυνση της κίνησης των ιόντων. Η ταχεία κίνηση των ιόντων θα ακολουθήσει μια κυκλική τροχιά, εξαιτίας της επιτάχυνσης Lorenz της οποίας η ακτίνα ορίζεται από τον λόγο μάζας / φορτίο του ιόντος και της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Τα ιόντα με διαφορετικούς λόγους μάζας /φορτίο κατευθύνονται διαμέσου της εξόδου – σχισμής μεταβάλλοντας το δυναμικό επιτάχυνσης ή μεταβάλλοντας την ισχύ του μαγνητικού πεδίου.

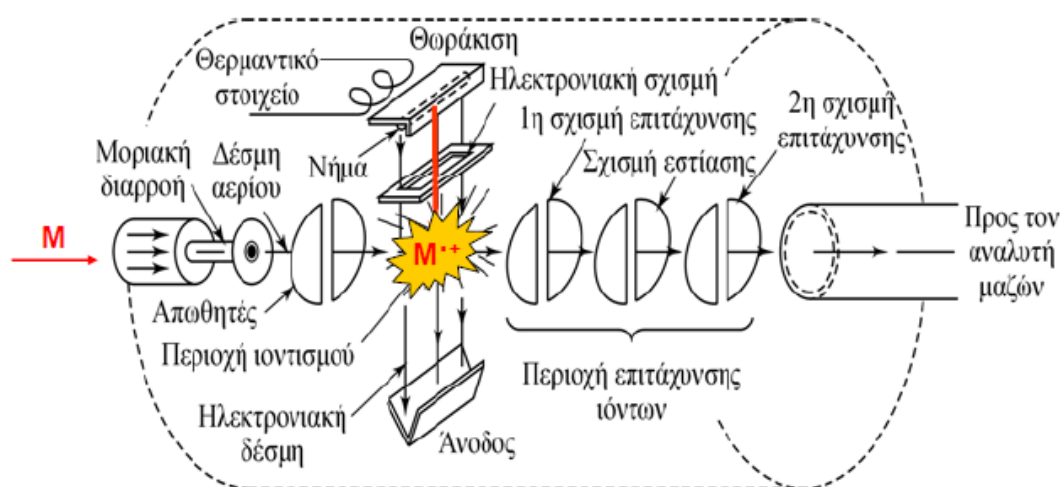
5. Όταν τα ιόντα περάσουν την έξοδο – σχισμή, συγκρούονται, με ένα ηλεκτρόδιο-συλλογέα. Το παραγόμενο ρεύμα ενισχύεται και καταγράφεται σε συνάρτηση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου ή του επιταχυνόμενου δυναμικού.

4.3 Πηγές ιόντων

Το αρχικό στάδιο στη φασματομετρία μαζών είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αναλύτη. Οι πηγές ιόντων διακρίνονται σε: (α) πηγές αέριας φάσης και (β) πηγές εκρόφησης. Στις πηγές αέριας φάσης το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιονίζεται. Σε αυτή την κατηγορία πηγών ανήκουν οι πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (Electron Impact ή EI) και οι χημικού ιονισμού (Chemical Ionization ή CI). Στις πηγές εκρόφησης το υγρό ή στερεό δείγμα μετατρέπεται σε αεριώδη κατάσταση. Σε αυτή την κατηγορία πηγών ανήκουν οι βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment ή

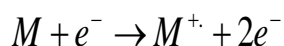
FAB), ο ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας Matrix Assisted Desorption Ionization ή MALDI) και ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization ή ESI) [230,231].

Η κύρια πηγή ιονισμού που χρησιμοποιείται στην τεχνική GC/MS είναι αυτή της πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact) EI (Σχήμα 4.1). Τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μια τάση περίπου 70 eV, η οποία εφαρμόζεται μεταξύ του νήματος και μιας ανόδου. Οι διαδρομές των ηλεκτρονίων και των μορίων σχηματίζουν ορθή γωνία και διασταυρώνονται στο κέντρο της πηγής όπου γίνεται η πρόσκρουση και ο ιοντισμός.

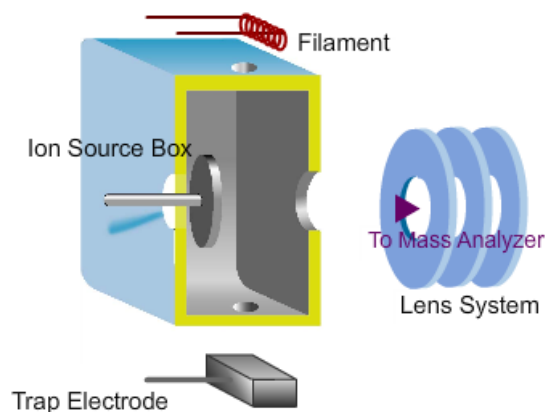


Σχήμα 4.1: Πηγή ιόντων EI [230]

Το αρχικό προϊόν είναι μονοφορτισμένα θετικά ιόντα, τα οποία δημιουργούνται όταν ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας πλησιάσουν τα μόρια τόσο ώστε να προκαλέσουν την απόσπαση ηλεκτρονίων από αυτά εξαιτίας ηλεκτροστατικής άπωσης. Ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων δεν είναι πολύ αποδοτικός επειδή περίπου ένα μόριο ανά εκατομμύριο υφίσταται την αρχική αντίδραση :



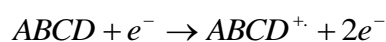
Το M αντιπροσωπεύει το μόριο του αναλύτη και το M⁺ το μοριακό του ιόν. Τα θετικά ιόντα που παράγονται από την πρόσκρουση με τα ηλεκτρόνια οδηγούνται στη συνέχεια από ένα σύστημα φακών στον αναλυτή μάζας [229,230].



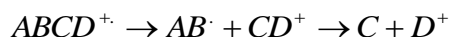
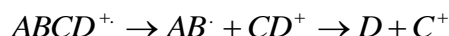
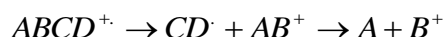
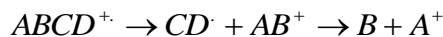
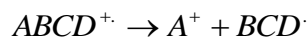
Σχήμα 4.2: Πηγή ιόντων και σύστημα φακών

Για την αναπαραγώγιμη δημιουργία ικανού αριθμού ιόντων είναι απαραίτητη η επιτάχυνση των ηλεκτρονίων με τάση μεγαλύτερη από 50 V. Η μικρή μάζα και η μεγάλη κινητική ενέργεια των παραγόμενων ηλεκτρονίων προκαλούν μικρή αύξηση της μεταφορικής ενέργειας των μορίων που συγκρούονται με τα ηλεκτρόνια. Τα μόρια μεταβαίνουν σε υψηλά διεγερμένες δονητικές και περιστροφικές καταστάσεις. Συνεπώς η αποδιέγερση πραγματοποιείται συνήθως με εκτεταμένη θραύση που δημιουργεί ένα μεγάλο αριθμό θετικών ιόντων διαφόρων μαζών τα οποία είναι μικρότερα από το μοριακό ιόν. Αυτά τα μικρότερης μάζας ιόντα ονομάζονται θυγατρικά ιόντα. Παρακάτω περιγράφονται μερικές αντιπροσωπευτικές αντιδράσεις θραύσης που ακολουθούν το σχηματισμό του μητρικού ιόντος μέσω πρόσκρουσης με ηλεκτρόνια ενός υποθετικού μορίου ABCD.

1. Σχηματισμός μοριακού ιόντος



2. Θραύση



3. Μετάθεση ακολουθούμενη από θραύση





4. Σύγκρουση ακολοθούμενη από θραύση



Τα πλεονεκτήματα του ιονισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων έναντι των άλλων τεχνικών είναι ότι [230]:

- Αποτελεί μία καθιερωμένη και επαρκώς μελετημένη τεχνική
- Μπορεί να εφαρμοστεί πρακτικά σε όλα τα πτητικά μόρια
- Παρέχει επαναλήψιμο φάσμα μαζών
- Η θραυσματοποίηση χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση δομής
- Αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη βιβλιοθηκών φασμάτων μαζών που περιέχουν το αποτύπωμα κάθε ένωσης

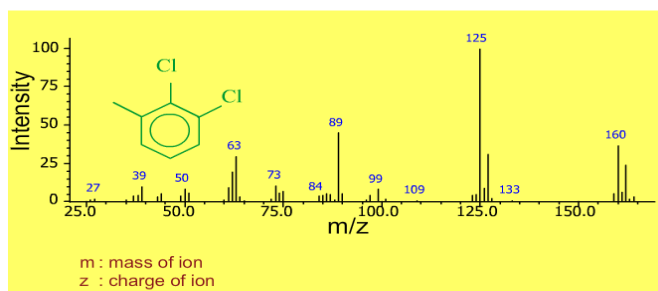
Τα μειονεκτήματα της είναι:

- Το δείγμα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό
- Το μοριακό ιόν μπορεί να απουσιάζει ή να έχει χαμηλή αφθονία.

4.4 Φάσματα με πηγή EI

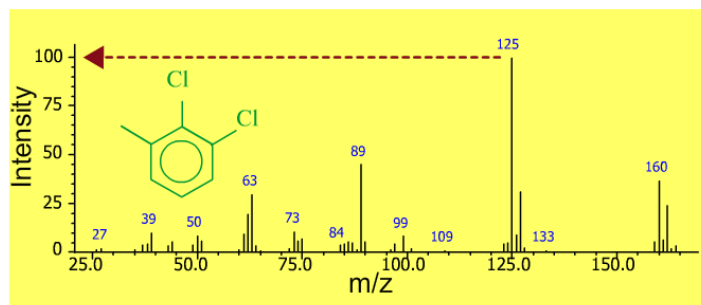
Τα πολύπλοκα φάσματα μαζών που παράγονται κατά τον ιονισμό πρόσκρουσης με ηλεκτρόνια είναι χρήσιμα για την ταυτοποίηση των ενώσεων. Για ορισμένους τύπους μορίων η θραύση είναι τόσο εκτεταμένη που δεν παραμένει ίχνος μοριακού ιόντος. Έτσι χάνονται οι απαραίτητες βασικές πληροφορίες για τον προσδιορισμό του μοριακού βάρους του αναλύτη.

Ένα φάσμα μάζας αποτελεί τη γραφική αναπαράσταση της κατανομής της μάζας των ιόντων. Από το φάσμα μάζας εξάγονται πληροφορίες για το μοριακό βάρος, τη μοριακή δομή και κατά συνέπεια για την ταυτοποίηση άγνωστων ενώσεων. Ο οριζόντιος άξονας παριστάνει το λόγο m/z όπου m είναι η μάζα του ιόντος σε μονάδες u και z ο αριθμός των φορτίων του ιόντος. Γενικά, οι μέθοδοι ιονισμού στο GC/MS δημιουργούν μονοφορτισμένα ιόντα ($z=1$) έτσι ο λόγος m/z ισούται με τη μάζα του ιόντος.



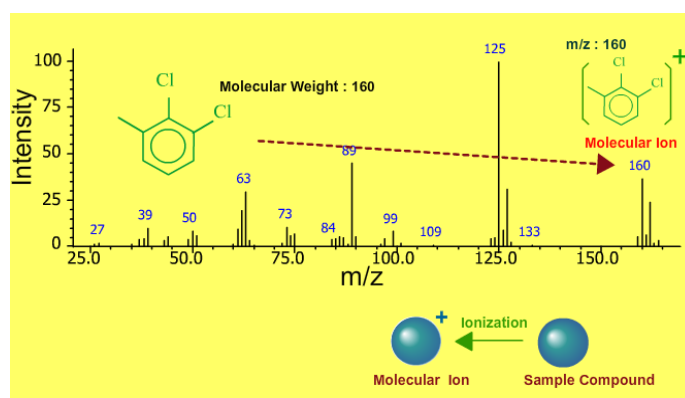
Σχήμα 4.3: Φάσμα μάζας C₇H₆Cl₂

Ο κατακόρυφος άξονας παριστάνει τη σχετική αφθονία των ιόντων. Η κορυφή με το μεγαλύτερο ύψος στο φάσμα καλείται βασική κορυφή (Base Peak) και η έντασή της είναι το 100%. Το ιόν της βασικής κορυφής βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στην πηγή ιονισμού και παριστάνει το σταθερότερο ιόν. Το ιόν της βασικής κορυφής χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της ένωσης.

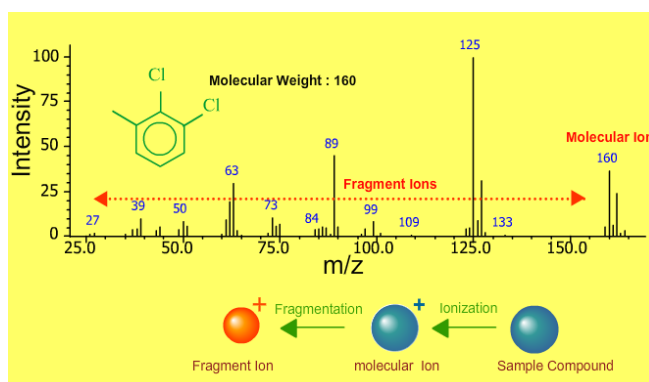


Σχήμα 4.4: Βασική κορυφή $C_7H_6Cl_2$

Η αποβολή ενός ηλεκτρονίου από μία ηλεκτρικά ουδέτερη ένωση έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός θετικά φορτισμένου μοριακού ιόντος. Το ιόν αυτό παρέχει πληροφορίες για το μοριακό βάρος επειδή η μάζα του ηλεκτρονίου είναι μικρή σε σχέση με τη μάζα του μορίου. Έτσι η μάζα του μοριακού ιόντος θεωρείται ως η μάζα του μορίου [228-231].



Σχήμα 4.5: Μοριακό ιόν $C_7H_6Cl_2$



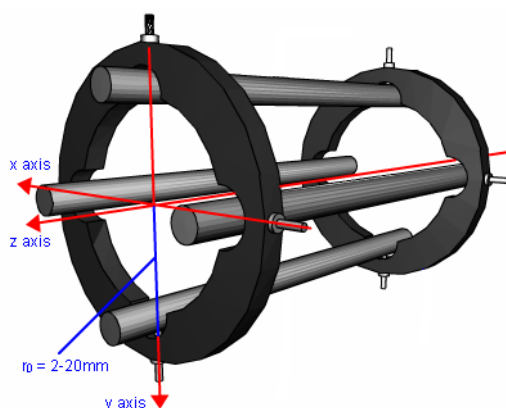
Σχήμα 4.6: Θυγατρικά ιόντα $C_7H_6Cl_2$

4.5 Ισοτοπικές κορυφές

Στο Σχήμα 4.3 εμφανίζονται κορυφές σε μάζες μεγαλύτερες από αυτή του μοριακού ιόντος. Οι κορυφές αυτές αποδίδονται σε ιόντα που έχουν τον ίδιο χημικό τύπο αλλά διαφορετική ισοτοπική σύσταση. Το μέγεθος κάθε κορυφής εξαρτάται από τη φυσική αφθονία των ισοτόπων.

4.6 Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Ο συνηθέστερος τύπος φασματομέτρου μάζας είναι ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (quadrupole mass analyzer) όπου απεικονίζεται στο Σχήμα 4.7.



Σχήμα 4.7: Τετραπολικός αναλυτής μαζών

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών αποτελείται από 4 παράλληλες κυλινδρικές ράβδους οι οποίες δρουν ως ηλεκτρόδια. Οι διαγώνιες ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με το θετικό πόλο μια πηγής μεταβλητής DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της πηγής. Επιπλέον σε κάθε ζεύγος ραβδών εφαρμόζονται μεταβλητές φάσεις AC που μεταξύ τους βρίσκονται σε διαφορά φάσης 180° . Για να ληφθεί το φάσμα μαζών τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα στις ράβδους με συγκεκριμένο δυναμικό. Τα εναλλασσόμενα και τα συνεχή δυναμικά των ραβδών αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα, εκτός από αυτά που έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγου m/z , φτάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι στο μεταλλάκτη φτάνουν τα ιόντα των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z [230].

4.7 Διαδρομή ιόντων στο τετράπολο

Για την κατανόηση της κίνησης των ιόντων στο τετράπολο πρέπει να εξεταστεί η επίδραση του DC και AC δυναμικού στις τροχιές των ιόντων κατά τη διέλευση τους από το δίαυλο ανάμεσα στις ράβδους. Στην περίπτωση των ράβδων που διατηρούνται σε θετικό δυναμικό, όταν δεν υφίσταται το δυναμικό DC, τα ιόντα στο δίαυλο συγκλίνουν προς το κέντρο του κατά τη διάρκεια της θετικής ημιπεριόδου της εναλλασσόμενης τάσης και αποκλίνουν κατά την αρνητική ημιπερίοδο. Αν κατά τη διάρκεια της αρνητικής ημιπεριόδου ένα ιόν συναντήσει τη ράβδο, το θετικό του φορτίο εξουδετερώνεται και το ουδέτερο μόνιο απομακρύνεται. Το κατά πόσο ένα θετικό ιόν θα συναρτήσει τη ράβδο εξαρτάται από την ταχύτητά του, από τον λόγο m/z καθώς και από τη συχνότητα και την τιμή του εναλλασσόμενου σήματος.

Είναι γνωστό ότι η ορμή των ιόντων ίσης κινητικής ενέργειας είναι ευθέως ανάλογη προς την τετραγωνική ρίζα της μάζας. Για τον λόγο αυτό είναι δυσκολότερη η εκτροπή ενός βαρύτερου ιόντος. Αν ένα ιόν στο δίαυλο είναι βαρύ και η συχνότητα του AC δυναμικού είναι μεγάλη, το ιόν δεν θα ανταποκριθεί σημαντικά στο εναλλασσόμενο δυναμικό ενώ θα επηρεαστεί σημαντικά από το DC δυναμικό. Έτσι το ιόν θα τείνει να παραμείνει στο χώρο μεταξύ των ράβδων. Αντίθετα αν το ιόν είναι ελαφρύ και η συχνότητα χαμηλή, το ιόν μπορεί να συγκρουστεί με τη ράβδο και να εξαφανιστεί κατά τη διάρκεια της ημιπεριόδου του AC δυναμικού.

Στην περίπτωση των ράβδων που διατηρούνται σε αρνητικό δυναμικό, αν δεν υφίσταται AC δυναμικό, όλα τα θετικά ιόντα κατευθύνονται προς τις ράβδους όπου εξουδετερώνονται. Ωστόσο, για τα ελαφρύτερα ιόντα η κίνηση αυτή μπορεί να ακυρωθεί με την επίδραση του AC δυναμικού.

Για να κινηθεί ένα ιόν μέσα στο δίαυλο του τετραπόλου πρέπει να διατηρεί σταθερή τροχιά τόσο στο επίπεδο xz όσο και στο επίπεδο yz . Το τετράπολο επιτρέπει τη διέλευση ζώνης ιόντων των οποίων το m/z βρίσκεται σε μια στενή περιοχή τιμών. Το κέντρο της ζώνης αυτής μπορεί να μεταβάλλεται με ρύθμιση των AC και DC δυναμικών [228-234].

4.8 Εξισώσεις κίνησης

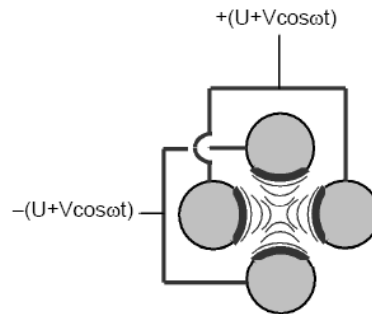
Τα ιόντα που κινούνται στο επίπεδο z υπόκεινται στην επίδραση του συνολικού πεδίου του τετραπόλου που δίνεται από την εξίσωση (30):

$$\Phi_0 = +(U + V \cos \omega t) \text{ και } -\Phi_0 = -(U + V \cos \omega t) \quad (30)$$

όπου Φ_0 είναι το συνολικό δυναμικό που εφαρμόζεται στις ράβδους του τετράπολου, ω είναι η γωνιακή ταχύτητα, U είναι το συνεχές δυναμικό και V είναι το μισό πλάτος της κυματομορφής του εναλλασσόμενου δυναμικού. Η γωνιακή ταχύτητα δίνεται από την εξίσωση (31):

$$\omega = 2\pi f \quad (31)$$

όπου f είναι η συχνότητα του εναλλασσόμενου δυναμικού. Με ρύθμιση της συχνότητας ιόντα συγκεκριμένου m/z διέρχονται από το τετράπολο. Με σάρωση του δυναμικού είναι δυνατή η σάρωση μεγαλύτερου εύρους m/z .



Σχήμα 4.8. Δυναμικό στις ράβδους του τετράπολου.

Η κίνηση των ιόντων στο πεδίο του τετράπολου περιγράφεται μαθηματικά με την επίλυση της γραμμικής διαφορικής εξίσωσης δεύτερου βαθμού του Mathieu. Με την επίλυση της εξίσωσης και με την παραδοχή των εννοιών των περιοχών σταθερότητας και αστάθειας περιγράφεται η τροχιά των ιόντων στο τετράπολο και καθορίζονται τα όρια της τροχιάς σταθερότητας.

Τα ιόντα που εισέρχονται στο τετράπολο επιταχύνονται στο επίπεδο z αλλά υπόκεινται και σε επιταχύνσεις στα επίπεδα x και y που οφείλονται στις δυνάμεις των ηλεκτρικών πεδίων :

$$F_x = ma = m \frac{d^2x}{dt^2} = -ze \frac{\delta\Phi}{\delta x} \quad (32)$$

$$F_y = ma = m \frac{d^2y}{dt^2} = -ze \frac{\delta\Phi}{\delta y} \quad (33)$$

όπου m είναι η μάζα του ιόντος, a είναι η επιτάχυνση και $-q = -ze$ είναι το φορτίο του ιόντος. Θέτοντας:

$$u = x \text{ ή } y \quad (34)$$

$$\xi = \omega t / 2 \quad (35)$$

$$a_u = \frac{8zeU}{mr_0^2 \omega^2} \quad (36)$$

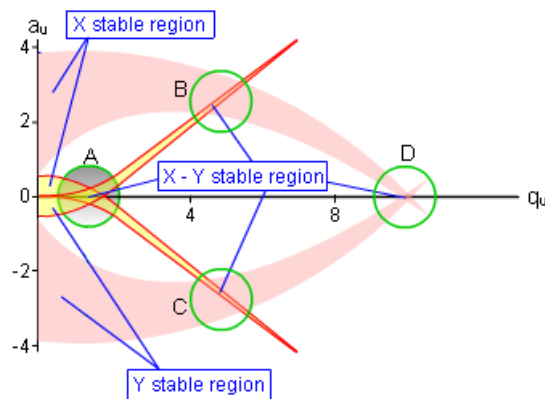
$$q_u = \frac{4zeV}{mr_0^2\omega^2} \quad (37)$$

όπου u είναι το επίπεδο x, y ή z , ξ είναι μια αδιάστατη παράμετρος, a_u, q_u είναι αδιάστατες παράμετροι (παράμετροι παγίδευσης). Μετά από παραγωγή και αναδιάταξη των όρων προκύπτει η εξίσωση :

$$\frac{d^2u}{d\xi^2} + (a_u - 2q_u \cos 2\xi)u = 0 \quad (38)$$

Οι παραπάνω εξισώσεις διατυπώθηκαν από τον Mathieu και καθορίζουν τη σχέση μεταξύ των επιπέδων κίνησης ενός ιόντος στο τετράπολο και του χρόνου. Όταν το x και το y είναι μικρότερα από την ακτίνα του κυλίνδρου που σχηματίζουν οι ράβδοι του τετράπολου r_0 , το ιόν μπορεί να διέλθει από το τετράπολο χωρίς να συγκρουστεί στις ράβδους.

Για ένα δεδομένο τετράπολο τόσο το r_0 όσο και το ω διατηρούνται σταθερά. Οι μεταβλητές είναι οι όροι U και V . Για κάθε ιόν τα x και y μπορούν να καθοριστούν κατά τη διάρκεια μιας χρονικής περιόδου ως συνάρτηση των U και V . Σε ένα διάγραμμα a_u, q_u μπορούν να απεικονιστούν οι περιοχές σταθερότητας, όπου οι τιμές των U και V είναι τέτοιες ώστε τα x και y να είναι μικρότερα του r_0 .



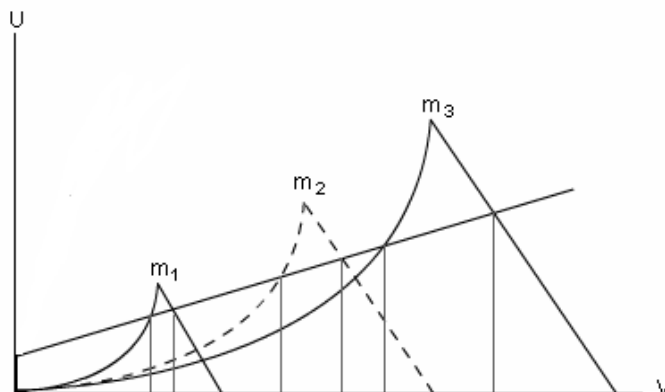
Σχήμα 4.9: Η περιοχή A καλείται περιοχή σταθερότητας και είναι συμμετρική γύρω από τον άξονα q_u . Συνήθως λαμβάνεται υπόψη μόνο το άνω τμήμα της περιοχής ενώ το κάτω λαμβάνεται με αλλαγή των ηλεκτρικών συνδέσεων του τετράπολου.

Από τις εξισώσεις (36) και (37) προκύπτει η εξίσωση (39) και (40) :

$$U = a_u \frac{m \omega^2 r_0^2}{z 8e} \quad (39)$$

$$V = q_u \frac{m \omega^2 r_0^2}{z 4e} \quad (40)$$

Η μετάβαση από τη μία μάζα στην άλλη οδηγεί σε αναλογική υποδιαίρεση των a_u, q_u που σημαίνει μεταβολή της κλίμακας του σχήματος κατά τις τιμές των U και V , οπότε η τριγωνική περιοχή A αλλάζει από τη μία μάζα στην άλλη όπως στα ανάλογα τρίγωνα. Στο Σχήμα 4.10 απεικονίζεται ένα διάγραμμα της περιοχής σταθερότητας A για διαφορετικές μάζες.



Σχήμα 4.10: Περιοχές σταθερότητας για ιόντα με διαφορετικές μάζες ($m_1 > m_2 > m_3$). Με τη γραμμική μεταβολή του U ως προς το V λαμβάνεται μια ευθεία γραμμή η οποία επιτρέπει την επιτυχή παρατήρηση αυτών των ιόντων. Αν αυξηθεί η κλίση της γραμμής αυξάνεται η διακριτική ικανότητα όσο η γραμμή διέρχεται από τις περιοχές σταθερότητας. Όταν το $U = 0$ η διακριτική ικανότητα μηδενίζεται.

Η σάρωση κατά μήκος της γραμμής με σταθερό λόγο U/V επιτρέπει την επιτυχή ανίχνευση διαφορετικών μαζών. Όσο η γραμμή διέρχεται από τις περιοχές σταθερότητας η αύξηση της κλίσης της θα έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της διακριτικής ικανότητας [229-233].

4.9 Διακριτική ικανότητα

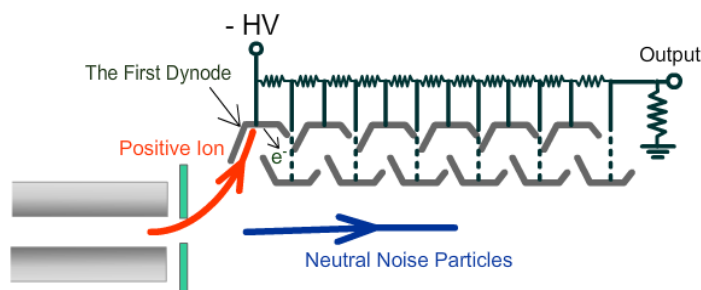
Η ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών να διαχωρίζει μάζες ονομάζεται διακριτική ικανότητα (Resolution) R και δίνεται από την εξίσωση (41):

$$R = m / \Delta m \quad (41)$$

όπου Δm είναι η διαφορά μαζών μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής. Δύο κορυφές θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν η επικάλυψή τους δεν υπερβαίνει ένα δεδομένο κλάσμα του ύψους τους (συνήθως 10%). Η απαιτούμενη διακριτική ικανότητα ενός φασματομέτρου μαζών εξαρτάται από τις εφαρμογές του [229-233].

4.10 Μεταλλάκτες Ιόντων

Ο περισσότερο συνηθισμένος μεταλλάκτης ιόντων στα φασματομέτρα μάζας είναι ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (electron multiplier). Στο Σχήμα 4.11 απεικονίζεται ένας ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών-δυνόδων (discrete-dynode) ο οποίος έχει σχεδιαστεί για την ανίχνευση θετικών ιόντων [228].



Σχήμα 4.11: Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών-δυνόδων.

Στον ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστή διακριτών-δυνόδων, κάθε δύνοδος βρίσκεται σε υψηλότερο δυναμικό από την προηγούμενη. Η κάθοδος και οι πολλαπλές δύνοδοι έχουν επιφάνειες Cu/Be, από τις οποίες εκπέμπονται δέσμες ηλεκτρονίων, όταν προσκρούουν σε αυτές ιόντα ή ηλεκτρόνια υψηλών ενεργειών. Υπάρχουν ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστές ακόμα και με 20 δύνόδους οι οποίοι παρέχουν τυπικές ενισχύσεις ρεύματος της τάξης των 10^7 [228].

4.11 Απαίτηση για υψηλό κενό

Κατά την πορεία των ιόντων στον ανιχνευτή είναι δυνατό να συγκρουστούν με τα μόρια του φέροντος αερίου (He) ή υπολειματικών αερίων (αέρας, νερό κ.ά.) και να μην ανιχνευτούν. Η σύγκρουση αυτή συμβαίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα σε χαμηλό κενό. Η διαδρομή των ιόντων χωρίς να συγκρουστούν με τα μόρια των αερίων αναφέρεται ως μέση ελεύθερη διαδρομή. Αν η εφαρμογή υψηλού κενού παρέχει μια μεγάλη μέση ελεύθερη διαδρομή η οποία να υπερβαίνει τις διαστάσεις του θαλάμου τα ιόντα θα φτάσουν εύκολα στον ανιχνευτή. Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας λειτουργεί σε πίεση 10^{-3} έως 10^{-4} Pa η οποία αντιστοιχεί σε μέση ελεύθερη διαδρομή 5 έως 50 mm.

4.12 Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μαζών

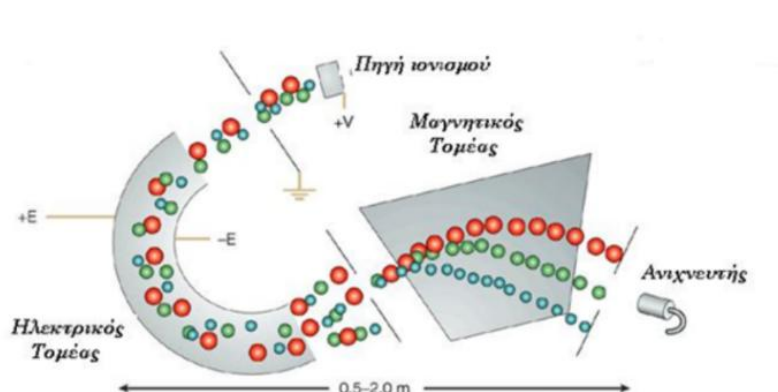
Οι τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στην φασματομετρία μάζας είναι η τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan, FS) και η τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM). Στην τεχνική πλήρους σάρωσης λαμβάνονται πλήρη φάσματα μεταξύ δύο ακραίων

τιμών m/z για καθορισμένο χρόνο. Αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης, αυξάνεται η ευαισθησία, καθώς ο συνολικός αριθμός των ιόντων που φτάνει στον ανιχνευτή αυξάνεται. Η αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται είτε με μείωση του εύρους των μαζών σάρωσης είτε με αύξηση του χρόνου σάρωσης. Στην πρώτη περίπτωση είναι δυνατόν να χαθούν αναλυτικές πληροφορίες ενώ στη δεύτερη περίπτωση μπορεί το φάσμα να μην είναι ολοκληρωμένο. Αν η ανάλυση αποσκοπεί στην ανίχνευση συστατικών γνωστών αναλυτικών φασματικών χαρακτηριστικών, αλλά με μέγιστη ευαισθησία, χρησιμοποιείται η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων. Έτσι, για ένα συγκεκριμένο συστατικό επιλέγονται κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του, οπότε ο αναλυτής μεταβαίνει ταχύτατα από τη μια μάζα στην άλλη [228-233].

4.13 Αναλυτής μάζας μαγνητικού τομέα

4.13.1 Βασικές αρχές της μέτρησης [229]

Στο παρακάτω σχήμα παρουσιάζονται τα κύρια μέρη ενός φασματογράφου μάζας μαγνητικού τομέα.



Σχήμα 4.12: Φασματογράφος μάζας μαγνητικού τομέα.

Η διαδικασία λειτουργίας του είναι η ακόλουθη:

1. Μια μικρή ποσότητα της ένωσης, συνήθως ένα μmole ή λιγότερο εξατμίζεται. Ο ατμός οδηγείται στο θάλαμο ιονισμού όπου η πίεση διατηρείται στα 10^{-7} mbar.
2. Τα μόρια σε μορφή ατμού ιονίζονται από μία δέσμη ηλεκτρονίων. Μια θερμαινόμενη κάθοδος, το πυρακτωμένο νήμα, παράγει αυτή τη δέσμη. Ο ιονισμός επιτυγχάνεται κυρίως από επαγωγικά φαινόμενα παρά από άμεσες συγκρούσεις. Με την απώλεια ηλεκτρονίων στιβάδας, παράγονται πολλά θετικά ιόντα.

3. Τα θετικά ιόντα οδηγούνται σε εξαναγκασμένη έξοδο από το θάλαμο ιονισμού με ένα μικρό θετικό φορτίο (μερικά Volts) τα οποία εφαρμόζονται στον απωθητή (repeller) απέναντι από την σχισμή A. Μετά την απομάκρυνση των ιόντων από τον θάλαμο ιονισμού, αυτά επιταχύνονται από ένα ηλεκτροστατικό πεδίο ($A > B$) μερικών εκατοντάδων ή χιλιάδων volt πριν να εισαχθούν στον αναλυτή.
4. Ο διαχωρισμός των ιόντων λαμβάνει χώρα στον αναλυτή σε πίεση περίπου 10^{-8} mbar. Αυτός επιτυγχάνεται εφαρμόζοντας ένα ισχυρό μαγνητικό πεδίο κάθετο στην διεύθυνση της κίνησης των ιόντων. Η ταχεία κίνηση των ιόντων θα ακολουθήσει μια κυκλική τροχιά, εξαιτίας της επιτάχυνσης Lorentz της οποίας η ακτίνα ορίζεται από τον λόγο μάζας/φορτίο του ιόντος και της ισχύος του μαγνητικού πεδίου. Τα ιόντα με διαφορετικούς λόγους μάζας/φορτίο κατευθύνονται διαμέσου της εξόδου – σχισμής μεταβάλλοντας το δυναμικό ή μεταβάλλοντας την ισχύ του μαγνητικού πεδίου.
5. Όταν τα ιόντα περάσουν την έξοδο–σχιμή, συγκρούονται, με ένα συλλογέα-ηλεκτρόδιο. Το παραγόμενο ρεύμα ενισχύεται και καταγράφεται ως συνάρτηση της ισχύος του μαγνητικού πεδίου ή του επιταχυνόμενου voltage.

4.13.2 Εισαγωγή του δείγματος

Όπως προαναφέρθηκε μια ένωση εισάγεται στον φασματογράφο μάζας με τη μορφή ατμού από το δοχείο. Σε αυτό το δοχείο η πίεση είναι 10 με 20 φορές μεγαλύτερη από το θάλαμο ιονισμού. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνουμε ένα συνεχές ρεύμα από μόρια σε μορφή ατμού τα οποία κατευθύνονται προς το φασματοφωτόμετρο. Για τις ενώσεις με σημείο ζέσεως κάτω από $150\text{ }^{\circ}\text{C}$, η απαραίτητη ποσότητα δείγματος εξαερώνεται σε θερμοκρασία δωματίου. Οι λιγότερο πτητικές ενώσεις, αν είναι θερμικά σταθερές, μπορούν να θερμανθούν.

4.13.3 Μονής εστίασης διαχωρισμός με μαγνητική εκτροπή [229]

Ο διαχωρισμός με την μέθοδο αυτή λαμβάνει χώρα με την εφαρμογή ενός μαγνητικού πεδίου κάθετο στην διεύθυνση της κίνησης των ιόντων που προέρχονται από την πηγή ιονισμού. Ακολουθούν εκτροπές (deflections) της τάξεως από 30° έως 150° . Η τροχιά των ιόντων ακολουθεί τις εξής

εφαρμοζόμενες δυνάμεις: (α) Τη δύναμη του Lorentz και (β) την φυγόκεντρο δύναμη.

$$F_L = B_z e v \quad (42)$$

όπου B είναι η ισχύς του μαγνητικού πεδίου, z είναι ο αριθμός των φορτίων, e είναι το φορτίο του ηλεκτρονίου και v είναι η ταχύτητα. Όταν διατρέχεται μια ακτινική διαδρομή καμπυλότητας r σε ένα μαγνητικό πεδίο B αυτή η δύναμη παρέχεται από την εξίσωση (43).

$$F_c = \frac{mv^2}{r_{ion}} \quad (43)$$

Η ενέργεια του ιόντος εκφράζεται ως:

$$E_{kin} = zeU = \frac{1}{2}mv^2 \quad (44)$$

όπου U είναι η επιτάχυνση του δυναμικού. Για ένα ιόν το οποίο φτάνει στον ανιχνευτή η δύναμη F_L γίνεται ίση με την F_C επομένως:

$$B_{zEV} = \frac{mv^2}{r_{ion}} \quad (45)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (45) στην εξίσωση (44) προκύπτει:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2 e}{2U} \quad (46)$$

Αξίζει να σημειωθεί ότι η μετατροπή της εξίσωσης (45) σε $mv = Bze r$ αποδεικνύει το γεγονός ότι ο μαγνητικός τομέας είναι αναλυτής ορμής και όχι αναλυτής μάζας όπως γίνεται συνήθως παραδεκτό. Η ατομική μάζα (M) ενός φορτισμένου ιόντος δίνεται από την εξίσωση

$$M = 4,83 \times 10^3 \frac{B^2 r^2}{U} \quad (47)$$

όπου η τιμή του r εκφράζεται σε cm, B σε Tesla (1 tesla = 10^4 gauss) και η U σε Volts. Για παράδειγμα μια μέγιστη δύναμη πεδίου δύο Tesla δίνει μια μέγιστη μάζα πάνω από 10.000 Dalton για ένα όργανο με ακτίνα 65 cm το οποίο λειτουργεί με ένα επιταχυνόμενο δυναμικό ίσο με 8.000V.

Η εξίσωση (46) δείχνει ότι μεταβάλλοντας είτε το B είτε το U τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z, διαχωρισμένα από το πεδίο φτάνουν στον συλλογέα. Ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος της σάρωσης μαζών είναι ο εκθετικός, γιατί έχει το πλεονέκτημα να παράγει κορυφές φασματογραφικών μαζών με σταθερό πλάτος. Οι εξισώσεις που περιγράφουν αυτή τη φόρμα σάρωσης είναι οι ακόλουθες:

$$M = m_0 e^{-kt} \quad (48) \quad \text{και} \quad tp = \frac{t_{10}}{2,303R} \quad (49)$$

όπου m_0 είναι η αρχική μάζα στο χρονικό σημείο $t=0$, M είναι η μάζα που καταγράφεται στον χρόνο t . t_p είναι το πλάτος της κορυφής μεταξύ του 5% των σημείων της, t_{10} είναι ο χρόνος που απαιτείται για τη σάρωση μιας δεκάδας μαζών (για παράδειγμα από m/z 500 έως m/z 50) και R είναι η διακριτική ικανότητα (resolving power) μετρημένη με τον ορισμό της κοιλάδας 10% (10% valley definition).

Η σάρωση του επιταχυνόμενου δυναμικού φαινομενικά πλεονεκτεί γιατί διαθέτει ταχύτητα και ευκολία ελέγχου, αλλά προκαλεί «αποεστίαση» και μείωση της ευαισθησίας και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται σπάνια.

4.13.4 Διαχωρισμός διπλής εστίασης [229, 234]

Επειδή τα όργανα φασματοφωτομετρίας διαχωρίζουν τα ιόντα με βάση την ορμή των ιόντων με μικρή διαφορά στην κινητική ενέργεια δεν εστιάζονται στο ίδιο σημείο. Τα πρώτα εμπορικά όργανα διπλής εστίασης ήταν κατασκευασμένα με τον ηλεκτρικό τομέα πριν από τον μαγνητικό. Αυτή η δομή καλείται εμπρόσθια γεωμετρία (forward Geometry). Σήμερα όλοι οι κατασκευαστές των οργάνων ακολουθούν την δομή με τον μαγνητικό τομέα να βρίσκεται τοποθετημένος μετά από την πηγή ιονισμού και ο ηλεκτρικός τομέας να ακολουθεί και να βρίσκεται πριν από τον ανιχνευτή ιόντων. Η γεωμετρία αυτή καλείται ανάστροφη γεωμετρία. Το πλεονέκτημα που έχει η ανάστροφη γεωμετρία σε σύγκριση με την εμπροσθη γεωμετρία είναι ότι είναι πιο εύκολο για να χρησιμοποιήσουμε το όργανο για μέτρηση MS/MS.

Τα ιόντα επιταχύνονται εκτός της πηγής ιονισμού και εισέρχονται σε μία κυψελίδα διάσπασης. Τα παραγόμενα ιόντα από όλα τα ιόντα με όλο το εύρος τιμών m/z σχηματίζονται στην κυψελίδα διάσπασης. Τα παραγόμενα ιόντα

έχουν την ίδια ταχύτητα με τα πρόδρομα ιόντα από τα οποία σχηματίστηκαν. Ο μαγνητικός τομέας μπορεί να οριστεί με μια σταθερή ισχύ πεδίου επιτρέποντας μόνο στα ιόντα με μια μεμονωμένη ταχύτητα να φτάσουν στον ανιχνευτή. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σάρωση στον ηλεκτρικό τομέα για να παραχθεί το φάσμα των παραγόμενων ιόντων ή να ορισθεί μια συγκεκριμένη ισχύς πεδίου έτσι ώστε να επιτρέπεται μόνο στα παραγόμενα ιόντα ορισμένου λόγου m/z να περάσουν και να φτάσουν στον ανιχνευτή σε ένα πείραμα μεμονωμένης παρακολούθησης ιόντων.

Τα όργανα διπλής εστίασης φασματογραφίας – μάζας, πλεονεκτούν έναντι αυτών με φασματογράφο χρόνου πτήσης (time of flight) γιατί μπορούν να λειτουργήσουν με μεταβαλλόμενες τιμές της διακριτικής τους ικανότητας. Στα σύγχρονα όργανα διπλής εστίασης, τα ιόντα διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο m/z στον μαγνητικό τομέα ανάλογα με την ορμή τους. Τα ιόντα σε συγκεκριμένες τιμές ορμής εισάγονται στον ηλεκτρικό τομέα. Ο ηλεκτρικός τομέας μπορεί να συντονιστεί έτσι ώστε να περιορίζεται το εύρος της ενέργειας των ιόντων τα οποία θα περάσουν στον ανιχνευτή. Η διαδικασία αυτή καλείται με τον αγγλικό όρο slit – widths. Όσο πιο περιορισμένη είναι αυτή η ρύθμιση τόσο υψηλότερη είναι η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου. Αυτό σημαίνει ότι οι διαφορές στις τιμές m/z που μπορούν να διαχωριστούν γίνονται μικρότερες όσο μεγαλύτερη γίνεται η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου. Το πρόβλημα είναι ότι ο αριθμός των ιόντων μιας ορισμένης τιμής m/z και αυτά έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερα όρια ανίχνευσης. Όταν το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης είναι επιθυμητό στοιχείο στο πείραμα το όργανο θα πρέπει να λειτουργεί με χαμηλότερη διακριτική ικανότητα. Όταν η ακρίβεια μάζας και ο διαχωρισμός των ιόντων είναι η κινητήρια δύναμη του πειράματος το όργανο πρέπει να λειτουργεί με υψηλή διαχωριστική ικανότητα.

Συνοψίζοντας, τα όργανα διπλής εστίασης είναι ανιχνευτές φασματογράφων μάζας με τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

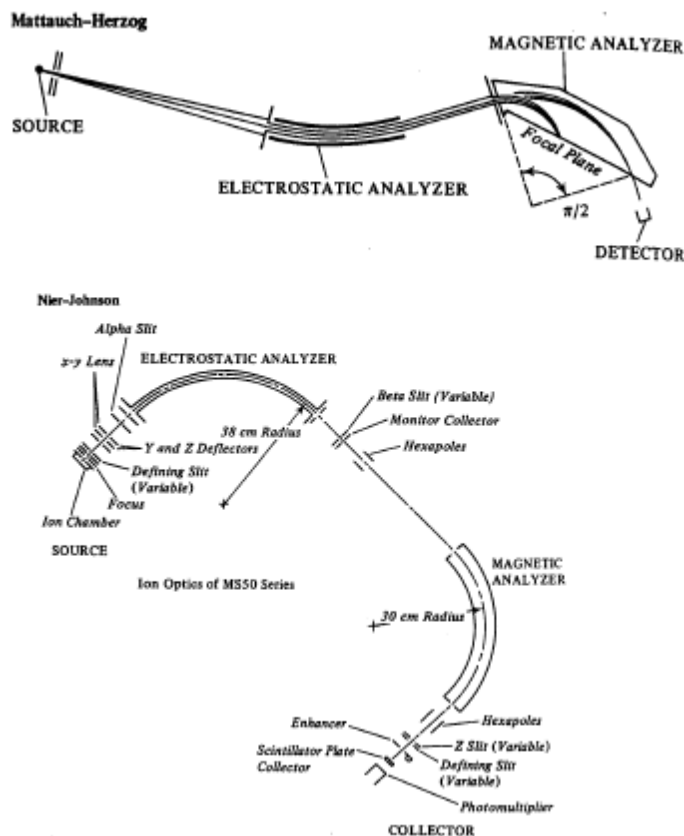
- Κλασικής μορφής φάσματα μάζας
- Πολύ καλή επαναληψιμότητα
- Καλύτερη ποιοτική απόδοση φασμάτων μάζας σε σύγκριση με τους άλλους τύπους οργάνων φασματογραφίας μάζας.
- Υψηλή διακριτική ικανότητα

- Υψηλή ευαισθησία
- Μεγάλο δυναμικό εύρος
- Ικανότητα για πειράματα MS/MS
- Υψηλή ενέργεια επαγωγικής διάσπασης μετά από σύγκρουση με εξαιρετικά επαναλήψιμα φάσματα μάζας.

Το κύριο μειονέκτημα των οργάνων αυτών είναι η υψηλή τιμή αγοράς, τα μεγάλα έξοδα συντήρησης, και η απαίτηση υψηλής κατάρτισης αναλυτών για τη λειτουργία τους.

4.13.5 Γεωμετρίες που χρησιμοποιούνται στα όργανα διπλής εστίασης [234,235]

Δύο γεωμετρίες χρησιμοποιούνται για τα όργανα διαχωρισμού διπλής εστίασης: (α) η Mattauch Herzog στην οποία μπορεί να τοποθετηθεί μια εστιακή επιφάνεια. και (β) η Nier-Johnson για όργανα καταγραφής της ηλεκτρικής ενέργειας



Σχήμα 4.13: Οι δύο διαφορετικές γεωμετρίες που χρησιμοποιούνται στα όργανα διπλής εστίασης [235].

Αναλυτικότερα στη γεωμετρία Mattauch Herzog μια δέσμη ηλεκτρονίων που παράγεται από ένα θερμαινόμενο νήμα διαμέτρου 0,01 εκατοστά και

κατασκευασμένο από νήμα βολφραμίου-ρήνιου κινείται σε μια διαδρομή σχήματος φουρκέτας. Η γεωμετρία Mattauch-Herzog αποτελείται από έναν ηλεκτρικό τομέα $31,82^\circ$, που ακολουθείται από μαγνητικό τομέα καμπυλότητας 90° και αντίθετης κατεύθυνσης. Η είσοδος των ιόντων, που είναι ταξινομημένα κατά κύριο λόγο από το φορτίο τους, στο μαγνητικό πεδίο παράγει μια ενέργεια εξαιτίας του φαινομένου εστίασης η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από ένα τυπικό φίλτρο ενέργειας. Αυτή η γεωμετρία χρησιμοποιείται συχνά σε εφαρμογές με υψηλή ενεργειακή διαφορά στα ιόντα που παράγονται όπου απαιτείται υψηλή ευαισθησία. Το πλεονέκτημα αυτής της γεωμετρίας πάνω από την Nier-Johnson γεωμετρία είναι ότι τα ιόντα των διαφορετικών μαζών επικεντρώνονται στην ίδια επίπεδη επιφάνεια. Αυτό επιτρέπει τη χρήση μιας φωτογραφικής πλάκας ή άλλες επίπεδες συστοιχίες ανιχνευτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5°

Ποσοτική ανάλυση στην τεχνική GC-MS

5.1 Εισαγωγή

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα παρουσιαστούν όλες οι πιθανές τεχνικές ποσοτικοποίησης ώστε να εξαχθεί ένα ορθό αποτέλεσμα με τη μικρότερη δυνατή αβεβαιότητα. Επίσης, θα παρουσιαστούν όλες οι σχετικές διεργασίες για την αξιολόγηση ως προς την ορθότητα και την πιστότητα μίας μεθόδου.

5.2 Τεχνικές ποσοτικοποίησης

5.2.1 Μέθοδος εξωτερικών προτύπων

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη βαθμονόμηση με χρήση προτύπων εργασίας του αναλύτη, διαλυμένα στον κατάλληλο διαλύτη. Οι συγκεντρώσεις των προτύπων πρέπει να είναι ομοιόμορφα κατανεμημένες στη γραμμική περιοχή και οπωσδήποτε να περικλείουν τις αναμενόμενες συγκεντρώσεις αγνώστων. Η συγκέντρωση του αραιού προτύπου θα πρέπει να είναι ίση με την τιμή του ορίου ποσοτικοποίησης του οργάνου, ενώ η αντίστοιχη του πυκνότερου πρότυπου ίση με τη συγκέντρωση που αντιστοιχεί στην ανώτερη τιμή της γραμμικής περιοχής. Από τα ζεύγη τιμών υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων και γίνεται ο υπολογισμός των άγνωστων συγκεντρώσεων. Η συχνότητα κατασκευής της καμπύλης αναφοράς εξαρτάται από την ανθεκτικότητα της μεθόδου [228,236].

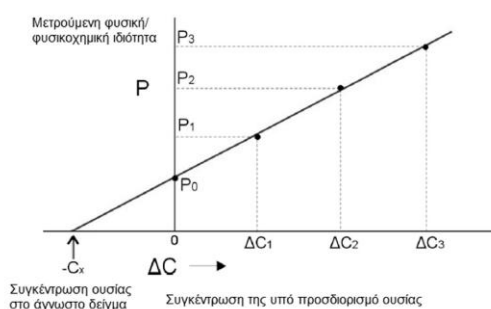
5.2.2 Μέθοδος καμπύλης προσαρμοσμένης στη μήτρα του δείγματος

Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις όπου το μητρικό υλικό του δείγματος ασκεί μεγάλη επίδραση στο λαμβανόμενο σήμα και δεν είναι δυνατή η παρασκευή προτύπων όμοιας σύστασης με τα άγνωστα. Απαιτείται γραμμική σχέση της καμπύλης βαθμονόμησης και υποχρεωτική διέλευση από την αρχή των αξόνων. Εκτελείται μέτρηση του σήματος του αγνώστου P_0 , προσθήκη στο άγνωστο προτύπων διαφορετικών συγκεντρώσεων C_x του αναλύτη, έτσι ώστε να προκύψει γνωστή αύξηση της συγκέντρωσης ΔC και ακολούθως επαναμέτρηση του σήματος P_1 . Με τη συγκεκριμένη τεχνική δεν απαιτείται η γνώση της κλίσης b της καμπύλης βαθμονόμησης. Η επιλογή της συγκέντρωσης των προστιθέμενων προτύπων πρέπει να είναι τέτοια ώστε $\Delta C/C_x = 0,5-2$.

Με τη συγκεκριμένη τεχνική είναι δυνατόν να αντιμετωπιστούν μία σειρά παρεμποδίσεων που αφορούν το μητρικό υλικό. Παρόλα αυτά απαιτείται γνώση της περιεκτικότητας των αγνώστων δειγμάτων καθώς και υπερκάθαρα αντιδραστήρια. Αποτελεί εύκολη τεχνική ποσοτικοποίησης, αλλά αυξάνει το χρόνο ανάλυσης [228,236].

5.2.3 Μέθοδος γνωστών πολλαπλών προσθηκών

Είναι βελτιωμένη επέκταση της μεθόδου προσθήκης απλής γνωστής ποσότητας. Μετρείται το άγνωστο δείγμα και δίνει σήμα P_0 . Στη συνέχεια σε N ίσα υποδείγματα προστίθενται διαφορετικές γνωστές ποσότητες προτύπου του αναλύτη, χωρίς σημαντική μεταβολή του όγκου, ώστε να προκύψουν γνωστές αυξήσεις ΔC_i , και μετρείται το σήμα P_i . Για το διάγραμμα P_i ως προς ΔC_i υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης [228,236]:



Σχήμα 5.1: Τυπική καμπύλη γνωστών πολλαπλών προσθηκών.

$$P_i = a + b\Delta C_i, \text{ οπότε } C_x = P_0/b \quad (50)$$

5.2.4 Μέθοδος εσωτερικού προτύπου

Η χρήση της μεθόδου εσωτερικού προτύπου βρίσκει ιδιαίτερη εφαρμογή στην τεχνική της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας.

Οι βασικές αρχές του εσωτερικού προτύπου στις χημικές αναλύσεις βασίζονται στην προσθήκη γνωστής ποσότητας ενός ή περισσότερων στοιχείων ως εσωτερικό πρότυπο σε όλα τα λευκά, στα διαλύματα βαθμονόμησης και στα προς ανάλυση δείγματα. Το στοιχείο που χρησιμοποιείται ως εσωτερικό πρότυπο θα πρέπει να μην περιέχεται στα δείγματα και να εμφανίζει παρόμοιες κινητικές, θερμοδυναμικές και θερμοχημικές ιδιότητες με τον αναλύτη.

Η συγκεκριμένη τεχνική ποσοτικοποίησης εφαρμόζεται στην περίπτωση που αναμένονται μεταβολές στην ευαισθησία της μετρητικής διάταξης από μέτρηση σε μέτρηση, σε μη απόλυτα επαναλαμβανόμενη επίδραση του μητρικού υλικού του δείγματος, και σε δείγματα που παρουσιάζουν ετερογενή συμπεριφορά.

Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιείται με μέτρηση του λόγου σήματος αναλύτη προς εσωτερικό πρότυπο ύστερα από την προσθήκη της ίδιας ποσότητας εσωτερικού προτύπου σε όλα τα διαφορετικά πρότυπα και δείγματα. Η σταθερή συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου επιλέγεται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να δίνει ένταση σήματος ίση με την αντίστοιχη που παρέχει το κεντροειδές πρότυπο της καμπύλης αναφοράς του αναλύτη. Η επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης εσωτερικού προτύπου παίζει σπουδαίο ρόλο στην σωστή εφαρμογή της συγκεκριμένης τεχνικής ποσοτικοποίησης γιατί σε διαφορετική περίπτωση μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα αποτελέσματα [237]. Παράμετροι όπως ο συντελεστής συσχέτισης, η ανάκτηση και η πιστότητα υπολογίζονται για να ελεγχθεί εάν ο αναλύτης και το εσωτερικό πρότυπο παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά. Ακριβής περιγραφή των πειραματικών δεδομένων που απαιτούνται για την επιλογή του κατάλληλου εσωτερικού προτύπου παρουσιάζεται στην εργασία των Mermet και Ivaldi [238].

5.3 Αξιολόγηση-επικύρωση μεθόδου

Η αξιολόγηση της αναλυτικής μεθόδου επιτυγχάνεται ακολουθώντας τα κριτήρια που επιβάλλει η επικύρωσή της. Η ορθότητα, η πιστότητα, η γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, η εκλεκτικότητα και η ανθεκτικότητα είναι οι παράμετροι εκείνοι που πρέπει να υπολογιστούν ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της μεθόδου.

Η ορθότητα της μεθόδου ελέγχεται είτε με προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης αναλύτη σε δείγμα και υπολογισμό της ανάκτησης (Εξίσωση 51), είτε με ανάλυση πιστοποιημένου υλικού αναφοράς, είτε με συμμετοχή σε διεργαστηριακές δοκιμές ικανότητας.

$$\% R = [(C_{\text{εμβ}} - C_{\text{αγν}})/\Delta C] \cdot 100 \quad (51)$$

όπου $C_{\text{εμβ}}$ η συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος

$C_{\text{αγν}}$ η συγκέντρωση του αγνώστου δείγματος

ΔC η γνωστή μεταβολή μετά την προσθήκη γνωστής συγκέντρωσης αναλύτη

Η πιστότητα της μεθόδου εκφράζεται μέσα από πειράματα επαναληψιμότητας (πολλαπλή μέτρηση δειγμάτων σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων) και αναπαραγωγιμότητας (πολλαπλή μέτρηση δειγμάτων σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων είτε σε διαφορετικές ημέρες είτε από άλλο αναλυτή είτε με τη χρήση διαφορετικού οργάνου) και υπολογισμό της επί τοις εκατό σχετικής τυπικής απόκλισης (%Relative Standard Deviation ή %RSD).

Η γραμμικότητα ελέγχεται με υπολογισμό του συντελεστή συσχέτισης, αφού ακολουθηθεί κάποια από τις τεχνικές ποσοτικοποίησης που περιγράφηκαν στην ενότητα 5.2.

Για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης (Limit of detection ή LOD) του οργάνου ή της μεθόδου μετρώνται 10 λευκά δείγματα αντιδραστηρίων ή μήτρας μηδενικής συγκέντρωσης αναλύτη. Στη συνέχεια, υπολογίζεται το LOD του οργάνου από τη σχέση (52):

$$LOD = \frac{3,3 \times SD}{b} \quad (52)$$

όπου SD, η τυπική απόκλιση των 10 λευκών δειγμάτων αντιδραστηρίων ή μήτρας και b, η κλίση της καμπύλης υδατικών διαλυμάτων. Εναλλακτικά, ο υπολογισμός του ορίου ανίχνευσης μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με πολλαπλό προσδιορισμό προτύπου χαμηλής συγκέντρωσης και υπολογισμό της τυπικής απόκλισης και εφαρμογή της ίδιας εξίσωσης είτε από την καμπύλη αναφοράς μέσω του υπολογισμού της τυπικής απόκλισης της τομής είτε τέλος από την τυπική απόκλιση των υπολοίπων της καμπύλης αναφοράς.

Για τον υπολογισμό του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου, η κλίση b προέρχεται από την καμπύλη προσαρμοσμένης στη μήτρα (αν αυτή επηρεάζει τον αναλύτη) και το αποτέλεσμα που προκύπτει πολλαπλασιάζεται με τον όγκο αραίωσης και διαιρείται με τη μάζα του λευκού δείγματος. Αντίστοιχα προκύπτουν και τα όρια ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification ή LOQ) του οργάνου και της μεθόδου με μόνη διαφορά ότι ο συντελεστής στην εξίσωση 52 ισούται με 10.

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου είναι χρήσιμη σε τεχνικές εκλεκτικού προσδιορισμού συγκεκριμένης μορφής αναλύτη και αφορά το ποσοστό της μη επιθυμητής μορφής του αναλύτη που είναι δυνατό να προσδιορισθεί. Τέλος η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμάται με υπολογισμό της διαφοροποίησης της ανάκτησης του αναλύτη όταν μικρές διαφοροποιήσεις των αναλυτικών συνθηκών λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της αναλυτικής πορείας.

Όλες αυτές οι παράμετροι πρέπει να συνεκτιμηθούν έτσι ώστε να κριθεί αν η μέθοδος είναι κατάλληλη για το σκοπό που αναπτύχθηκε, όπως θα φανεί από τη συνέχεια της συγκεκριμένης μελέτης [236,239].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό έμμονων οργανικών ρύπων (PCBs-DDTs) με στόχο τη μελέτη της έκθεσης του ανθρώπου στους συγκεκριμένους ρύπους, καθώς μια τέτοια μελέτη είναι ιδιαίτερης σημασίας για την προστασία της δημόσιας υγείας και της εκτίμησης κινδύνου. Για το σκοπό αυτό συλλέχθηκαν δείγματα τρίχας τα οποία κρίνονται κατάλληλα και σημαντικά μέσα [240] για την παρακολούθηση και την αξιολόγηση της έκθεσης σε ρύπους. Η χρησιμότητα της τρίχας ως χρήσιμο βιολογικό δείγμα για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου σε ρύπους φαίνεται και από το γεγονός ότι ήδη από το 2001 η Υπηρεσία Καταγραφής Τοξικών Ουσιών και Ασθενειών (ATSDR, ΗΠΑ), σε συνάντηση που πραγματοποίησε αναθεώρησε τη χρησιμότητα της και την έκρινε ως ισάξιο βιολογικό δείγμα με τα ούρα και το αίμα [241]. Ένα από τα κρίσιμα ερωτήματα που απασχόλησε την επιτροπή αφορά το γεγονός της διάκρισης μεταξύ ενδογενών και από εξωγενών ρύπων, του υπολογισμού δηλαδή του ποσοστού οργανικών ρύπων που οφείλεται σε χορηγηθείσα δόση σε πειραματόζωα και της αντίστοιχης που οφείλεται στο περιβάλλον. Οι τρίχες είναι ιδιαίτερη χρήσιμη μήτρα για τον προσδιορισμό PCBs και DDTs, εξαιτίας της λιποφιλικότητας των συγκεκριμένων ενώσεων και για το λόγο αυτό υπήρξαν πολλές μελέτες που αφορούσαν τη χρήση δειγμάτων τρίχας για τη μελέτη της έκθεσης του ανθρώπου και των ζώων σε τέτοιου είδους ρύπους [240-249].

Οι έμμονοι οργανικοί ρύποι συνεχίζουν να ανιχνεύονται σε νερό, έδαφος, ιζήματα καθώς και σε βιολογικά δείγματα και μάλιστα λόγω της ικανότητας τους μεταφορά και βιοσυσσώρευση έχουν ανιχνευτεί ακόμα και σε μεγάλες αποστάσεις από αποδεδειγμένες πηγές εκπομπής τους. Η κύρια τεχνική που χρησιμοποιείται μέχρι σήμερα για την ανάλυση των χλωριωμένων ενώσεων είναι η αεριοχρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας ή σύλληψης ηλεκτρονίων. Στην παρούσα εργασία προτάθηκε για πρώτη φορά η χρήση της τεχνικής της αεριοχρωματογραφίας συζευγμένης με διπλής εστίασης με ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας υψηλής διακρισιμότητας και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα απλού τετραπόλου. Με τον τρόπο αυτό επιτεύχθηκε υψηλή ακρίβεια και χαμηλά όρια

ανίχνευσης για τη μέθοδο και έτσι έγινε δυνατή η ανίχνευση ακόμα και ιχνοποσοτήτων των συγκεκριμένων χημικών ρύπων σε δείγματα τρίχας. Επίσης στη συγκεκριμένη μελέτη επιτεύχθηκε για πρώτη φορά η ανάπτυξη γρήγορης προκατεργασίας με μόνο ένα στάδιο εκχύλισης με την τεχνική HS-SPME για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τόσο των DDTs όσο και των PCBs. Οι μέθοδοι εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό έμμονων οργανικών ρύπων σε δείγματα τρίχας που συλλέχτηκαν από διάφορους εθελοντές και από διάφορες αγροτικές και αστικές περιοχές της Ελλάδας, αλλά και από διαφορετικές ομάδες πληθυσμού ώστε να συνεκτιμηθούν διάφοροι παράγοντες και να εξαχθεί ένα ολοκληρωμένο συμπέρασμα ως προς την έκθεση του πληθυσμού στου συγκεκριμένους ρύπους.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7°

Εκτίμηση της έκθεσης της ανθρώπινης τρίχας σε PCBs με χρήση της τεχνικής αεριοχρωματογραφίας υψηλής διακριτικής ικανότητας (διπλής εστίασης) με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών

7.1 Εισαγωγή

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εκτιμηθεί η έκθεση του πληθυσμού από δύο αγροτικές περιοχές της Ελλάδας σε έμμονους οργανικούς ρύπους, κυρίως PCBs. Για το λόγο αυτό δύο διαφορετικές μέθοδοι αναπτύχθηκαν, επικυρώθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους ώστε να καταστεί εύκολος ο προσδιορισμός των συγκεκριμένων ρύπων ακόμα και σε πολύ χαμηλές περιεκτικότητες. Οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας με απλό τετράπολο (GC-MS) και η τεχνική της αεριοχρωματογραφίας διπλής εστίασης με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών υψηλής διακρισιμότητας (GC-DFHRMS).

7.2 Συλλογή δειγμάτων

Σαράντα τέσσερα δείγματα τρίχας συλλέχθηκαν από ανθρώπους που ζουν σε δύο διαφορετικές αγροτικές περιοχές της Ελλάδας (Κρήτη και Ηλεία, Πελοπόννησος) κατά τη διάρκεια της περιόδου 2006-2008. Από αυτά δεκαεννέα δείγματα ήταν από την Κρήτη και είκοσι πέντε δείγματα από την περιοχή της Ηλείας. Περίπου 200-400 mg τρίχας λήφθηκαν από το κεφάλι εθελοντών που συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη. Το μήκος των τριχών-δειγμάτων κυμαίνονταν από 3 έως 16 εκατοστά. Όλα τα δείγματα τριχών κωδικοποιήθηκαν κατάλληλα και αποθηκεύτηκαν σε χάρτινους φακέλους σε θερμοκρασία περιβάλλοντος μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία και ανάλυσή τους. Όλοι οι συμμετέχοντες ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης και τα δείγματα λήφθηκαν με τη συγκατάθεσή τους.

7.3 Αντιδραστήρια

Η χημική ομάδα των PCB (28, 52, 101, 118, 138, 153 και 180) αγοράστηκαν από την εταιρεία Fluka analytical-Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, 3050, Spruce Street, St. Louis, USA). Οι διαλύτες διχλωρομεθάνιο, κ-επτάνιο (Merck, Darmstadt, Γερμανία) και κ-εξάνιο (Sigma-Aldrich, Steinheim, Γερμανία) ήταν ποιότητας HPLC. Για την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) χρησιμοποιήθηκε πηκτή πυριτίας 60-200 Mesh, 150A, οξείδιο του αλουμινίου Type WB-2 basic (Sigma-Aldrich, 3050, Spruce Street, St. Louis, USA) και

θειικό οξύ 95-98% (Mallinckrodt, St. Louis, USA). Η υπερφθοροτριβουτυλαμίνη (FC43) αγοράστηκε από την Scientific Instrument Services (SIS), 1027 Old York Rd., Ringoes, NJ, USA.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν σε διαλύτη εξάνιο για κάθε PCB σε συγκέντρωση από 1,0 έως 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και αποθηκεύθηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Τα μεικτά διαλύματα εργασίας των PCBs παρασκευάστηκαν σε εξάνιο και σε τελικές συγκεντρώσεις 0, 0,83, 1,25, 2,5, 5, 10, 50 και 100 ng/ml και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι στους $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.4 Μέθοδος εκχύλισης

200 mg από δείγματα τρίχας πλύθηκαν δύο φορές με υπερκαθαρό νερό (Milli Q) για 5 λεπτά και με εξάνιο για 30 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια κοβόντουσαν σε μικρά κομμάτια (2-3 mm). 3 mL εξανίου προστέθηκε σε κάθε δείγμα και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων (για 3 ώρες στους $40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε μία φορά και η προκύπτουσα ανώτερη στιβάδα (6 ml εξανίου) μεταφέρθηκε σε στήλες SPE για καθαρισμό. Οι στήλες SPE που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πληρωμένες με 250 mg απενεργοποιημένου Al_2O_3 και 500 mg οξινομένης πυριτίας. Η τροποποιημένη πηκτή πυριτίας παρασκευάστηκε ως εξής: 27 mL πυκνού θειικού οξέος (95-98%) προστέθηκαν (στάγδην) σε 50 g πηκτής πυριτίας και μείγμα αναδεύτηκε για να εξασφαλιστεί καλή ομοιογένεια. Η οξινομένη πυριτία αναδεύτηκε περαιτέρω για 30 λεπτά. Το απενεργοποιημένο Al_2O_3 και η πηκτή πυριτίας θερμάνθηκαν στους $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 2 ώρες πριν από τη χρήση τους. Τα φυσίγγια SPE ενεργοποιήθηκαν με την προσθήκη 2 mL μείγματος κ-εξανίου: διχλωρομεθανίου (4: 1, v/v), ενώ για την έκλουση χρησιμοποιήθηκαν 2 mL μείγματος κ-εξανίου: διχλωρομεθανίου (1: 1 v/v) [210]. Τέλος, το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε ήπιο ρεύμα αζώτου και ανασυστάθηκε με την προσθήκη 70 μL επτανίου.

7.5 Αναλυτικές τεχνικές

7.5.1 Ανάλυση με χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS

Η τεχνική της GC-DFHRMS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του συστήματος DFS High Resolution GC/MS συζευγμένο με ένα αέριο χρωματογράφο TRACE GC Ultra (Thermo Scientific, West Palm Beach, USA), που είναι εξοπλισμένο με τον αυτόματο δειγματολήπτη TriPlusTM με ένα εισαγωγέα τύπου Split / splitless.



Σχήμα 7.1: Το σύστημα FS High Resolution GC/MS (Thermo Scientific, West Palm Beach, USA)

Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση της τριχοειδούς στήλης STX-500 (60 m × 0,25 mm × 0,15 μm), (Restek, Bellefonte, PA, USA). 2 μL τελικού εκχυλίσματος εγχύθηκαν στο σύστημα (χωρίς διαμοιρασμό ή splitless mode). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου είναι παρουσιάζεται στον πίνακα 7.1. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο 99,999% με ταχύτητα ροής 1 mL/min.

Πίνακας 7.1: Λειτουργικά και αναλυτικά χαρακτηριστικά του αεριοχρωματογράφου.

Θερμοκρασία Εισαγωγέα	260°C
Χρόνος Splitless	1,5 min
Χρόνος βαλβίδας Purge	Κλειστός για 1,2 min
Ροή αερίου Purge	50 mL/min
Στήλη χρωματογραφίας	RTX-500, Restek 60 m x 0,25 mm x 0.25 μm
Φέρον αέριο	He, καθαρότητας 99,999%
Ροή φέροντος αερίου	0,8 mL/min
Θερμοκρασιακό Πρόγραμμα	110°C για 1.0 min 20°C/min έως 200°C, 2°C/min έως 220°C 4°C/min έως 310°C για 2 min
Θερμοκρασία Γραμμής Μεταφοράς	280°C

Η έγχυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την τεχνική της βελόνας εν θερμώ (hot needle technique). Η άδεια βελόνα θερμαίνεται μέχρι τον εισαγωγέα για 2-3 s πριν από την ένεση του δείγματος, αποτρέποντας με

αυτό τον τρόπο την απώλεια των PCBs. Το υψηλής διακρισιμότητας φασματόμετρο μάζας ρυθμίστηκε στη λειτουργία πολλαπλής ανίχνευσης ιόντων (multiple ion detection ή MID) με διακριτική ικανότητα 10.000. Η ρύθμιση MID δείχνεται στον Πίνακα 7.2. Η ενέργεια της πηγής ιόντων EI ρυθμίστηκε στα 48 eV μετά από σχετική βελτιστοποίηση με αυτόματη ρύθμιση από το λογισμικό του οργάνου. Στην τεχνική MID χρησιμοποιείται μία σταθερή ένταση μαγνητικού πεδίου με ένα μεταβλητό επιταχυνόμενο δυναμικό. Για την βαθμονόμηση των μαζών ο φασματογράφος μάζας DFS χρησιμοποιεί την υπάρχουσα βαθμονόμηση από το εργοστάσιο κατασκευής πραγματοποιώντας διαδοχικές σαρώσεις. Αυτού του τύπου η βαθμονόμηση μαζών πραγματοποιείται σε κάθε σάρωση, πριν από την παρακολούθηση των εντάσεων των επιθυμητών ιόντων των υπό προσδιορισμό ενώσεων. Η τεχνική «*lockplus-cali mass technique*» ή απλά «*lock mode*» διασφαλίζει τη βέλτιστη ακρίβεια μάζας. Παράλληλα η βαθμονόμηση μετά από διαδοχικές σαρώσεις διασφαλίζει υψηλά επίπεδα εμπιστοσύνης σε ότι αφορά στα παραγόμενα αποτελέσματα.

Η διαδικασία σάρωσης των μαζών βαθμονόμησης πραγματοποιείται αυτόματα από το όργανο, χωρίς να παρεμβαίνει ο αναλυτής. Δεν απαιτείται καμία πρόσθετη ή εξειδικευμένη βαθμονόμηση. Την ίδια χρονική στιγμή το όργανο διαθέτει εσωτερική λειτουργία παρακολούθησης της διακρισιμότητας και καταγραφής αυτής σε κάθε μεμονωμένο φάκελο με τα στοιχεία του δείγματος. Μία ένωση αναφοράς διοχετεύεται από το σημείο εισαγωγής στην πηγή κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ουσία υπερφθοροτριβουτυλαμίνη (perfluoro-tributyl-amine ή FC 43). Οι ακριβείς μάζες της ένωσης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των παραθύρων MID για την εσωτερική βαθμονόμηση. Για την καλύτερη απόδοση του οργάνου, επιλέχθηκαν δύο ιόντα της ένωσης αναφοράς για κάθε παράθυρο MID. Μία μάζα λίγο μικρότερη από αυτή του ιόντος που θέλουμε να προσδιορίσουμε και μία μάζα λίγο μεγαλύτερη. Η μικρότερη μάζα αποκαλείται συμβατικά «*lock mass*» και η μεγαλύτερη μάζα «*calibration mass*».

Κατά τη διαδικασία MID, ο φασματογράφος μάζας σταθμεύει τον μαγνήτη στην αρχή κάθε MID παραθύρου και στη συνέχεια πραγματοποιεί την βαθμονόμηση χρησιμοποιώντας τις μάζες «*lock*» και «*calibration*». Στη

συνέχεια προσδιορίζει τις εντάσεις των ιόντων που θέλουμε να προσδιορίσουμε και τις εντάσεις των ιόντων του εσωτερικού προτύπου. Η βαθμονόμηση των μαζών παραμένει σταθερή για ένα πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα για την τεχνική MID.

Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στον χρόνο σάρωσης. Για να υπάρχει μία αντιπροσωπευτική και επαναλήψιμη κορυφή όταν πραγματοποιείται η ολοκλήρωση των κορυφών του χρωματογράφου μάζας ο συνολικός χρόνος σάρωσης (MID cycle time) πρέπει να επιτρέπει τη συλλογή 8 έως 10 σημείων τουλάχιστον για κάθε κορυφή. Αξίζει να σημειωθεί ότι αυτή η συνθήκη είναι προαπαιτούμενη στη μέθοδο EPA 1613 για τον προσδιορισμό των διοξινών. Ο χρόνος αυτός έχει άμεση επιρροή στον διαθέσιμο χρόνο μέτρησης (χρόνος παραμονής, dwell time) για κάθε ιόν.. Αν ο χρόνος μέτρησης MID είναι πολύ μικρός, η ευαισθησία του οργάνου επηρεάζεται αρνητικά ενώ αν είναι πολύ μεγάλος μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη ολοκλήρωση των κορυφών χρωματογραφίας.

Το λογισμικό ελέγχου του οργάνου διαθέτει επίσης ένα εύχρηστο τρόπο για να ρυθμίζονται οι χρόνοι παραμονής για τον προσδιορισμό των κορυφών των προς ανάλυση ενώσεων και των προτύπων. Η λειτουργία αυτή ονομάζεται MID Descriptor. Υπολογίζοντας τον συνολικό χρόνο σάρωσης οι χρόνοι παραμονής (dwell time) για τις επιλεχθείσες μάζες που εμφανίζονται στο παράθυρο MID υπολογίζονται αυτόματα. Οι χρόνοι παραμονής για κάθε αναλύτη όπως και οι μάζες βαθμονόμησης αυτόματα τοποθετούνται στις αναμενόμενες εντάσεις. Με τη διαδικασία αυτή υπάρχει η δυνατότητα παρέμβασης με σχετικές διορθώσεις του χρόνου μέτρησης που απαιτείται για κάθε κύκλο MID. Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παράθυρα του πίνακα 7.2.

Πίνακας 7.2: Ανίχνευση πολλαπλών ιόντων (MID) με τη χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS.

Παράθυρο MID1		Παράθυρο MID2		Παράθυρο MID3		Παράθυρο MID4	
Έναρξη	8:03 min	Έναρξη	17:06 min	Έναρξη	31:27 min	Έναρξη	37:06 min
Μέτρηση	9:03 min	Μέτρηση	14:21 min	Μέτρηση	5:38 min	Μέτρηση	2:53 min
Τέλος	17:06 min	Τέλος	31:27 min	Τέλος	37:06 min	Τέλος	40:00 min
Χρόνος κύκλου	0,70 s	Χρόνος κύκλου	0,80 s	Χρόνος κύκλου	0,80 s	Χρόνος κύκλου	0,80 s
Στοχευμένες Μάζες	Χρόνος υστέρησης	Στοχευμένες Μάζες	Χρόνος υστέρησης	Στοχευμένες Μάζες	Χρόνος υστέρησης	Στοχευμένες Μάζες	Χρόνος υστέρησης
180	1,00	250	1	357	1	424	1
188,0388	28,00	255,9609	29	359,8415	44	425,9770 l	8
190,036	28,00	257,958	29	361,8135	44	427,763	53
200,079	28,00	263,9866 l	7	363,9802 l	11	429,76	53
202,076	28,00	268,001	29	371,8817	44	439,803	53
213,9897 l	28,00	269,998	29	373,8788	44	441,8	53
222	5,00	289,9221	29	393,8025	44	461,724	53
223,997	28,00	291,9194	29	395,7995	44	463,721	53
234,04	28,00	301,9597	29	405,8428	44	463,9738 c	8
236,037	28,00	303,9597	29	407,8398	44	473,764	53
255,961	28,00	323,8834	29	413,9770 c	4	475,761	53

257,958	28,00	325,8804	29	427,763	44	495,685	53
268,001	28,00	335,9237	29	429,76	44	497,682	53
269,998	28,00	337,9207	29	439,803	44	507,725	53
283,81	28,00	359,8415	29	441,8	44	509,722	53
285,807	28,00	361,8385	29	461,724	44		
289,83	28,00	371,8817	29	463,721	44		
291,827	28,00	373,8788	29				
301,9626	28,00	393,8025	29				
303,9597	28,00	395,7995	29				
313,9834 c	5,00	405,8428	29				
		407,8398	29				
		413,9770	7				

7.5.2 Ανάλυση με χρήση της τεχνικής GC-MS

Ο προσδιορισμός των PCBs στα εκχυλίσματα τριχών πραγματοποιήθηκε και με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή φασματόμετρο μαζών με πηγή ιόντων EI. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αεριοχρωματογραφικό σύστημα GC-QP2010 (Shimadzu, Κιότο, Ιαπωνία), ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση τριχοειδούς στήλης Equity TM-5 (30 m×0,20 mm×0,20 μm) της εταιρείας Supelco (Supelco, Bellefonte, USA). Η επιλογή της χρωματογραφικής στήλης αποτέλεσε ένα πολύ σημαντικό στοιχείο για την ομαλή πορεία του πειράματος. Με δεδομένο ότι ο κύριος στόχος ήταν η επίτευξη όσο το δυνατόν χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης, δηλαδή όσο το δυνατόν μεγαλύτερου λόγου σήματος προς θόρυβο (signal to noise ratio), ο θόρυβος ο οποίος προέρχεται από τη στήλη θα έπρεπε να είναι ο μικρότερος δυνατός.

Οι τριχοειδείς χρωματογραφικές στήλες παρουσιάζουν θόρυβο όταν η στατική φάση παρουσιάζει φαινόμενα γήρανσης, κυρίως σε υψηλές θερμοκρασίες και οι διαφορετικές χημικές ομάδες που την αποτελούν αποσυντίθενται και μεταναστεύουν ελεύθερες στην αέρια κινητή φάση. Με την προώθηση της αέριας κινητής φάσης στον ανιχνευτή, αυτές γίνονται εμφανείς στο παραγόμενο χρωματογράφημα με τη μορφή σήματος ή ιόντων στην περίπτωση που έχουμε συνδέσει στο χρωματογραφικό σύστημα ως ανιχνευτή ένα φασματογράφο μάζας. Αυτό το σήμα, όταν είναι μεγάλο, καταγράφεται ως θόρυβος και μειώνει το λόγο σήματος προς θόρυβο και κατά συνέπεια τα ελάχιστα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα ελάχιστα όρια ποσοτικοποίησης. Οι κατασκευαστικές εταιρείες χρωματογραφικών στηλών παρουσιάζουν συνεχώς νέα προϊόντα στον τομέα αυτό και χαρακτηρίζουν τις στήλες αυτές με τον αγγλικό όρο «low bleed» που θα μπορούσε να αποδοθεί στην ελληνική γλώσσα ως «χαμηλής γήρανσης» ή «χαμηλής επίδρασης επιμόλυνσης της κινητής φάσης».

Οι χρωματογραφικές στήλες «low bleed» είναι απαραίτητες στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Χαμηλές συγκεντρώσεις σε φασματογραφικές αναλύσεις. Ειδικότερα δε, όταν πραγματοποιούμε πλήρη σάρωση, παρακολούθηση μεμονωμένου ιόντος ή φασματοφωτομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας.

- Όταν ο ανιχνευτής είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε επιμολύνσεις, όπως ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων.

- Όταν η επιμόλυνση που προέρχεται από τη χρωματογραφική στήλη επηρεάζει την ορθή ποσοτικοποίηση στη σπάνια περίπτωση που οι αναλύτες και οι χημικές ομάδες που προέρχονται από την στατική φάση της στήλης μοιράζονται τα ίδια ιόντα.

Η συνήθης κατασκευαστική πορεία για τις στήλες αυτές είναι να μειωθεί το πάχος επίστρωσης και να χρησιμοποιηθούν μίγματα στατικών φάσεων που να αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες λειτουργίας. Στις υπάρχουσες δημοσιεύσεις οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται είναι τύπου διμέθυλο ή τύπου φαινυλ – μεθυλ.

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήσαμε την χρωματογραφική στήλη του οίκου Restek RTX-500 η οποία είναι τύπου διμέθυλο σιλοξανίου εμβολιασμένη με καρμποράνιο. Η στήλη αυτή μπορεί να λειτουργήσει αποτελεσματικά σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες όπως αυτές των 400 °C χωρίς να παρουσιάζει θόρυβο που να επηρεάζει την ταυτοποίηση των κορυφών. Παράλληλα η δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλές θερμοκρασίες, επιτρέπει την προσθήκη σταδίου καθαρισμού της στήλης για να απομακρυνθούν οι παρεμποδίσσεις μειώνοντας έτσι την επιμόλυνση από δείγμα σε δείγμα.

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο υψηλής καθαρότητας με ρυθμό ροής 1 mL/min, ενώ όγκος έγχυσης ήταν ίσος με 2 μL. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε ως εξής: 60 °C για 1 λεπτό, ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας 10 °C / min έως τους 300 °C και κρατήθηκε στη συγκεκριμένη θερμοκρασίας για 1 λεπτό. Οι θερμοκρασίες έγχυσης και πηγής ιόντων τέθηκαν στους 230 °C και 220 °C, αντίστοιχα. Ο λόγος m/z των ιόντων και οι χρόνοι κατακράτησης για κάθε PCB παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3: Λόγος m/z και χρόνοι κατακράτησης για κάθε υπο εξέταση PCB

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Χρόνος ανάσχεσης	16,89	17,59	19,31	20,51	21,45	20,92	22,68
Target m/z ion	256	292	326	326	360	360	394
m/z ιόντων θραυσμάτων	186	150	184	184	218	218	254
	150	220	256	256	290	290	324
	256	292	326	326	360	360	394

7.6 Στατιστική ανάλυση

Τα επίπεδα των PCBs εκφράστηκαν ως διάμεσοι, ενώ οι περιεκτικότητες των PCBs εκφράστηκαν ως τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση ενώ παρουσιάστηκαν και τα εύρη τους. Οι διαφορές μεταξύ των ομάδων του πληθυσμού διερευνήθηκαν με τη χρήση της δοκιμής Mann-Whitney test. Box και των διαγραμμάτων Whisker, ενώ γραφήματα με μπαρες κατασκευάστηκαν για να φανεί η συνεισφορά της κάθε ένωσης στο τελικό αποτέλεσμα για την παρουσίαση της κατανομής των επιπέδων PCB. Η ανάλυση των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του IBM SPSS Statistics 19.0, με στάθμη εμπιστοσύνης 0,05.

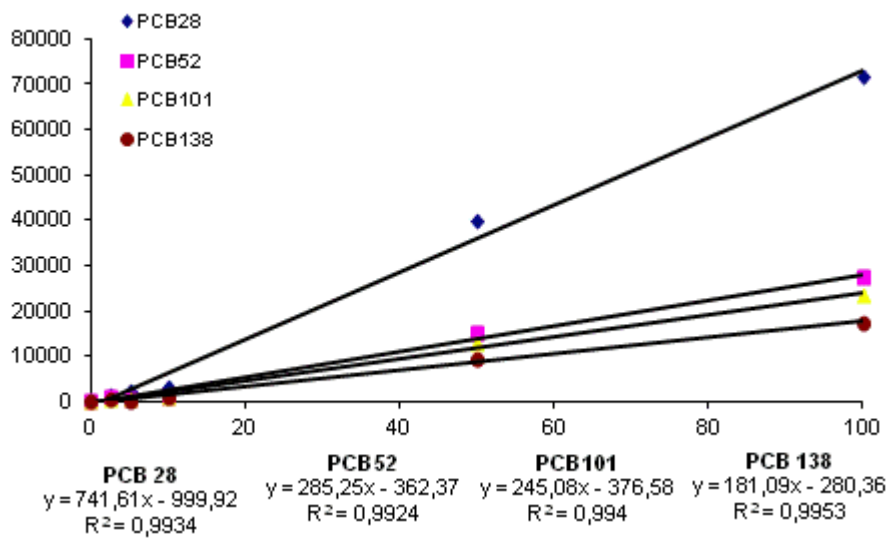
7.7 Αποτελέσματα-Συζήτηση

7.7.1 Ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου

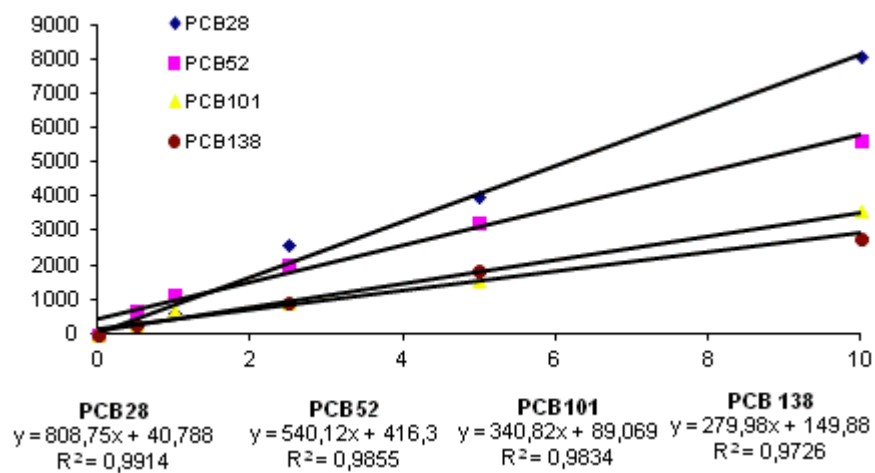
Δύο από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκχύλιση των PCB από δείγματα τρίχας είναι η όξινη εκχύλιση που ακολουθείται από υγρή-υγρή εκχύλιση [243] και η soxhlet εκχύλιση [248]. Σε αυτή τη μελέτη, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια τροποποιημένη βελτιωμένη μεθοδολογία χρησιμοποιώντας επώαση υπερήχων για την στερεή-υγρή εκχύλιση των PCBs. Αυτή η μέθοδος δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό, είναι απλούστερη και ταχύτερη από ότι οι άλλες μέθοδοι.

Δείγματα ανθρώπινης τρίχας αναλύθηκαν για την παρουσία των PCB, ενώ δείγματα με επίπεδα περιεκτικότητας μικρότερα του ορίου ποσοτικοποίησης συνενώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ως λευκά δείγματα. Οι τεχνικές ποσοτικοποίησης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αυτές των απλών εξωτερικών προτύπων καθώς και των αντίστοιχων μετά από γνωστή προσθήκη γνωστής περιεκτικότητας από τον κάθε αναλύτη. Ενδεικτικά, στα

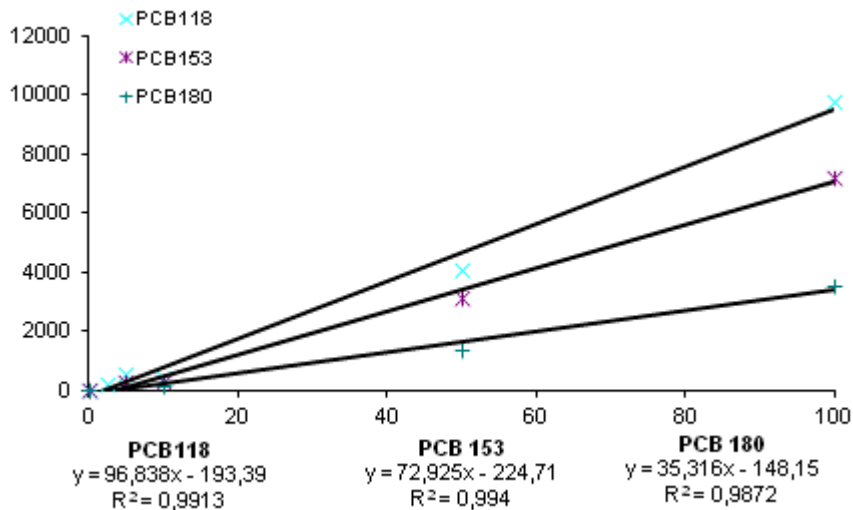
σχήματα 7.2 έως 7.5 παρουσιάζονται οι καμπύλες που προέκυψαν για κάθε PCB.



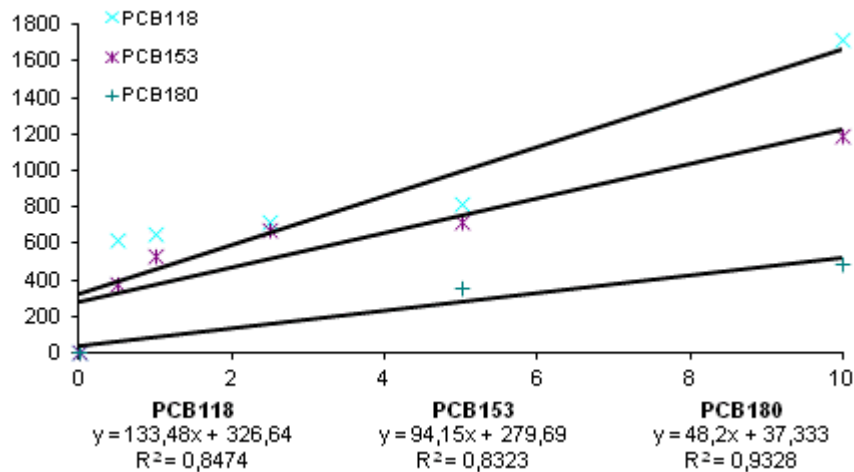
Σχήμα 7.2: Καμπύλες εξωτερικών προτύπων για τα PCB 28, 52, 101 και 138 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS.



Σχήμα 7.3: Καμπύλες σταθερών προσθηκών για τα PCB 28, 52, 101 και 138 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS.



Σχήμα 7.4: Καμπύλες εξωτερικών προτύπων για τα PCB 118, 153, και 180 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS.



Σχήμα 7.5: Καμπύλες γνωστών προσθηκών για τα PCB 118, 153, και 180 μετά από χρήση της τεχνικής GC-DFHRMS.

Η ανάκτηση υπολογίστηκε με εμβολιασμό γνωστών συγκεντρώσεων PCBs σε δείγματα τρίχας στα επίπεδα των 1, 2,5, 5 και 10 µg/mg. Οι μέσες ανακτήσεις για τα PCB κυμαίνονταν από 71,2% για το PCB 28 έως 101,6% για το PCB 138, με μέση ανάκτηση ίση με 88,9% για όλα τα PCB που εξετάστηκαν (Πίνακας 7.4).

Πίνακας 7.4: Αναλυτικά χαρακτηριστικά απόδοσης της μεθόδου

		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Μέση ανάκτηση %		71,2	91,8	89,5	94,3	101,6	88,7	85,4
LOQ (pg/mg)	GC-MS	0,6	0,6	0,8	0,6	0,6	0,7	1,3
	GC-DFHRMS.	0,026	0,025	0,017	0,014	0,017	0,017	0,015
LOD (pg/mg)	GC-MS	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4
	GC-DFHRMS	0,001 7	0,016	0,013	0,012	0,013	0,013	0,012
Πιστότητα (% RSD)*		4,3	9,0	17,5	11,4	21,9	13,2	18,3
Ανάκτηση*		98,2	87,5	104,4	95,3	104,9	101,4	92,1

Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης για την τεχνική GC-MS υπολογίστηκαν για λόγο σήματος προς θόρυβο 10 προς 1 και 3 προς ένα, αντίστοιχα. Οι τιμές του LOQ και LOD κυμαίνονταν από 0,6 έως 1,3 pg/mg και από 0,2 έως 0,4 pg/mg, αντίστοιχα (Πίνακας 7.4).

Τα αντίστοιχα όρια ποσοτικοποίησης για την τεχνική GC-DFHRMS ορίστηκαν σε σχέση με τη γραμμή βάσης του λευκού δείγματος ενώ τα όρια ανίχνευσης ορίστηκαν με βάση τις πραγματικές τιμές από το λογισμικό. Οι τιμές LOQ κυμαίνονταν από 0,014 έως 0,026 pg/mg και οι τιμές LOD κυμαίνονταν από 0,012 έως 0,017 pg/mg (Πίνακας 7.3). Η μεταξύ ημερών πιστότητα και η ανάκτηση υπολογίστηκαν μετά από τετραπλό εμβολιασμό δειγμάτων τρίχας και για τα επίπεδα 2,5, 5 και 10 pg/mg.(Πίνακας 7.4).

7.7.2 Μελέτη της έκθεσης του ανθρώπου σε PCBs μέσω της τρίχας

Η ανάλυση των δειγμάτων σε τρίχες της κεφαλής από τον πληθυσμό της Πελοποννήσου και της Κρήτης διεξήχθη χρησιμοποιώντας τόσο την τεχνική GC-MS όσο και την τεχνική GC-DFHRMS. Η διάμεση τιμή, τα επίπεδα του 1^{ου} και 3^{ου} τεταρτημόριου για κάθε εξεταζόμενη ουσία PCB καθώς και τα % θετικά δείγματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 7.5, ενώ τα χρωματογραφήματα που λήφθηκαν με την τεχνική GC-DFHRMS παρουσιάζονται στα σχήματα 7.6-7.10.

Διαφορές στις συχνότητες της ανίχνευσης των έμμονων οργανικών ρύπων, καθώς και στις μέσες τιμές εντοπίστηκαν PCBs μεταξύ του εξεταζόμενου πληθυσμού και με τις δύο τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν. Όλα τα δείγματα τρίχας από την περιοχή της Πελοποννήσου ήταν θετικά (100%) για κάθε εξεταζόμενο PCB. Αντίθετα για τα δείγματα από την περιοχή της Κρήτης, υπήρχαν αρκετά δείγματα στα οποία δεν ανιχνεύτηκαν PCBs με το

λιγότερο συχνά απαντώμενο να είναι το PCB 138 (76,2%) ενώ το πιο συχνά ανιχνεύσιμο να είναι το PCB 28 και 153 (90,5%), με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την τεχνική GC-DFHRMS (Πίνακας 7.5). Από την άλλη πλευρά, με την χρήση της τεχνικής GC-MS, σε πολύ λιγότερα δείγματα ανιχνεύτηκαν PCBs, κάτι που ήταν αναμενόμενο λόγω των μεγαλύτερων ορίων ανίχνευσης.. Το επί τοις εκατό ποσοστό θετικών δειγμάτων για την Πελοπόννησο με τη συγκεκριμένη τεχνική κυμάνθηκε από 46,7% (για το PCB 118) έως 100% (για τα PCB 52, 138 και 153), ενώ στα δείγματα από την Κρήτη οι αντίστοιχες τιμές κυμάνθηκαν από 9,5% (για τα PCB 28 και 138) έως 85,7% (για τα PCB 52). Σε κανένα δείγμα από την περιοχή της Κρήτης δεν ανιχνεύτηκε PCB 101 με χρήση της τεχνικής GC-MS, όπως και σε κανένα δείγμα και από τις δύο περιοχές δεν ανιχνεύτηκε PCB 180 με χρήση της ίδιας τεχνικής.

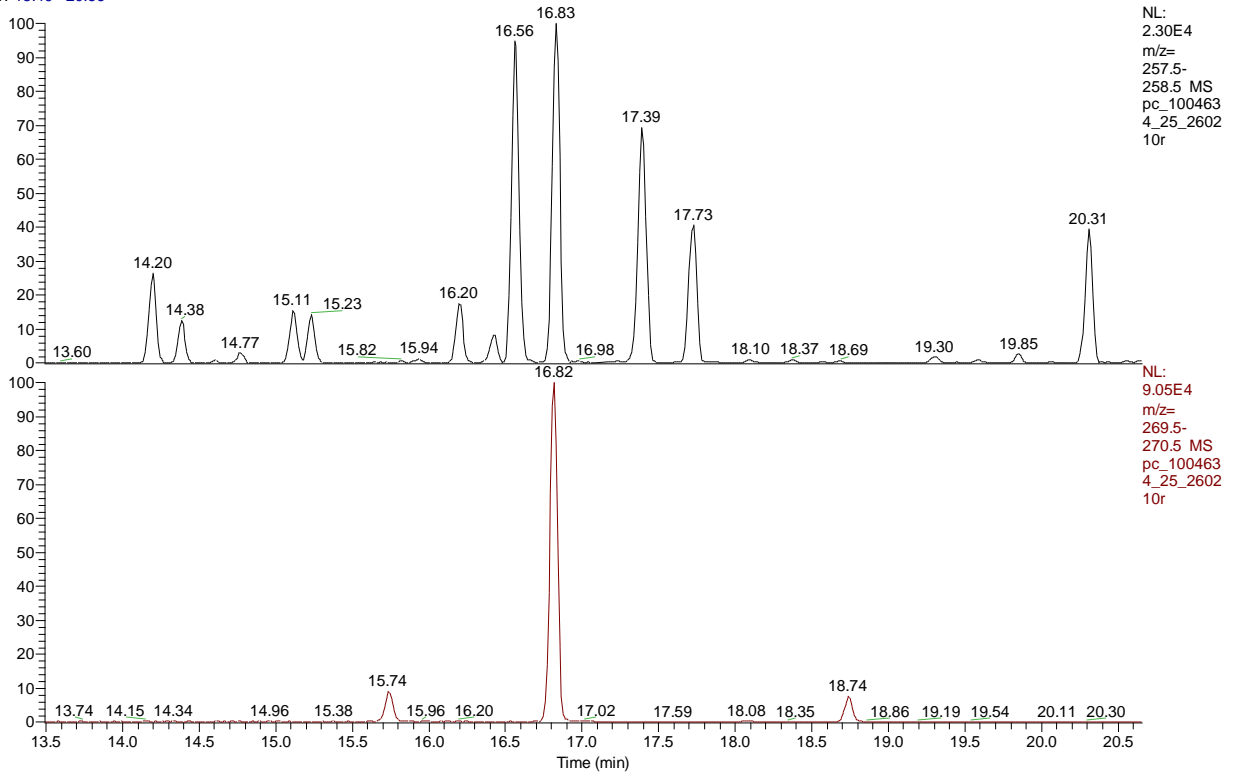
Η συνολική επιβάρυνση του πληθυσμού της Κρήτης σε PCBs, όπως προσδιορίστηκε με τις τεχνικές GC-MS και GC-DFHRMS, ισούται με 0,61 και 1,47 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ενώ για τον πληθυσμό από την περιοχή της Πελοποννήσου ισούται με 24,7 και 38,7, αντίστοιχα. Σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο πληθυσμών ($p < 0,001$) παρατηρήθηκαν στις μέσες τιμές για όλα τα PCB που εξετάστηκαν με GC-DFHRMS (Πίνακας 7.5).

Πίνακας 7.5: Η διάμεση τιμή (pg/mg), οι τιμές 1^{ου} και 3^{ου} τεταρτημορίου και ο αριθμός των %θετικών δειγμάτων για τον πληθυσμό της Κρήτης και της Πελοποννήσου με τις τεχνικές GC-MS και GC-DFHRMS.

	GC-MS					GC-DFHRMS				
	%Θετικά δείγματα	1 ^ο	Διάμεση τιμή	3 ^ο	ρ	%Θετικά δείγματα	1 ^ο	Διάμεση τιμή	3 ^ο	ρ
PCB 28										
Κρήτη	9,5	1,37	3,22	5,07	0,089	90,5	0,09	0,24	0,31	<0,001
Πελοπόννησος	93,3	7,70	9,20	18,36		100	3,20	8,80	17,7	
Σύνολο	44,4	6,89	8,76	16,76		94,4	0,20	0,95	5,20	
PCB 52										
Κρήτη	85,7	0,20	0,78	2,07	<0,001	81,0	0,08	0,14	0,38	<0,001
Πελοπόννησος	100	8,25	10,52	18,26		100	2,13	4,80	11,40	
Σύνολο	91,7	0,64	2,83	10,34		88,9	0,13	0,61	4,50	
PCB 101										
Κρήτη	-	-	-	-	-	81,0	0,04	0,07	0,16	<0,001
Πελοπόννησος	66,7	2,11	2,71	4,21		100	0,72	2,20	4,70	
Σύνολο	66,7	2,11	2,71	4,21		88,9	0,07	0,24	2,04	
PCB 118										
Κρήτη	38,1	0,80	2,72	5,77	0,107	85,7	0,02	0,04	0,07	,0,01
Πελοπόννησος	46,7	3,97	5,15	6,58		100	0,43	2,00	2,80	

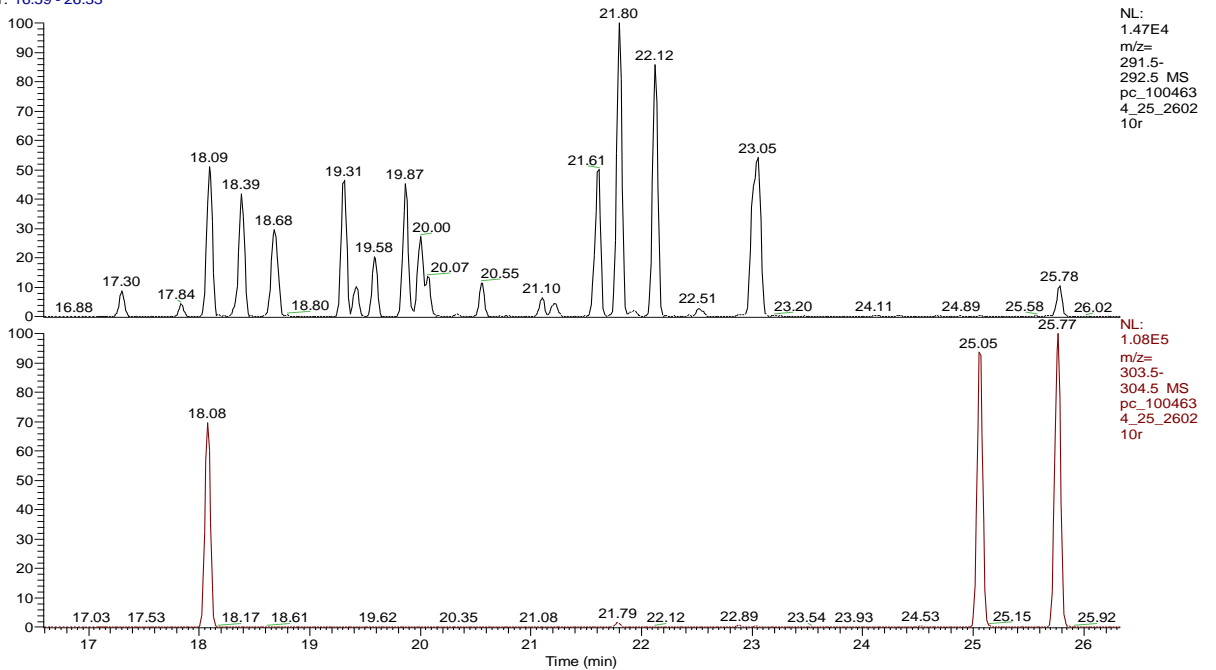
Σύνολο	41,7	1,98	4,64	6,24		91,7	0,04	0,13	1,76	
PCB 138										
Κρήτη	9,5	0,20	0,82	1,44	0,155	76,2	0,04	0,10	0,18	<0,001
Πελοπόννησος	100	5,99	8,64	9,47		100	0,45	1,92	2,60	
Σύνολο	52,8	5,12	8,43	9,25		94,4	0,10	0,20	2,20	
PCB 153										
Κρήτη	19,0	0,50	0,50	4,76	0,006	90,5	0,04	0,10	0,18	<0,001
Πελοπόννησος	100	5,99	8,64	9,47		100	0,64	2,40	3,20	
Σύνολο	52,8	5,12	8,43	9,25		94,4	0,10	0,20	2,20	
PCB 180										
Κρήτη	-	-	-	-	-	81,0	0,03	0,05	0,07	<0,001
Πελοπόννησος	-	-	-	-	-	100	0,33	1,14	1,66	
Σύνολο	-	-	-	-	-	88,9	0,05	0,09	1,14	
Άθροισμα PCBs										
Κρήτη	85,7	0,70	1,47	5,07	<0,001	90,5	0,39	0,61	1,03	<0,001
Πελοπόννησος	100	29,3	38,7	53,0		100	8,80	24,7	40,8	
Σύνολο	91,7	1,44	8,41	37,6		94,4	0,56	2,10	22,6	

RT: 13.49 - 20.66



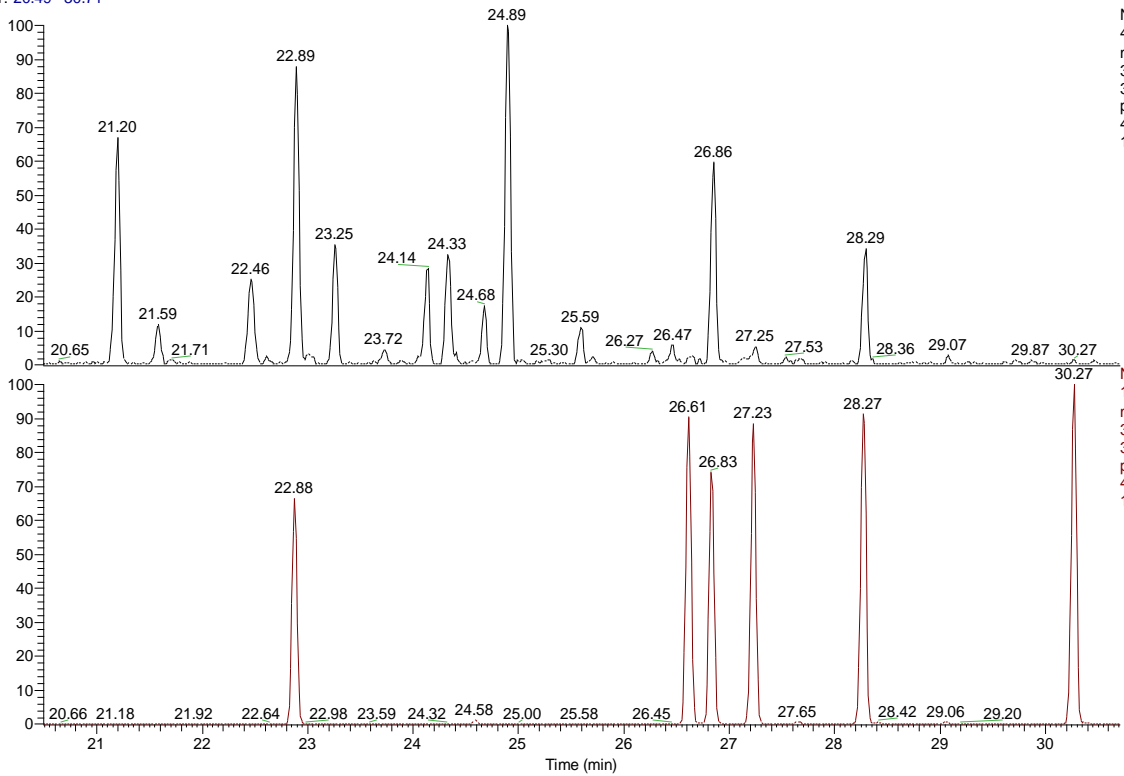
Σχήμα 7.6: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 28: Χρόνος ανάσχεσης 16,83; PCB 31: Χρόνος ανάσχεσης 16,56, PCB 37: Χρόνος ανάσχεσης 20,31

RT: 16.59 - 26.33



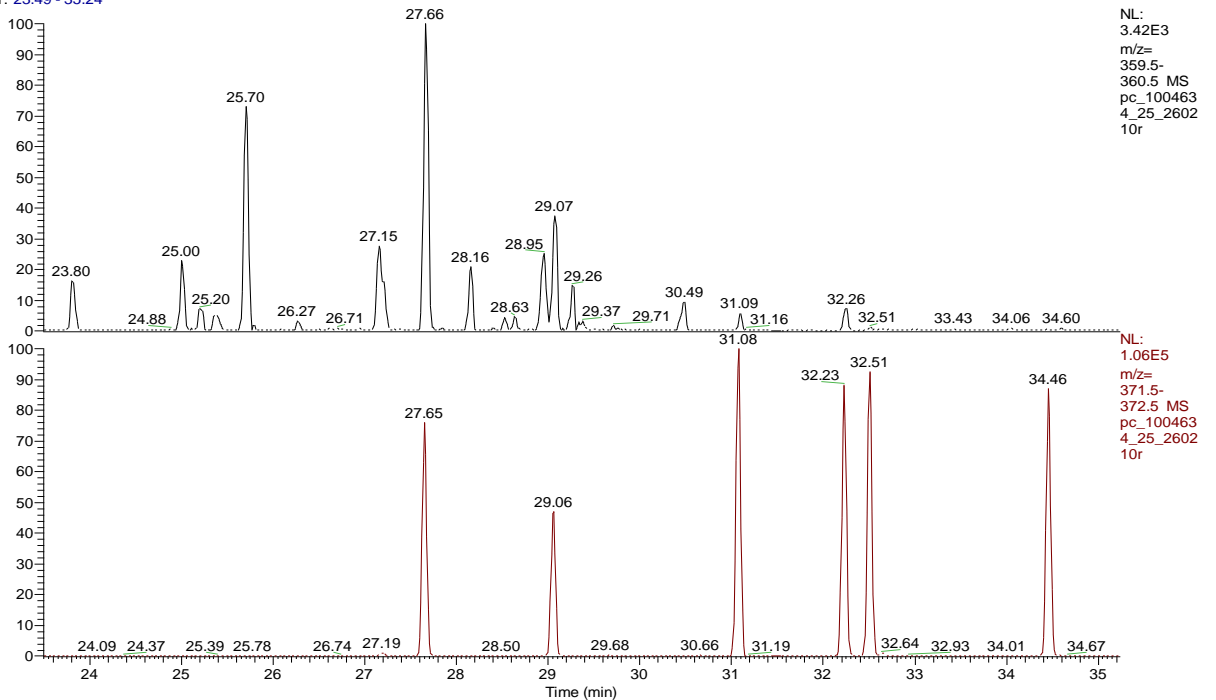
Σχήμα 7.7: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 52: Χρόνος ανάσχεσης 18,09; PCB 77: Χρόνος ανάσχεσης 25,78; PCB 81: Χρόνος ανάσχεσης 25,05.

RT: 20.49 - 30.71



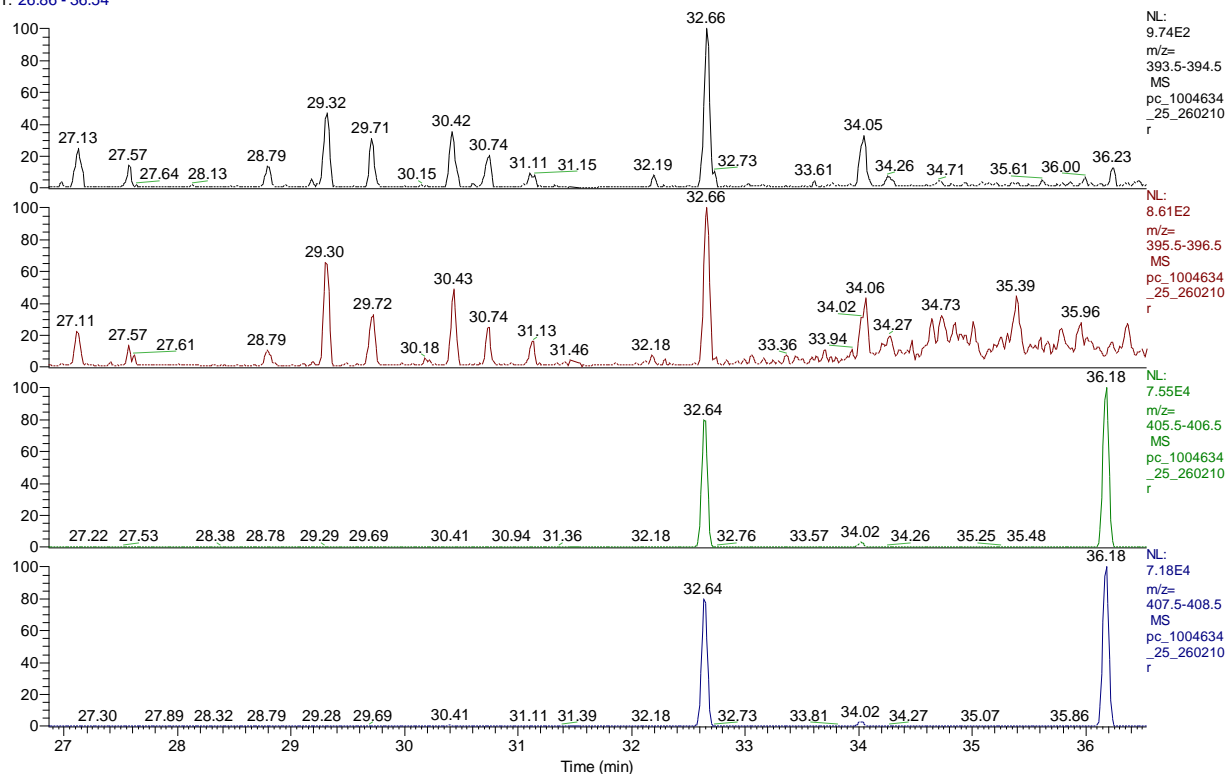
Σχήμα 7.8: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 101: Χρόνος ανάσχεσης 22,89; PCB118: Χρόνος ανάσχεσης 26,86; PCB 105: Χρόνος ανάσχεσης 28,27; PCB126: Χρόνος ανάσχεσης 30,27.

RT: 23.49 - 35.24



Σχήμα 7.9: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 138: Χρόνος ανάσχεσης 29,07; PCB153: Χρόνος ανάσχεσης 27,66; PCB 167: Χρόνος ανάσχεσης 31,09; PCB156: Χρόνος ανάσχεσης 30,26.

RT: 26.86 - 36.54



Σχήμα 7.10: Ενδεικτικό χρωματογράφημα δείγματος τρίχας από την περιοχή της Αμαλιάδας, PCB 180: Χρόνος ανάλυσης 32,66; PCB189: Χρόνος ανάλυσης 36,23.

Η έκθεση αυτή του πληθυσμού και ειδικά στην περιοχή της Πελοποννήσου οφείλεται στο γεγονός ότι τα PCBs έχουν χρησιμοποιηθεί για αρκετές δεκαετίες, σε μετασχηματιστές, πυκνωτές, σε πλαστικοποιητές και σε κλειστά συστήματα πυρασφάλειας ως ανθεκτικά υγρά στη φωτιά. Παρόλο που η παραγωγή τους έχει απαγορευτεί από την Υπηρεσία Περιβαλλοντικής Προστασίας (Environmental Protection Agency ή EPA) από το 1979 και από τη Σύμβαση της Στοκχόλμης για τους έμμοτους οργανικούς ρύπους το 2001, οι συγκεκριμένες ενώσεις συνεχίζουν να εντοπίζονται, όπως αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης. Η τοξικότητά τους ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων PCBs. Οι πιο συχνά παρατηρούμενες επιπτώσεις στην υγεία των ατόμων που εκτίθενται σε εξαιρετικά υψηλά επίπεδα των PCB είναι δερματοπάθειες, όπως χλωρακμή, εξανθήματα, καθώς και κόπωση, κεφαλαλγία, βήχα, οφθαλμικές βλάβες, ακανόνιστη έμμηνος ρύση, μειωμένη ανοσολογική απόκριση και κακή γνωστική ανάπτυξη σε παιδιά [250]. Επιπλέον, τα PCBs φαίνεται να μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων στα καρκινικά κύτταρα του μαστού και μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της πιθανότητας καρκινογένεσης στην περιοχή του μαστού [248]. Το γεγονός αυτό προκαλεί σοβαρή ανησυχία δεδομένου ότι τα οιστρογόνα

επηρεάζουν την έκφραση των γονιδίων που έχουν ενοχοποιηθεί με τον καρκίνο του μαστού καθώς και με διάφορες μορφές μετάστασης [252,253].

Θεωρητικά, 209 ομοειδείς ουσίες είναι δυνατό να υπάρχουν, αν και ο πραγματικός αριθμός ομοειδών ουσιών που βρίσκονται στο περιβάλλον είναι πολύ χαμηλότερος. Η ανάλυση γενικά περιορίζεται συχνά σε μια επιλογή επτά PCBs, γνωστή και ως «ICES-7» ή «δείκτης-PCBs». Η επιλογή αυτή αποτελείται συνήθως από τα εξής: 28, 52, 101, 118, 138, 153 και 180 και καλύπτει ένα ευρύ φάσμα από βαθμούς χλωρίωσης (τρι- έως επτα-χλωριωμένα PCBs) και από σημεία ζέσεως.

Δύο ομάδες πληθυσμού (κάτοικοι διαφόρων γεωργικών περιοχών της Ελλάδας) επιλέχθηκαν σε αυτή τη μελέτη, από τις οποίες συλλέχθηκαν δείγματα τρίχας για τον προσδιορισμό των PCBs με απώτερο σκοπό να εκτιμηθεί η συνολική επιβάρυνση στους συγκεκριμένους ρύπους. Γενικά, τα δείγματα που συλλέχθηκαν από αγροτικές περιοχές της Πελοποννήσου έδωσαν σημαντικά ($p < 0,01$) υψηλότερες συγκεντρώσεις εκφρασμένες ως διάμεση τιμή συγκριτικά με τις αντίστοιχες που προσδιορίστηκαν σε περιοχές της Κρήτης. Οι τιμές αυτές κυμάνθηκαν από 8,8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για το PCB 28 έως 1,14 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για το PCB 180), ενώ οι αντίστοιχες από την περιοχή της Κρήτης κυμάνθηκαν από 0,24 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για το PCB 28 έως 0,04 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για το PCB 118. Οι συγκεκριμένες τιμές προσδιορίστηκαν μετά από ανάλυση των δειγμάτων με την τεχνική της GC-DFHRMS. Αντίθετα, η ανάλυση GC-MS απέτυχε να παράσχει σημαντικές διαφορές για τα ομοειδή PCBs 28, 118 και 138 ($p > 0.05$) ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν (Πίνακας 7.5). Επιπλέον, τα μεσαία επίπεδα των PCB που προσδιορίστηκαν με GC-MS ήταν υψηλότερα από εκείνα που προσδιορίστηκαν με την τεχνική GC-DFHRMS για τους δύο πληθυσμούς. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λόγω των υψηλότερων τιμών των ορίων ποσοτικοποίησης και κατά συνέπεια του μικρότερου αριθμού των θετικών δειγμάτων που προσδιορίστηκαν με χρήση απλού τετραπόλου σε σχέση με το αντίστοιχο υψηλής διακρισιμότητας. Ενδεικτικά, στους πίνακες 7.6 και 7.7 παρουσιάζονται αναλυτικά οι περιεκτικότητες των PCBs από την περιοχή της Αμαλιάδας στην Πελοπόννησο και της Ιεράπετρας στην Κρήτη και με τις δύο τεχνικές.

Πίνακας 7.6: Η αναλυτική περιεκτικότητα των δειγμάτων (pg/mg) στα διάφορα PCBs για την περιοχή της Αμαλιάδας στην Πελοπόννησο και της Ιεράπετρας στην Κρήτη με την τεχνική GC-DFHRMS.

Κωδικός Δείγματος	Βάρος δείγματος (mg)	PCB28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153	PCB180
Ιεράπετρα								
B4	165	0,050	0,052	0,020	0,007	0,020	0,042	0,025
B6	200	0,007	nd	nd	0,004	0,016	0,017	0,017
B7	300	0,019	0,022	0,015	0,010	0,011	0,021	0,015
B10	275	0,100	0,040	0,014	0,005	nd	0,013	0,005
B11	273	0,120	0,071	0,036	0,037	0,063	0,100	0,044
B13	274	0,031	0,019	0,012	0,008	0,012	0,013	0,006
B15	90	1,100	0,400	0,210	0,200	0,180	0,240	0,150
B16	250	0,074	0,040	0,032	0,028	0,027	0,055	0,025
B18	175	0,038	0,022	0,030	0,018	0,025	0,067	0,023
B19	190	0,095	0,039	0,022	0,011	0,026	0,057	0,015
B25	200	0,140	0,059	0,063	0,028	0,048	0,081	0,044
Αμαλιάδα								
7B	150	16,00	7,60	2,50	1,60	1,50	2,00	1,00
34B	128	12,00	5,20	2,30	1,40	1,30	1,80	0,88
45B	400	2,60	1,30	2,40	1,50	1,30	1,50	0,72
49B	250	1,40	6,20	2,70	1,30	1,30	1,70	0,92
62B	140	4,40	2,40	1,20	1,10	0,96	1,50	0,78
66B	150	10,00	7,30	3,70	2,20	1,90	2,70	1,20
78B	240	6,60	3,00	1,10	0,88	0,74	1,10	0,57
100B	250	2,30	1,30	0,47	0,27	0,30	0,42	0,20
112B	150	0,56	0,26	0,11	0,06	0,07	0,09	0,03
125B	160	1,80	0,83	0,25	0,16	0,15	0,22	0,13
18G	150	1,30	0,35	0,15	0,12	0,09	0,13	0,07
19G	120	7,70	3,60	0,94	1,00	0,96	1,20	0,57
35G	180	17,00	7,00	1,80	1,40	1,20	1,50	0,71
17P	230	5,20	2,10	0,91	0,58	0,57	0,86	0,32
34P	150	0,70	0,41	0,13	0,14	0,12	0,13	0,07

nd: Η περιεκτικότητα ήταν μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

Πίνακας 7.7: Η αναλυτική περιεκτικότητα των δειγμάτων (pg/mg) στα διάφορα PCBs για την περιοχή της Αμαλιάδας στην Πελοπόννησο και της Ιεράπετρας στην Κρήτη με την τεχνική GC-MS.

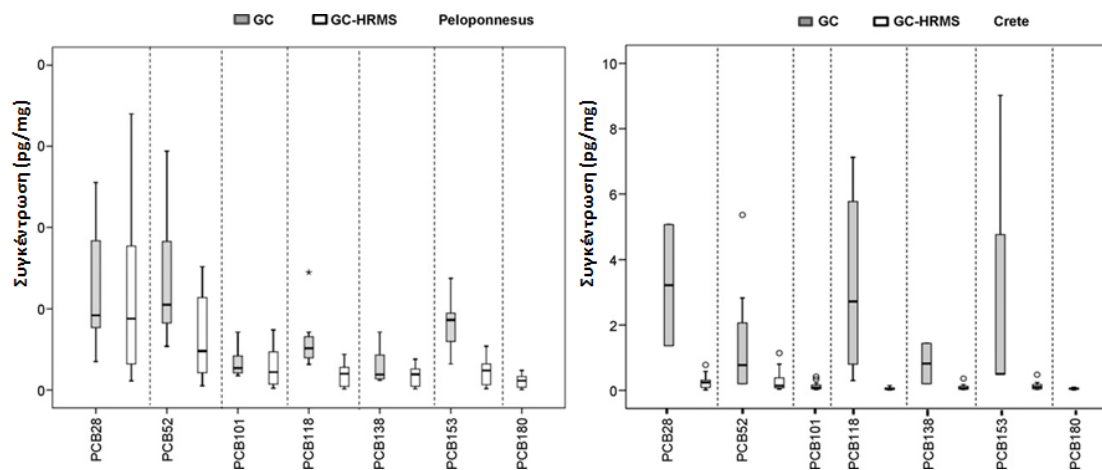
Κωδικός Δείγματος	PCB28	PCB52	PCB101	PCB118	PCB138	PCB153	PCB180
Ιεράπετρα							
B4	0,100	0,104	0,040	0,014	0,040	0,084	0,050
B6	0,015	nd	nd	0,008	0,032	0,034	0,034
B7	0,038	0,044	0,030	0,019	0,022	0,042	0,030
B10	0,200	0,080	0,028	0,009	nd	0,026	0,011
B11	0,240	0,142	0,072	0,074	0,126	0,200	0,088
B13	0,062	0,038	0,024	0,016	0,024	0,026	0,012
B15	2,200	0,800	0,420	0,400	0,360	0,480	0,300
B16	0,148	0,080	0,064	0,056	0,054	0,110	0,050
B18	0,076	0,044	0,060	0,036	0,050	0,134	0,046
B19	0,190	0,078	0,044	0,022	0,052	0,114	0,030
B25	0,280	0,118	0,126	0,056	0,096	0,162	0,088
Αμαλιάδα							
7B	32,00	15,20	5,00	3,20	3,00	4,00	2,00
34B	24,00	10,40	4,60	2,80	2,60	3,60	1,76
45B	5,20	2,60	4,80	3,00	2,60	3,00	1,44
49B	2,80	12,40	5,40	2,60	2,60	3,40	1,84
62B	8,80	4,80	2,40	2,20	1,92	3,00	1,56
66B	20,00	14,60	7,40	4,40	3,80	5,40	2,40
78B	13,20	6,00	2,20	1,76	1,48	2,20	1,14
100B	4,60	2,60	0,94	0,54	0,60	0,84	0,40
112B	1,12	0,52	0,22	0,13	0,15	0,18	0,06
125B	3,60	1,66	0,50	0,32	0,30	0,44	0,26
18G	2,60	0,70	0,30	0,24	0,18	0,26	0,14
19G	15,40	7,20	1,88	2,00	1,92	2,40	1,14
35G	34,00	14,00	3,60	2,80	2,40	3,00	1,42
17P	10,40	4,20	1,82	1,16	1,14	1,72	0,64
34P	1,40	0,82	0,26	0,28	0,24	0,26	0,15

nd: Η περιεκτικότητα ήταν μικρότερη από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

Η διάμεση τιμή του αθροίσματος των PCBs (0,61 pg/mg) στα δείγματα τρίχας από την Κρήτη ήταν χαμηλότερες από αυτές που αναφέρθηκαν σε προηγούμενες μελέτες σε εφήβους κατοίκους μιας βιομηχανικής πόλης στη Ρουμανία (διάμεση τιμή 6,3 pg/mg) [242]. Από την άλλη τα δείγματα από την περιοχή της Πελοποννήσου παρουσίασαν υψηλότερη συνολική επιβάρυνση σε PCBs (24,68 pg/mg) σε σχέση με τις αντίστοιχες που αναφέρθηκαν από άλλους πληθυσμούς στην Ελλάδα, τη Ρουμανία και το Βέλγιο [244] και συγκρίσιμα με εκείνα που συλλέχτηκαν από παιδιά που ζούσαν σε αγροτικές περιοχές του Πεκίνου, στην Κίνα [247]. Οι τιμές βέβαια που προσδιορίστηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν πολύ χαμηλότερες από αυτές που αναφέρονται για τους κατοίκους που ζούνε γύρω από τις εγκαταστάσεις ανακύκλωσης

ηλεκτρονικών συσκευών, όπου τα μέσα επίπεδα των PCB κυμαίνονταν από 28,19 έως 181,99 pg/mg [248]. Ως έχει ήδη αναφερθεί στο παρελθόν από την ερευνητική ομάδα του Gill και των συνεργατών του (2004) [254], τα ομοειδή PCBs που μεταβολίζονται εύκολα εμφανίζονται συχνότερα στις τρίχες σε σχέση με τα άλλα ομοειδή PCBs, ενώ το προφίλ των συγκεκριμένων έμμονων οργανικών ρύπων μπορεί να μεταβληθεί από διάφορους μηχανισμούς αποβολής και διανομής σε σχέση με το αντίστοιχο στο λιπώδη ιστό και ορό. Εξωτερική επίδραση από τον αέρα μπορεί να συμβάλλει επίσης στο πρόβλημα.

Το σχήμα 7.11 απεικονίζει τις κατανομές του κάθε ομοειδούς PCB και για τα δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με χρήση και των δύο τεχνικών. Αποδεικνύεται ότι τα λίγο χλωριωμένα PCBs, όπως τα PCB 28 και 52, ανιχνεύτηκαν σε υψηλότερες μέσες περιεκτικότητες σε σύγκριση με εκείνες των PCB με υψηλό βαθμό χλωρίωσης, δεδομένου ότι η βαθμός λιποφιλικότητας των PCB αυξάνει με την αύξηση της χλωρίωσης. Οι περιεκτικότητες των ομοειδών PCBs ακολουθούσαν την ακόλουθη φθίνουσα σειρά PCB 28 > 52 > 153 > 101 > 118 > 138 > 180 για τα δείγματα από την Πελοπόννησο και PCB 28 > 52 > 153 > 101 = 138 > 180 > 118 για τα δείγματα από την Κρήτη (Πίνακας 7.5).



Σχήμα 7.11: Οι κατανομές του κάθε ομοειδούς PCB και για τα δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν, όπως αυτές προσδιορίστηκαν με χρήση και των δύο τεχνικών.

Η ερευνητική ομάδα του Altshul και των συνεργατών του (2004) [255] ανέφεραν υψηλότερες συγκεντρώσεις των λιγότερο χλωριωμένων PCB στις τρίχες και υψηλότερες συγκεντρώσεις των περισσότερο χλωριωμένων και έμμονων PCBs στον ορό. Επιπλέον, η ερευνητική ομάδα του Zhao και των συνεργατών του (2008) [248] υποστηρίζουν στη μελέτη τους, ότι τα πιο συχνά

ομοειδή PCBs που βρέθηκαν στα δείγματα τριχών ήταν τα PCB 28, 52, 66 και 138 (όλα με συχνότητα ανίχνευσης 100%). Στην παρούσα μελέτη, δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στα ποσοστά των θετικών δειγμάτων μεταξύ των ομοειδών PCB (από 86,1% για το PCB 138 μέχρι 94,4% για τα PCB 28, σε σχέση με το συνολικό πληθυσμό) με προσδιορισμό τους με την τεχνική GC-DFHRMS. Γενικά, τα δείγματα τρίχας από τον αγροτικό πληθυσμό της Πελοποννήσου εμφάνιζαν υψηλότερη επιβάρυνση σε PCBs σε σχέση με τον αντίστοιχο της Κρήτης, με χρήση και των δύο τεχνικών προσδιορισμού. Όλα τα δείγματα από την Πελοπόννησο ήταν θετικά, ενώ η συχνότητα ανίχνευσης στα αντίστοιχα δείγματα από την Κρήτη κυμαίνονταν από 76,2% (PCB 138) έως 90,5% (για τα PCB 28 και 153). Δεν ανιχνεύθηκαν θετικά δείγματα με την τεχνική GC-MS για το PCB 101 στα δείγματα από την Κρήτη και για το PCB 180 για τα δείγματα από την περιοχή της Πελοποννήσου, λόγω των υψηλών τιμών LOQ της τεχνικής (0,8 και 1,3 pg/mg, αντιστοίχως). Ταυτόχρονα, οι διάμεσες τιμές των θετικών δειγμάτων για τα PCB 101 και 180, όπως αυτά προσδιορίστηκαν με την τεχνική DFHRMS ήταν 0,07 pg/mg (0,04 έως 0,16 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο) και 0,05 pg/mg (0,03 - 0,07 1^ο και 3^ο τεταρτημόριο).

Το PCB 28 είναι αυτό που συνεισφέρει περισσότερο μεταξύ όλων των άλλων ομοειδών PCBs και για τις δύο ομάδες του πληθυσμού, ενώ σημαντική συνεισφορά έχουμε και από το PCB 52 (Πίνακας 7.8). Η επί τοις εκατό συμβολή του PCB 28 ήταν 33,2% και 42,8% για τα δείγματα από την Κρήτη και την Πελοπόννησο, αντίστοιχα. Η επί τοις εκατό συνεισφορά τόσο του PCB 25 όσο και του 52 υπολογίστηκε μεγαλύτερη από 50% επί του συνόλου των PCBs και για τους δύο πληθυσμούς που εξετάστηκαν.

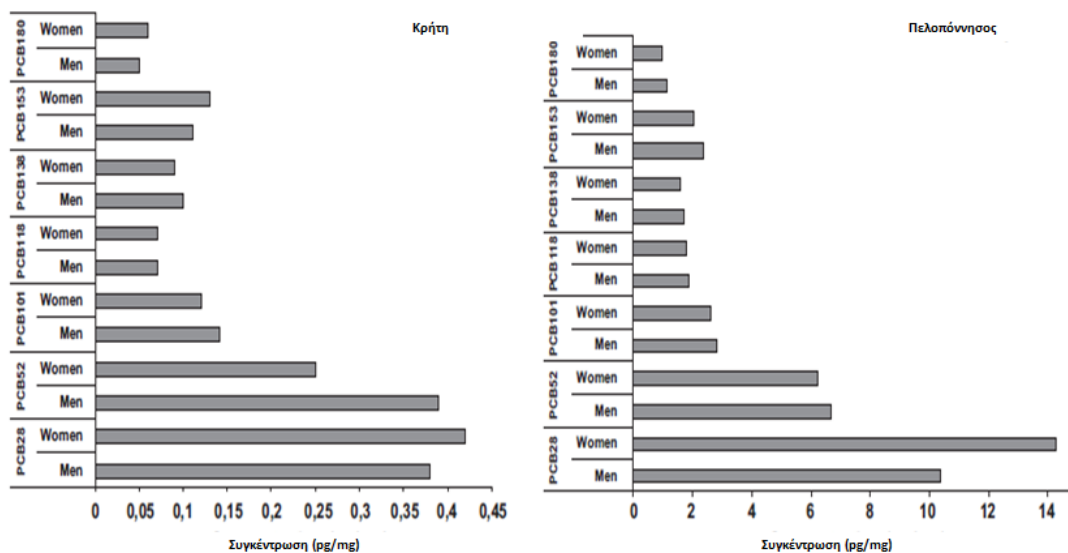
Πίνακας 7.8: %Συνεισφορά για κάθε ομοειδές PCB και για τις δύο υπό εξέταση περιοχές.

	% Συνεισφορά	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή
Κρήτη				
PCB 28	33,2	12,5	12,0	56,5
PCB 52	21,4	7,8	9,9	39,6
PCB 101	11,2	4,0	5,8	20,8
PCB 118	6,0	2,1	2,6	10,0
PCB 138	10,0	5,1	3,4	26,0
PCB 153	10,4	9,7	6,3	44,0
PCB 180	7,80	6,1	2,2	27,6
Πελοπόννησος				
PCB 28	42,8	12,9	9,0	58,8
PCB 52	22,5	6,0	11,5	39,9
PCB 101	9,7	4,3	5,9	21,2
PCB 118	6,7	2,3	4,5	13,3
PCB 138	6,1	2,0	3,9	11,5
PCB 153	8,2	2,3	4,5	13,3
PCB 180	4,0	1,3	2,3	6,4

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, το PCB 52 είναι ιδιαίτερα ασταθές στο ανθρώπινο το σώμα και για το λόγο αυτό μεταβολίζεται εύκολα μέσω υδροξυλίωσης [247,256]. Επιπλέον, το PCB 52 εκπέμπεται πιο εύκολο στην ατμόσφαιρα σε σχέση με άλλα ομοειδή PCB, λόγω της χαμηλότερης πίεσης και της αυξημένης κινητικότητας [257]. Έχει αναφερθεί [219] ότι τα PCB 52, 60, 103 και 173 ήταν οι ομοειδείς ουσίες με πάνω από 50% συχνότητα εμφάνισης στον αστικό πληθυσμό, ενώ το PCB 52 συνεισφέρει περισσότερο από τα υπόλοιπα ομοειδή PCBs (δεν παρουσιάστηκαν δεδομένα για τα PCB 28). Μεταξύ αστικών και αγροτικών πληθυσμών, μόνο το PCB 52 έχει ανιχνευτεί και μάλιστα τα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν στις αστικές περιοχές ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα από τα αντίστοιχα των αγροτικών περιοχών (δείγματα από τρίχες παιδιών), χωρίς όμως να εμφανιστεί κάποια διαφορά μεταξύ αγοριών και κοριτσιών [250].

Από την άλλη πλευρά, στη μελέτη του Conaci και των συνεργατών του (2008) [242] αποδείχτηκε ότι υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ αγοριών και κοριτσιών για το μεγαλύτερο μέρος των οργανοχλωριωμένων ρυπαντών (HCHs, DDTs και PCB). Όλα τα PCBs που εξετάστηκαν (PCB 180, 138, 153 και 118), εκτός από το PCB 170, βρέθηκαν σημαντικά υψηλότερα στα δείγματα τρίχας που συλλέχτηκαν από κορίτσια σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που προσδιορίστηκαν σε αγόρια, με τους μελετητές να το αποδίδουν στο γεγονός ότι οι τρίχες των κοριτσιών, ως μακρύτερες, έχουν την τάση να συλλέγουν μεγαλύτερες ποσότητες λόγω του μεγαλύτερου διαστήματος έκθεσης.

Στο σχήμα 7.12 απεικονίζεται το προφίλ του κάθε ανεξάρτητου συστατικού PCB, όπως προσδιορίστηκαν με την τεχνική υψηλής διακρισιμότητας για τις γυναίκες και τους άνδρες και από τις δύο αγροτικές περιοχές. Μολονότι, στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις PCB μεταξύ των πληθυσμών από τις δύο διαφορετικές αγροτικές περιοχές της Ελλάδας (Πίνακας 7.5), δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές ($p > 0,05$) μεταξύ των υποομάδων γυναικών και ανδρών του πληθυσμού για τις δύο περιοχές.



Σχήμα 7.12: Περιεκτικότητα PCBs σε δείγματα τρίχας γυναικών και αντρών από τις περιοχές της Κρήτης και της Πελοποννήσου.

7.8 Συμπεράσματα

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η ανάλυση βιολογικών δειγμάτων τρίχας έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την βιοπαρακολούθηση της ανθρώπινης έκθεσης σε ξενοβιοτικούς παράγοντες. Ωστόσο, στην περίπτωση

των έμμονων οργανικών ρύπων, τα επίπεδα έκθεσης είναι πολύ χαμηλά. Η ευαισθησία των αναλυτικών τεχνικών και επομένως τα όρια ανίχνευσης έχει ζωτική σημασία για την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων προσδιορισμού. Το υψηλό ποσοστό των θετικών δειγμάτων σε PCBs, οι χαμηλές διάμεσες τιμές των PCB και οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που παρατηρούνται στα αποτελέσματα, μεταξύ των περιοχών που εξετάστηκαν οφείλονται στην υψηλή ευαισθησία της τεχνικής GC-DFHRMS, σε σύγκριση με την τεχνική GC-MS. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι η τεχνική GC-DFHRMS μπορεί να προσφέρει πιο ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα με απώτερο στόχο τη βιολογική παρακολούθηση των έμμονων και όχι μόνο περιβαλλοντικών ρύπων.

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει την ανάγκη για μια κριτική αξιολόγηση των δεδομένων από τον προσδιορισμό των PCBs σε δείγματα τρίχας (π.χ. ποσοστό των θετικών δειγμάτων και επίπεδα περιεκτικότητας) σε σχέση και με τις ήδη υπάρχουσες δημοσιευμένες μελέτες. Θα πρέπει δηλαδή να ληφθεί υπόψη η τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί ώστε να αξιολογηθεί αν υπάρχει ή όχι κίνδυνος από την έκθεση του ανθρώπου σε έμμονους οργανικούς ρύπους. Η ευαισθησία των αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται σε αυτές τις μελέτες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8°

Μελέτη της έκθεσης παιδιών σε DDTs και PCBs μετά από ανάπτυξη μιας ταχείας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους σε δείγματα τρίχας με μικροεκχύλιση στερεάς φάσης υπερκείμενου χώρου και αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (HSSPME/GC-MS)

8.1 Εισαγωγή

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης αποτελεί η περαιτέρω διερεύνηση της έκθεσης του ανθρώπου σε έμμονους οργανικούς ρύπους και αυτή τη φορά η έρευνα πραγματοποιήθηκε όχι μόνο για τα PCBs αλλά και για τις ενώσεις του DDT και τα ισομερή του. Επίσης η δειγματοληψία αυτή τη φορά αφορούσε παιδιά αγροτικών και αστικών περιοχών της Κρήτης ώστε να διερευνηθεί αυτή η ευαίσθητη κατηγορία ανθρώπων. Λόγω του υψηλού κόστους των οργάνων υψηλής διακριτικής ικανότητας στη συγκεκριμένη έρευνα χρησιμοποιήθηκε και η τεχνική της αεριοχρωματογραφίας με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD), ενώ παράλληλα η μελέτη στράφηκε και προς την βελτιστοποίηση των τεχνικών προκατεργασίας των δειγμάτων με απώτερο σκοπό την επίτευξη χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης και τη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Μία από τις πλέον χρήσιμες μεθόδους προκατεργασίας δειγμάτων αποτελεί η χρήση της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) για την εκχύλιση των έμμονων οργανικών ρύπων από δείγματα τρίχας [258]. Η μέθοδος SPME χρησιμοποιεί μία συγχωνευμένη πυριτία/ίνα επικαλυμμένη με ένα υγρό ή στερεό πολυμερές ή συνδυασμό και των δύο. Οι δύο πιο κοινοί τρόποι απορρόφησης των αναλυτών στην ίνα κατά την τεχνική SPME γίνεται είτε με άμεση εμβάπτιση ή με την τεχνική του υπερκείμενου χώρου (HSSPME). Η εφαρμογή της δειγματοληψίας υπερκείμενου χώρου επέτρεψε την επέκταση της SPME σε πιο πολύπλοκες μήτρες που περιέχουν στερεά ή υψηλού μοριακού βάρους υλικά. Η μεταφορά των αναλυτών από το δείγμα στον υπερκείμενο χώρο αποτελεί το αργό στάδιο και για το λόγο αυτό η εκχύλιση μπορεί να βελτιστοποιηθεί με θέρμανση ή ανάδευση. Αύξηση της θερμοκρασίας δειγματοληψίας βρέθηκε να έχει μια σημαντική επίδραση επί της κινητικής της εκχύλισης στις λιγότερο πτητικές ενώσεις.

Όπως και τα PCBs έτσι και τα DDTs αποτελούν έμμονους οργανικούς ρύπους με μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής. Η τοξική δράση των PCBs έχει ήδη αναπτυχθεί στην παρούσα εργασία, αλλά για να ολοκληρωθεί η μελέτη θα

πρέπει να φανεί και η πιθανή έκθεση των ανθρώπων και ιδιαίτερα των παιδιών σε DDT, που αν και η χρήση του έχει απαγορευτεί συνεχίζει να ανιχνεύεται και να περνάει στην τροφική αλυσίδα, είτε ως DDT είτε με κάποια μορφή από τους μεταβολίτες του DDE και DDD.

Η βιολογική παρακολούθηση DDTs και PCB για την εκτίμηση της έκθεσης του ανθρώπου απαιτεί πολύπλοκη προκατεργασία του δείγματος και αναλυτικές διαδικασίες που χρησιμοποιούν ευαίσθητες αναλυτικές τεχνικές ώστε να επιτευχθούν τα επιθυμητά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν η ανάπτυξη ενός και μόνο σταδίου εκχύλισης, χρησιμοποιώντας την τεχνική HSSPME, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των DDTs και PCBs σε δείγματα τρίχας, έτσι ώστε να γίνει δυνατή η βιοπαρακολούθηση της έκθεσης των παιδιών από αγροτικές και αστικές περιοχές σε αυτούς τους ρύπους στο μικρότερο χρόνο και με το μικρότερο κόστος.

8.2 Συλλογή δειγμάτων

Η ομάδα-στόχος της δειγματοληψίας ήταν παιδιά από αστικές και αγροτικές περιοχές του νησιού της Κρήτης, στη νότια Ελλάδα. Ένα σύνολο από 72 δείγματα τρίχας συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της περιόδου 2009-2012 από παιδιά της προσχολικής και σχολικής ηλικίας (4,5 έως 12 ετών). Δεκαπέντε (15) δείγματα συλλέχθηκαν από την αστική περιοχή του Ηρακλείου και 28-29 δείγματα συλλέχθηκαν από δύο αγροτικές περιοχές (Α και Β) κοντά στην πόλη του Ηρακλείου. Το δείγμα περιλάμβανε 43 γυναίκες (59,7% του συνολικού πληθυσμού). Τα ερωτηματολόγια που συμπληρώθηκαν περιελάμβαναν πληροφορίες σχετικά με τα προσωπικά στοιχεία του ατόμου (φύλο, βάρος και ηλικία) καθώς και πληροφορίες σχετικά με τις προσωπικές τους συνήθειες, το επάγγελμα των γονέων, και την πιθανή σύνδεσή τους με την έκθεση σε φυτοφάρμακα. Οι γονείς των παιδιών που συμμετείχαν ενημερώθηκαν για το σκοπό της μελέτης και έδωσαν τη συγκατάθεσή τους. Όλα τα δείγματα τριχών τοποθετήθηκαν σε ένα χάρτινο φάκελο και φυλάχθηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

8.3 Αντιδραστήρια

Τα οργανοχλώριωμένα φυτοφάρμακα opDDD, ppDDD, opDDE, ppDDE, opDDT, και ppDDT ελήφθησαν από την Chem Service (West Chester, PA, USA). Το υδροξείδιο του νατρίου ελήφθη από τη Merck, D-6100

(Darmstadt, Γερμανία). Το 1,2,3,4-τετραχλωροναφθαλένιο (TCN) αγοράστηκε από τον Δρ Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Τα ομοειδή PCBs (28, 52, 101, και 138) καθώς και το χλωριούχο νάτριο ήταν από την Fluka Analytical-Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Το υπερκαθαρό νερό λήφθηκε από μια την συσκευή Direct-Q 3UV (Merck, Germany). Τα διαλύματα παρακαταθήκης του κάθε DDT και PCB παρασκευάστηκαν σε εξάνιο σε συγκέντρωση 100 ppm. Μικτά διαλύματα εργασίας των ομοειδών PCB και DDTs παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 10, 1,0, 0,1, και 0,01 ppm και χρησιμοποιήθηκαν για την εμβολιασμό των δειγμάτων. Όλα τα διαλύματα φυλάχθηκαν στους -20 °C.

8.4 Προκατεργασία δειγμάτων-HSSPME

Περίπου 200 mg των δειγμάτων τρίχας εκπλύθηκαν δύο φορές με 5 mL νερό και μία φορά με 5 mL. εξάνιο και ξηραίνεται σε ένα φούρνο ρυθμισμένο στους 40 °C. Στη συνέχεια τοποθετούνται σε φιαλίδια SPME χωρητικότητας 8 mL στα οποία προστίθενται 2 mL NaOH 10 M, 1 mL υπερκαθαρό νερό, 0,6 g NaCl, και 10 ng από TCN (χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο (IS)). Τα SPME φιαλίδια σφραγίστηκαν και τοποθετήθηκαν στον αυτόματο δειγματολήπτη του GC-MS.

Η HSSPME εκχύλιση συνοδεύεται με εκχύλιση σε ίνα PDMS / DVB στους 90 °C για 30 λεπτά με ταχύτητα ανάδευσης στις 250 rpm. Ενώ η πραγματοποιείται η χώνευση του δείγματος τρίχας, η ίνα εμβαπτίζεται μέσα στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος, ώστε να απορροφούν εκλεκτικά τις επιλεγμένες ουσίες που προέρχονται από τη μεταβολή της υγρής φάσης σε αέρια. Μετά την απορρόφηση η διαδικασία έχει ολοκληρωθεί και η άκρη της ίνας εισήχθη στον εισαγωγέα του GC-MS, όπου παρέμεινε για 3 λεπτά μέχρι την πλήρη απελευθέρωση των ουσιών.

8.5 Οργανολογία

Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη χρήση αεριοχρωματογράφου με ανιχνευτή φασματογράφο μάζας (GC-MS) QP-2010 της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Japan). Το σύστημα ήταν εξοπλισμένο με ένα split / splitless εισαγωγέα, ηλεκτρονικό σύστημα ελέγχου της πίεσης AFC ελέγχου και με ρομποτικού τύπου αυτόματο δειγματολήπτη AOC-5000-5000, κατάλληλο για λειτουργία σε συνθήκες SPME. Με τη βοήθεια κατάλληλου λογισμικού έγινε η

επεξεργασία όλων των δεδομένων που λήφθηκαν κατά την ανάλυση. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε μία τριχοειδή στήλη Supelco Analytical SLBtm-5 ms (Bellefonte, PA, USA), μήκους 30 m, 0,25 mm, 0,25 μm πάχος σωματιδίων πληρωτικού υλικού. Ο AOC-5000 SPME αυτόματος δειγματολήπτης ήταν εξοπλισμένος μια σύριγγα με ίνα κατασκευασμένη από συμπολημερή 65 μm τύπου PDMS / DVB της εταιρείας Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συνθήκες: Ήλιο ως φέρον αέριο με σταθερή ροή 1 mL/min, θερμοκρασία εισαγωγή 270 °C, έγχυση χωρίς διαμορισμό (splitless) για 1 λεπτό, θερμοκρασία MS 310 °C και θερμοκρασία πηγής ιόντων 230 °C. Η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται αρχικά στους 60 °C για 3 λεπτά, και μετά αυξάνει με ρυθμό 15 °C/min στους 180 °C, όπου και διατηρείται για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, υπήρξε μια σταδιακή αύξηση με ρυθμό 4 °C/min έως τους 250 °C και τελικά με ένα ρυθμό 30 °C έφτασε στους 300 °C, όπου και παρέμεινε για 1 λεπτό. Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά καθώς και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά του ανιχνευτή φασματογραφίας μάζας (MS) παρουσιάζονται στον πίνακα 8.1.

Σε ότι αφορά την τεχνική GC-ECD η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση του εξοπλισμού της Thermo που είναι εξοπλισμένο με δύο ανιχνευτές έναν NPD και έναν ECD, ενώ ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση τριχοειδούς στήλης HP-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm) που προμηθεύτηκε από την εταιρεία J & W Scientific, ΗΠΑ. Καθαρό ήλιο με ροή 1 mL/min χρησιμοποιήθηκε ως φέρον αέριο. Δύο μL του διαλύματος εγχύθηκαν στο σύστημα χωρίς διαμορισμό. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα είχε ως εξής: Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν ίση με 110 °C, όπου παρέμεινε για 1 λεπτό, και στη συνέχεια αυξήθηκε στους 180 °C με ρυθμό αύξησης 15 °C/min, όπου παρέμεινε για ένα λεπτό. Στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξήθηκε στους 250 °C με ρυθμό 5 °C/min, όπου παρέμεινε για 1 λεπτό και τελικά αυξήθηκε έως τους 300 °C, με ρυθμό 25 °C/min, όπου παρέμεινε σταθερή για 7 λεπτά. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 220 °C, ενώ η θερμοκρασία του ανιχνευτή ήταν 300 °C και ο ρυθμός ροής του αζώτου ήταν 30 ml/min. Υπό αυτές τις συνθήκες οι χρόνοι κατακράτησης για τους DDT μεταβολίτες ήταν: 15,39 min για το μεταβολίτη opDDE, 16,45 min για τον ppDDE, 16,84 min για

τον *op*DDD, 17,92 min για τον *pp*DDD, 17,96 min για τον *op*DDT και 19.12 λεπτά για τον μεταβολίτη *pp*-DDT.

8.6 Στατιστική Ανάλυση

Τα επίπεδα των DDTs και PCB εκφράζονται ως μέση τιμή (\pm SD) και τεταρτημόρια (1^ο, διάμεση τιμή, 3^ο), ενώ ο υπολογισμός του αριθμού των θετικών δειγμάτων (>LOD) εκφράζονται ως μετρήσεις και ποσοστά. Οι διαφορές μεταξύ των θετικών δειγμάτων εξετάστηκαν με τη χρήση της δοκιμής Pearson (Pearson's chi-square test). Οι διαφορές στα επίπεδα περιεκτικότητας μεταξύ των διαφορετικών περιοχών που εξετάστηκαν διερευνήθηκαν ως προς τη σημαντικότητα τους με τη χρήση των μη-παραμετρικών δοκιμών Mann-Whitney και Kruskal-Wallis. Ιστογράμματα και διαγράμματα σφαλμάτων χρησιμοποιήθηκαν για τη γραφική παράσταση των δεδομένων. Το πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 20.0 χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δεδομένων σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Για τον υπολογισμό των μέσων τιμών και των διάμεσων τιμών οι τιμές για όλα τα αρνητικά δείγματα (<LOD) ορίστηκαν ως LOD/2.

8.7 Αποτελέσματα και συζήτηση

8.7.1 Αξιολόγηση-επικύρωση μεθόδου

Για την αξιολόγηση της μεθόδου κατασκευάστηκαν οι καμπύλες εξωτερικών προτύπων καθώς και οι αντίστοιχες που προέκυψαν μετά από εμβολιασμό των αναλυτών στη μήτρα. Στον *y*-άξονα τοποθετήθηκαν οι λόγοι των σημάτων αναλύτη προς το εσωτερικό πρότυπο ενώ στον *x*-άξονα οι συγκεντρώσεις των αναλυτών. Όλες οι καμπύλες που προέκυψαν είχαν εξαιρετικό συντελεστή συσχέτισης $r^2 > 0,98$ για όλους τους αναλύτες και σε εύρος συγκεντρώσεων από 0 έως 1 ng/mL τόσο για τα DDTs όσο και για τα PCB (Πίνακας 8.1). Οι καμπύλες που προέκυψαν μετά από εμβολιασμό της μήτρας του δείγματος με γνωστές ποσότητες αναλυτών σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0 έως 50 pg/mg για DDTs και από 0 έως 10 pg/mg για τα PCBs είχαν επίσης συντελεστή $r^2 > 0,99$, με εξαίρεση την καμπύλη του PCB 52 ($r^2 = 0,9872$) και των *pp*DDD + *op*DDT ($r^2 = 0,9834$) (Πίνακας 8.1). Η στατιστική δοκιμή για την γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς εφαρμόστηκε με τη χρήση του προγράμματος Microsoft Excel, ενώ υπολογίστηκε και το % σφάλμα της καμπύλης. Για τις καμπύλες εξωτερικών

προτύπων το μέσο % σφάλμα ήταν -3,7, 1,7, -0,8, 4,0 και -0,9% για τις ενώσεις ορDDE, ρDDE, ορDDD, ρρDDD + ορDDT, και ρρDDT, αντίστοιχα, ενώ για τις ενώσεις και για PCB28, PCB52, PCB101 και PCB138 ήταν -0,4, -0,6 7,9 και 9,9%, αντίστοιχα, για το εύρος συγκεντρώσεων 0,1 έως 1 ng/mL. Για τις αντίστοιχες καμπύλες προσαρμοσμένες στη μήτρα του δείγματος οι τιμές του %σφάλματος ήταν 3,5, 12,2, -17,4, 10,1 και 20,8 για τις ενώσεις ορDDE, ρρDDE, ορDDD, ρρDDD + ορDDT και ρρDDT, αντίστοιχα, και 8,1, 11,3, -0,50, 2,8 για τα PCB για επίπεδα εμβολιασμού 2,5 έως 50 ρg/mg και 0,5 έως 10 ρg/mg, αντιστοίχως (Πίνακας 8.1). Για τον προσδιορισμό των υπό εξέταση έμμονων οργανικών ρύπων με την τεχνική GC-ECD, κατασκευάστηκαν πρότυπα σε εξάνιο τελικής συγκέντρωσης 0, 2, 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL. Όλες οι καμπύλες που κατασκευάστηκαν ήταν γραμμικές με συντελεστή συσχέτισης μεγαλύτερο του 0,998.

Υπολογίστηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) μετά από πολλαπλή ανάλυση του χαμηλότερου επιπέδου εμβολιασμού τόσο για τα PCBs όσο και για τα DDTs και ορίστηκαν ως οι κορυφές που έδωσαν λόγο σήματος προς θόρυβο > 3 για το LOD και > 10 για το LOQ. Οι τιμές LOD κυμαίνονταν από 0,04 σε 0,11 ρg/mg για τα PCBs και από 0,27 - 2,14 ρg/mg για τα DDTs (Πίνακας 8.1). Η χαμηλότερη τιμή LOQ για τα PCBs παρατηρήθηκε για το PCB101 (0,12 ρg/mg) ακολουθούμενο από τα PCB28, PCB52, και PCB138 (0,21, 0,29 και 0,36 ρg/mg, αντιστοίχως). Για τα DDTs, οι τιμές LOQ υπολογίστηκαν ίσες με 0,89, 0,96, 1,71, 5,00 και 7,14 ρg/mg για τις ενώσεις ορDDE, ρρDDE, ορDDD, ρρDDD + ορDDT, και ρρDDT, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης που υπολογίστηκαν με την τεχνική GC-ECD βρέθηκαν μεγαλύτερα από 0,8 ρg/mg για όλους τους υπό εξέταση αναλύτες.

Η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε με πειράματα αναπαραγωγιμότητας με πολλαπλή ανάλυση σε τρεις διαφορετικές ημέρες δειγμάτων τριχών εμβολιασμένων σε επίπεδα 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, και 50,0 ρg/mg για τα DDTs και στο 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, και 10,0 ρg/mg για PCB και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση υπολογίστηκε μικρότερη από 22% για όλα τα PCB και DDTs. Οι τιμές της % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1.

Η ορθότητα της μεθόδου υπολογίστηκε μέσω πειραμάτων ανακτήσεων μετά από εμβολιασμό των δειγμάτων σε επίπεδα συγκέντρωσης των 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, και 10,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για όλα τα PCBs και 2,5, 5,0, 10,0, 25,0, και 50,0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ για όλα τα DDTs. Η μέση ανάκτηση για το PCB28 ήταν 96,6% για όλα τα παραπάνω επίπεδα εμβολιασμού, για το PCB52 ήταν 82,5%, για το PCB101 59,9% και για το PCB138 52,6% (Πίνακας 8.1). Οι μέσες ανακτήσεις DDTs κυμαινόταν από 87,1% για την *op*DDE έως 42,3% για *op*DDD (Πίνακας 1). Η ακρίβεια της μεθόδου υπολογίστηκε και για τα DDTs σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης (10, 25 και 50 $\mu\text{g}/\text{mg}$) και η μέση ανάκτηση υπολογίστηκε 96,2%, 92,3%, 104,1%, 102,3%, και 87,3% για τις ενώσεις *op*DDE, *pp*DDE, *op*DDD, *pp*DDD + *op*DDT, και *pp*DDT, αντίστοιχα. Η μέση % ανάκτηση για τις ενώσεις PCB28, PCB52, PCB101, και PCB138 ήταν 118,7%, 99,9%, 98,8, και 100,1%, αντίστοιχα, σε επίπεδα συγκέντρωσης 0.2, 0.5, 1.0, και 2.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Η ορθότητα της μεθόδου ήταν πολύ υψηλότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη που επιτεύχθηκε με τη χρήση της τεχνικής GC-ECD (κυμάνθηκε από 70-95% για όλους τους υπό εξέταση αναλύτες).

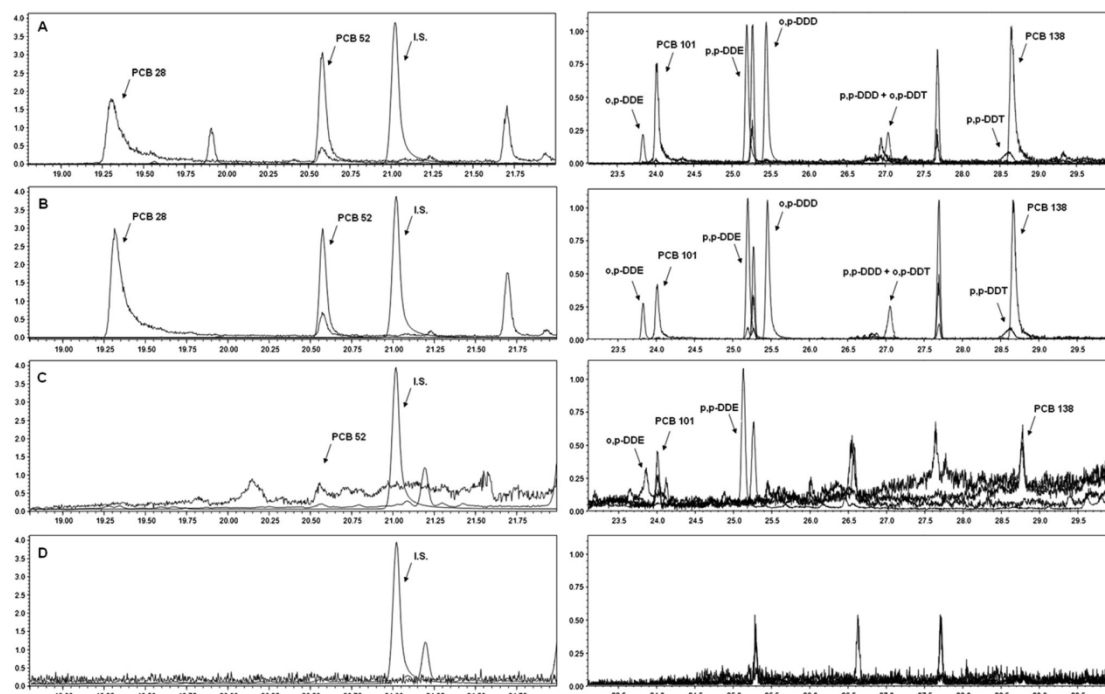
Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση και την επικύρωση της μεθόδου απέδειξαν ότι η τεχνική GC-MS παρέχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και υψηλότερες ανακτήσεις και για το λόγο αυτό επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για τον προσδιορισμό PCBs και DDTs σε δείγματα τρίχας.

Πίνακας 8.1: Αναλυτικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά προσδιορισμού PCBs-DDTs σε δείγματα τρίχας με GC-MS.

Αναλύτες	Rt (min)	m/z	Q1 m/z ^α	Q2 m/z ^α	r ² καμπύλης εξ. προτύπων	Μέσο % σφάλμα	r ² καμπύλης εμβολιασμ.. προτύπων	Μέσο % σφάλμα	Μέση ανάκτηση(%)	LOD (pg/mg)	LOQ (pg/mg)	% Ανάκτηση	%RSD
PCB28	19,26	256	186	150	0,995	-0,4	0,991	8,1	96,6	0,06	0,21	119	17
PCB52	20,54	292	220	255	0,995	-0,6	0,990	11,3	82,5	0,09	0,29	99,9	22
PCB101	24,05	326	256	290	0,995	7,9	0,993	-0,5	59,9	0,04	0,12	98,8	18
PCB138	28,82	360	218	290	0,98	9,9	0,998	2,8	52,6	0,11	0,36	100,1	12
opDDE	23,84	246	318	176	0,996	-3,7	0,9992	3,5	97,1	0,27	0,89	96,2	17
ppDDE	25,25	246	318	176	0,991	1,7	0,994	12,2	68,6	0,29	0,96	92,3	8,5
opDDD	25,58	235	165	199	0,995	-0,8	0,98	-17,4	42,3	0,51	1,71	104	15
ppDDD+opDDT	27,19	235	165	199	0,995	4,0	0,9994	10,1	66,9	1,50	5,00	102	10
ppDDT	28,63	235	165	199	0,99990	-0,9		20,8	61,3	2,14	7,14	87,3	22
IS	21,1	266	194	-	-	-							

^αΤα m/z Q1, Q2, αναφέρονται στα ιόντα ποσοτικοποίησης

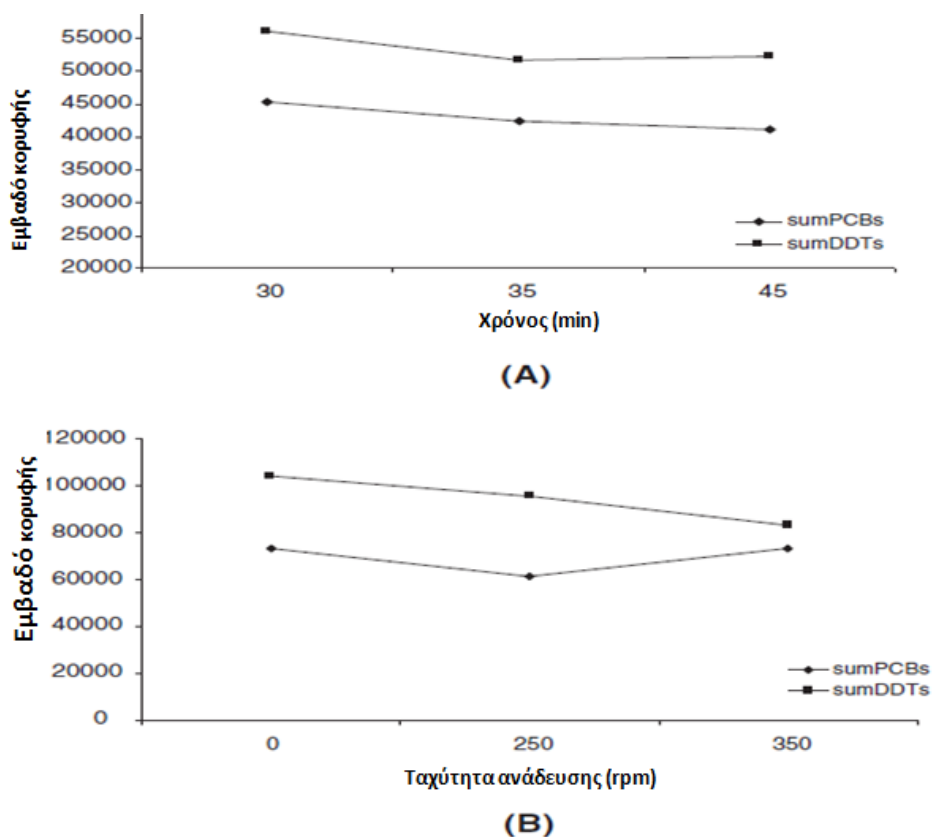
Αφού επιλέχθηκε η τεχνική GC-MS ως καταλληλότερη για τον προσδιορισμό PCBs και DDTs σε δείγματα τρίχας το επόμενο στάδιο ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης της μήτρας με σύγκριση του σήματος που λαμβάνεται όταν αναλύεται απλό πρότυπο αναλύτη εις τριπλούν σε σχέση με την ανάλυση εμβολιασμένου δείγματος εις τριπλούν στην ίδια συγκέντρωση. Σε όλα τα διαλύματα ή εμβολιασμένα δείγματα προστέθηκαν 10 ηg εσωτερικού προτύπου (Internal Standard ή IS). Η επίδραση της μήτρας υπολογίστηκε για τα PCB28, PCB52, PCB101 και PCB138 ίση με 25,3%, 14,4%, 10,3% και 4,3%, αντίστοιχα. Για τις ενώσεις ορDDE, ρρDDE, ορ DDD, ρρDDD + ορDDT και ρρDDT ήταν 25,1, 14,5, 1,0, 7,0, και 59,5%, αντίστοιχα. Η επίδραση της μήτρας στο εσωτερικό πρότυπο ήταν ίση με 8,7%. Καμία αύξηση σήματος λόγω φαινομένων μνήμης δεν παρατηρήθηκε όπως αυτό αποδείχτηκε μετά από συνεχείς αναλύσεις λευκού δείγματος μετά από τρεις συνεχόμενες αναλύσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων τρίχας με 10 ηg/mg PCB και 50 ηg/mg DDTs.. Για να διερευνηθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου, αναλύθηκαν δείγματα τρίχας χωρίς καμία περιεκτικότητα σε αναλύτες και δεν προσδιορίστηκε καμία παρεμπόδιση από άλλη ένωση ή ενδογενή ένωση με τα PCBs ή τα DDTs (χρωματογράφημα D, Σχήμα 8.1).



Σχήμα 8.1: Τυπικά χρωματογραφήματα των: (Α) προτύπου διαλύματος μείγματος των PCB και DDTs, (Β) εμβολιασμένου δείγματος σε συγκεντρώσεις 1 και 10 ηg/mg για PCB και DDTs, αντίστοιχα, (Γ) δείγμα τρίχας θετικό για τα PCB52, 101, και 138 και για ορ και ρρDDE και (Δ) λευκό δείγμα τρίχας που εμβολιάστηκε μόνο με το εσωτερικό πρότυπο.

Η επίδραση του χρόνου επώασης στα όρια ανίχνευσης των αναλυτών διεξήχθη σε εμβολιασμένα δείγματα τρίχας με 2 pg/mg για κάθε PCB και με 10 pg/mg για κάθε DDT. Στη συνέχεια, το εμβολιασμένο δείγμα επωάστηκε στους 90 °C για 30, 35 και 45 λεπτά και το σήμα του κάθε αναλύτη καταγράφηκε. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.2A. Μια μικρή μείωση στα λαμβανόμενα σήματα παρατηρήθηκε για το άθροισμα των σημάτων των DDTs (sumDDTs) όταν αυξανόταν ο χρόνος επώασης. Παρ' όλα αυτά, μεμονωμένα, παρατηρήθηκε μια αύξηση στα σήματα των PCB28 και PCB52 (37% και 36% για το PCB 28 και 21% και 32% για το PCB 52) όταν ο χρόνος επώασης ήταν 35 και 45 λεπτά, αντίστοιχα. Το αντίθετο διαπιστώθηκε για το PCB101 και το PCB138 (μείωση του σήματος κατά -41% και -50% για το PCB101 και κατά -56% και -74% για το PCB138) με αύξηση του χρόνου επώασης στα 35 και 45 λεπτά. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, και προκειμένου να αναπτυχθεί ένα μικρής διάρκειας μέθοδος, τα 30 λεπτά επιλέχθηκε ως ο βέλτιστος χρόνος επώασης.

Το αποτέλεσμα της ανάδευσης μελετήθηκε επίσης σε τρία επίπεδα ταχύτητας (0, 250 και 350 rpm). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο σχήμα 8.2B. Όλα τα ομοειδή PCBs δεν φαίνεται να επηρεάζεται από την ταχύτητα ανάδευσης σε αντίθεση με εκείνες των DDTs για τους οποίους μια μικρή μείωση στο άθροισμα των σημάτων παρατηρήθηκε όταν η ταχύτητα ανάδευσης αυξήθηκε από 0 σε 350 rpm. Με βάση τα παρατηρούμενα εύρηματα, η ταχύτητα ανάδευσης των 250 rpm επιλέχθηκε ως η βέλτιστη για την καλύτερη ομογενοποίηση της τρίχας σε αλκαλικό διάλυμα κατά την διάρκεια του σταδίου επώασης.



Σχήμα 8.2: Επίδραση του χρόνου επώασης και της ταχύτητας ανάδευσης στο εμβαδό κορυφής των PCBs και DDTs.

8.7.2 Καταγραφή της έκθεσης μικρών παιδιών σε PCBs και DDTs

Τα ποσοστά των θετικών δειγμάτων σε PCBs παρουσιάζονται στον πίνακα 8.2 και στο σχήμα 8.3A. Από τα αποτελέσματα φαίνεται να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ του αριθμού των θετικών δειγμάτων για την ένωση PCB52 μεταξύ των αστικών και των αγροτικών περιοχών ($p < 0,001$). Πιο συγκεκριμένα, τα δείγματα από τις αγροτικές περιοχές A και B εμφανίζουν ποσοστά θετικών δειγμάτων σε PCB52 82,1% και 82,8%, αντίστοιχα, ενώ αντίθετα τα δείγματα από την αστική περιοχή μόνο 13,3%. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για την ένωση PCB28 για την αγροτική περιοχή A (75,0%) και για την αγροτική περιοχή B (75,9%) σε σύγκριση με την αστική περιοχή (46,7%) ($p = 0,031$). Καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε για τη συχνότητα ανίχνευσης των ενώσεων PCB101 ($p = 0,817$), και PCB138 ($p = 0,647$) (Πίνακας 8.2) μεταξύ των εξεταζόμενων αγροτικών και αστικών πληθυσμών. Σύμφωνα με τις προσδιοριζόμενες συγκεντρώσεις για κάθε PCB, στατιστικά σημαντικές

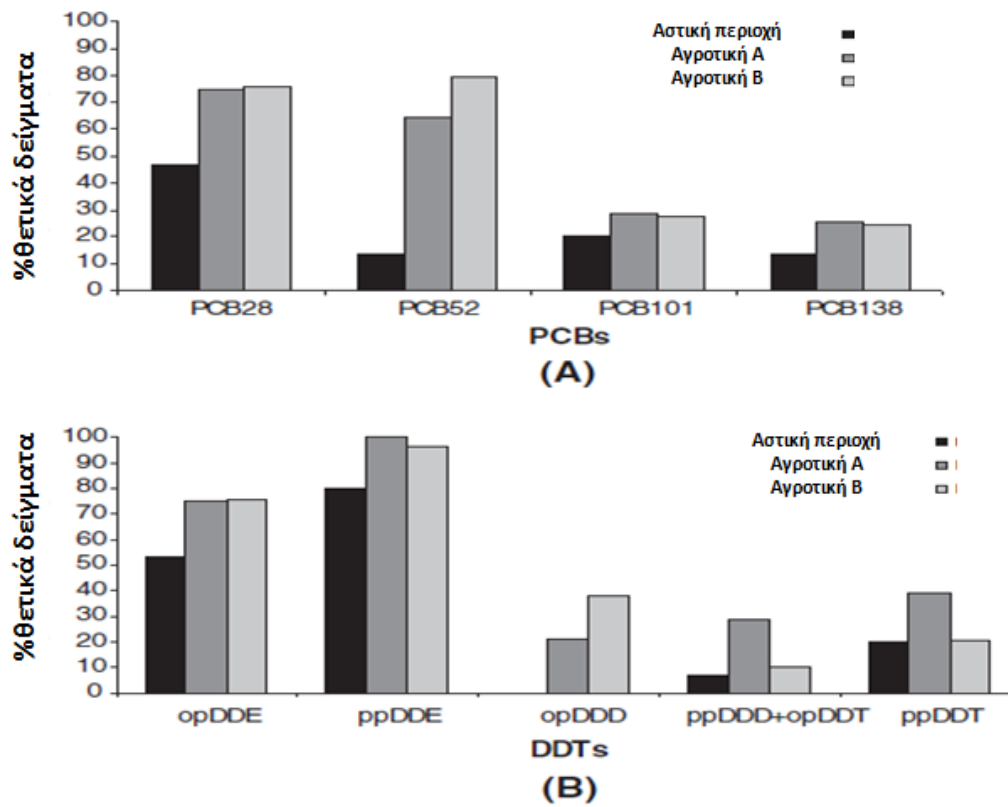
διαφορές μεταξύ του διαφόρων περιοχών που εξετάστηκαν παρατηρήθηκαν για το PCB28 ($p = 0,040$ για όλες τις περιοχές και $p = 0,017$ μεταξύ αγροτικών και αστικών περιοχών) και για το PCB52 ($p < 0,001$) για όλες τις περιοχές. Καμία σημαντική διαφορά δεν παρατηρήθηκε για το PCB101 και το PCB138 (Πίνακας 8.2). Η μέση τιμή \pm SD και οι διάμεσες τιμές του των περιεκτικότητων PCBs παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 8.2. Οι διάμεσες τιμές για την ένωση PCB28 κυμάνθηκαν από 0,03 έως 0,73 $\mu\text{g}/\text{mg}$, για το PCB52 από 0,05 έως 0,43 $\mu\text{g}/\text{mg}$, για το PCB101 και για το PCB138 από 0,02 και 0,06 $\mu\text{g} / \text{mg}$ για όλες τις περιοχές, αντίστοιχα.

Επιπλέον, στον πίνακα 8.3 παρουσιάζονται τα ποσοστά θετικών δειγμάτων για όλους τους μεταβολίτες DDT καθώς και οι προσδιοριζόμενες περιεκτικότητας εκφρασμένες σαν μέση και διάμεση τιμή για όλες τις υπό εξέταση περιοχές. Η πλειοψηφία των δειγμάτων βρέθηκαν θετικά για τουλάχιστον έναν από τους οργανοχλωριωμένους ρύπους. Οι ενώσεις οι οποίες εμφανίστηκαν συχνότερα ήταν οι ppDDE και opDDE. Ο μεταβολίτης ppDDE είχε συχνότητα εμφάνισης 100% για την αγροτική περιοχή Α και 96,6% για την αγροτική περιοχή Β, σημαντικά υψηλότερη ($p = 0,027$) από την αντίστοιχη συχνότητα εμφάνισης στην αστική περιοχή (80,0%) (Πίνακας 8.3). Στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα ποσοστά των θετικών δειγμάτων μεταξύ των αγροτικών και των αστικών περιοχών παρατηρήθηκαν για τους μεταβολίτες opDDE ($p = 0,045$), opDDD ($p = 0,016$), και το άθροισμα των DDTs (sumDDTs) ($p = 0,027$) (Πίνακας 8.3, Σχήμα 8.3B). Επιπρόσθετα, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν ανάμεσα στις υπό εξέταση περιοχές και για το σύνολο των μεταβολιτών DDTs (sumDDTs) ($p = 0,001$). Τέλος, σημαντικές στατιστικές διαφορές παρατηρήθηκαν και για τους μεταβολίτες ppDDE ($p = 0,040$) και opDDD ($p = 0,020$).

Πίνακας 8.2: Μέσες, διάμεσες τιμές και συχνότητα εμφάνισης θετικών δειγμάτων για τα PCBs όπως προσδιορίστηκαν σε δείγματα τρίχας μικρών παιδιών από αστικές και αγροτικές περιοχές της Κρήτης

Αναλύτες	Περιοχή	%θετικά δείγματα	ρ-τιμή για όλες τις περιοχές	ρ-τιμή για αστικές – αγροτικές περιοχές	Μέση τιμή (pg/mg)	±SD	Διάμεση τιμή	Έυρος περιεκτικότητας (pg/mg)	ρ-τιμή για όλες τις περιοχές	ρ-τιμή για αστικές – αγροτικές περιοχές
PCB28	Αστική	46,7	0,098	0,031	3,7	13	0,03	LOQ-50,9	0,040	0,017
	Αγροτική Α	75,0			2,3	4,5	0,73	LOQ-22,5		
	Αγροτική Β	75,9			0,8	0,9	0,53	LOQ-3,7		
	Σύνολο	69,4			2,0	6,6	0,50	LOQ-50,9		
PCB52	Αστική	13,3	<0,001	<0,001	0,1	0,1	0,05	LOQ-0,4	<0,001	<0,001
	Αγροτική Α	82,1			0,7	0,8	0,43	LOQ-3,3		
	Αγροτική Β	82,8			0,6	0,9	0,29	LOQ-2,8		
	Σύνολο	68,1			0,6	0,8	0,20	LOQ-3,3		

PCB 101	Αστική	20,0	0,817	0,528	5,4	14	0,02	LOQ-51,3	0,826	0,561
	Αγροτική Α	28,6			8,6	20	0,02	LOQ-93,8		
	Αγροτική Β	27,6			5,5	13,2	0,02	LOQ-62,8		
	Σύνολο	26,4			6,7	0,02	0,02	LOQ-93,8		
PCB 138	Αστική	13,3	0,647	0,352	1,3	3,6	0,06	LOQ-13,1	0,725	0,435
	Αγροτική Α	25,0			1,8	4,2	0,06	LOQ-17,2		
	Αγροτική Β	24,1			1,8	6,2	0,06	LOQ-33,0		
	Σύνολο	22,2			1,7	4,9	0,06	LOQ-33,0		



Σχήμα 8.3: %Ποσοστό εμφάνισης των (Α)PCBs και (Β)DDTs στον πληθυσμό μικρών παιδιών από τις διάφορες περιοχές που εξετάστηκαν.

Πίνακας 8.3: Μέσες, διάμεσες τιμές και συχνότητα εμφάνισης θετικών δειγμάτων για τα DDTs όπως προσδιορίστηκαν σε δείγματα τρίχας μικρών παιδιών από αστικές και αγροτικές περιοχές της Κρήτης.

Αναλύτες	Περιοχή	%θετικά δείγματα	p-τιμή για όλες τις περιοχές	p-τιμή για αστικές – αγροτικές περιοχές	Μέση τιμή (pg/mg)	±SD	Διάμεση τιμή	Έυρος περιεκτικότητας (pg/mg)	p-τιμή για όλες τις περιοχές	p-τιμή για αστικές – αγροτικές περιοχές
opDDE	Αστική	53,3	0,116	0,045	0,8	0,9	0,54	LOQ-2,9	0,111	0,168
	Αγροτική A	82,1			2,3	4,3	0,98	LOQ-22,5		
	Αγροτική B	75,9			2,7	5,7	0,69	LOQ-23,5		
	Σύνολο	73,6			2,1	4,5	0,70	LOQ-23,5		
ppDDE	Αστική	80,0	0,020	0,027	2,2	2,2	1,43	LOQ-7,6	0,040	0,081
	Αγροτική A	100			8,6	15,2	3,57	1,0-65,3		
	Αγροτική B	96,6			6,3	16,2	1,18	LOQ-68,0		
	Σύνολο	94,4			6,4	14,1	1,60	LOQ-68,0		

	Αστική	0,0	0,018	0,016	0,3	-	-	-	0,020	0,081
ορDDD	Αγροτική Α	21,4			2,4	7,7	0,26	LOQ-41,2		
	Αγροτική Β	37,9			4,6	10	0,26	LOQ-38,6		
	Σύνολο	23,6			2,8	8,1	0,30	LOQ-41,2		
	Αστική	6,7	0,092	0,243	0,9	0,4	0,75	LOQ-2,4	0,100	0,204
ρρDDD+ορDDT	Αγροτική Α	28,6			4,7	10	0,75	LOQ-41,8		
	Αγροτική Β	10,3			2,8	6,4	0,75	LOQ-26,7		
	Σύνολο	16,7			3,1	7,7	0,80	LOQ-41,8		
	Αστική	20,0	0,220	0,450	2,2	2,7	1,1	LOQ-9,6	0,189	0,394
ρρDDT	Αγροτική Α	39,3			4,5	5,6	1,1	LOQ-25,5		
	Αγροτική Β	20,7			4,0	9,0	1,1	LOQ-39,2		

SumDDTs	Σύνολο	27,8			2,8	6,8	1,1	LOQ-39,2		
	Αστική	80,0	0,020	0,027	6,3	3,9	4,7	LOQ-13,2	0,001	0,021
	Αγροτική Α	100			22,4	33	11,7	3,9-161,9		
	Αγροτική Β	96,6			20,5	45	4,6	LOQ-189		
	Σύνολο	94,4			20,5	45	4,6	LOQ-189		

Με την παρούσα μελέτη, επετεύχθη η ανάπτυξη μιας ταχείας, αποδοτικής και με μεγάλη ακρίβεια μεθόδου για την ταυτόχρονη ανίχνευση και προσδιορισμό των PCB και DDTs σε δείγματα τρίχας με χρήση της τεχνικής HSSPME / GC-MS τεχνική. Η μέθοδος αυτή είναι απλούστερη και ταχύτερη από τη μέθοδο που παρουσιάστηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο καθώς και από προηγούμενες αναφερθείσες μεθόδους, [259, 260], δεδομένου ότι δεν υπάρχει απαίτηση για τη χρονοβόρα προκατεργασία της μήτρας (π.χ. επώαση μία νύχτα, εκχύλιση με SPE, ή εκχύλιση με υπερήχους). Το μόνο στάδιο που παραμένει ίδιο σε σχέση με τις προηγούμενες μεθόδους που αναφέρθηκαν προηγουμένως είναι το βήμα της απολύμανσης για την απομάκρυνση ενδεχόμενων εξωτερικών μολυντών.

Το σημαντικό της συγκεκριμένης μελέτης είναι ότι η νέα μέθοδος εφαρμόστηκε στον ευαίσθητο πληθυσμό των παιδιών (κάτοικοι τριών διαφορετικών περιοχών της Κρήτης, Ελλάδα) από τα οποία συλλέχθηκαν δείγματα τρίχας ανάλυση προκειμένου να αξιολογηθεί η συνολική επιβάρυνση σε PCB και DDTs. Η επιλογή αυτής της ομάδας του πληθυσμού έγινε με βάση την εκτίμηση της χαμηλής έκθεσης (παρελθόν και παρόν) των παιδιών στους συγκεκριμένους ρύπους, δεδομένου ότι το νησί της Κρήτης είναι μια περιοχή με χαμηλή βιομηχανική δραστηριότητα. Η μόνη δυνατή πηγή ρύπανσης, κυρίως για DDTs, θα μπορούσε να είναι η εκτεταμένη χρήση τέτοιων ενώσεων κατά το παρελθόν στη γεωργία ή λόγω των διατροφικών συνηθειών.

Οι ενώσεις PCB28 και PCB52 είχαν τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης σε σύγκριση με τις ομοειδείς ουσίες PCB101 και PCB138. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ανίχνευσης PCB28 ήταν 46,7% για την αστική περιοχή, 75,0% για την αγροτική περιοχή Α, και 75,9% για την αγροτική περιοχή Β (συνολικά, 69,4% όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν θετικά για PCB28). Τα αντίστοιχα ποσοστά ανίχνευσης της ένωσης PCB52 ήταν επίσης σχετικά υψηλά, με ποσοστά που κυμαίνονταν από 13,3% (για την αστική περιοχή) σε 82,8% (για την αγροτική περιοχή Β), ενώ το 68,1% του συνόλου των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν θετικά για το συγκεκριμένο πτητικό συστατικό. Τα ποσοστά ανίχνευσης για PCB101 και PCB138 ήταν πολύ χαμηλότερα και κυμαίνονταν από 13,3% (PCB138, αστική περιοχή) έως 28,6% (PCB101, αγροτική περιοχή Α) (Πίνακας 8.2). Σημαντικές διαφορές στα ποσοστά των % θετικών δειγμάτων παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις PCB28 ($p = 0,031$) και PCB52 ($p < 0,001$) μεταξύ δειγμάτων που συλλέχθηκαν από

αστικές και αγροτικές περιοχές, ενώ για όλες τις περιοχές παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μόνο για την ένωση PCB52 ($p < 0,001$).

Το γεγονός ότι το PCB28 και το PCB52 ανιχνεύθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά επιτρέπει να θεωρηθούν τα συγκεκριμένα ισομερή ως κατάλληλους βιοδείκτες για την αξιολόγηση των επιπτώσεων στην υγεία των παιδιών από αυτούς τους συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς ρύπους. Στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο για την ένωση PCB28 ($p = 0,040$), και PCB52 ($p < 0,001$) ανά περιοχή και ανά αστική / αγροτική ταξινόμηση ($p = 0,017$ και $p < 0,001$, αντίστοιχα). Με βάση τη βιβλιογραφία, [243, 244, 248, 255, 261] διακυμάνσεις έχουν παρατηρηθεί μεταξύ των ομάδων του πληθυσμού από διάφορες περιοχές που έχουν διαφορετική βιομηχανική ανάπτυξη και επομένως ένας σημαντικός παράγοντας στην εμφάνιση των συγκεκριμένων τύπων αποτελεί η βιομηχανική δραστηριότητα. Ως εκ τούτου, επειδή οι επιλεγμένες περιοχές αυτής της μελέτης δεν είχαν καμία σημαντική βιομηχανική δραστηριότητα, υπάρχουν ανεπαρκή αποτελέσματα, ειδικά για τις ενώσεις PCB101 και PCB138, ενώ και τα ποσοστά ανίχνευσης των συγκεκριμένων ρύπων ήταν σχετικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα επίπεδα που παρουσιάζονται στη βιβλιογραφία. Παρ' όλα αυτά, συγκρίνοντας τα συγκεκριμένα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο, που αφορούσαν αγροτικές περιοχές της Κρήτης και της Πελοποννήσου εξετάστηκαν, τα θετικά δείγματα% για τις ενώσεις των PCB28, 52, 101, και 138 ήταν λιγότερα (9,5%, 85,7%, 0% και 9,5%, αντίστοιχα) σε σχέση με τα ποσοστά που προσδιορίστηκαν στις τρίχες των παιδιών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στα μικρότερα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν με την προτεινόμενη μέθοδο.

Η περιεκτικότητα του συνόλου των DDTs, εκφρασμένη ως διάμεση τιμή, της αγροτικής περιοχής A ήταν υψηλότερη (11,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$) από τα δείγματα που συλλέχθηκαν από την αστική περιοχή και την αγροτική περιοχή B (4,7 και 4,6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, αντιστοίχως). Η πλειονότητα των δειγμάτων τρίχας που αναλύθηκαν βρέθηκαν θετικό για DDTs. Συγκεκριμένα ποσοστό ίσο με 94,4% του συνόλου των δειγμάτων των τριχών ήταν θετικά για τουλάχιστον μία από τις εξεταζόμενες ενώσεις DDTs (Πίνακας 8.3). Τα δείγματα από την αγροτική περιοχή A ήταν 100% θετικά για το σύνολο των DDTs ενώ τα δείγματα από την αγροτική περιοχή B ήταν θετικά κατά 96,6%. Ακόμη και για την αστική περιοχή τα ποσοστά ανίχνευσης ήταν 80,0%. Οι οργανοχλωριωμένοι

ρυπαντές με τα υψηλότερα ποσοστά ανίχνευσης ήταν οι μεταβολίτες του DDT, ppDDE (94,4%) και opDDE (73,6%). Οι ενώσεις opDDD, ppDDD + opDDT και ppDDT ανιχνεύτηκαν επίσης για όλες τις εξεταζόμενες περιοχές αλλά σε χαμηλότερα ποσοστά ανίχνευσης. Εν συντομία, τα ποσοστά ανίχνευσης για αυτές τις ενώσεις κυμαίνονταν από 0% (opDDD, αστική περιοχή) σε 39,3% (ppDDT, αγροτική περιοχή Α). Επιπλέον, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν στα ποσοστά ανίχνευσης για opDDE ($p = 0,045$), ppDDE ($p = 0,027$), opDDD ($p = 0,016$) και sumDDTs ($p = 0,027$) ανά αστική/αγροτική περιοχή, ενώ ανά περιοχή, ανέξαρτητα αγροτικής ή αστικής, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν για ppDDE ($p = 0,020$), opDDD ($p = 0,018$) και sumDDTs ($p = 0,020$) (Πίνακας 8.3). Αυτές οι διαφοροποιήσεις από περιοχή σε περιοχή είναι πιθανόν να οφείλονται στις γεωργικές δραστηριότητες κατά το παρελθόν, όπως κυρίως καλλιέργειες σε θερμοκήπια ή ανοικτές καλλιέργειες. Παρά το γεγονός ότι, το DDT έχει απαγορευθεί τις τελευταίες δεκαετίες στην Ελλάδα, οι παρατηρούμενες διαφορές σχετικά με τα ποσοστά ανίχνευσής του μπορεί να δικαιολογηθεί από την εκτεταμένη χρήση του κατά το παρελθόν. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την υπολειμματική του δράση και το μεγάλο χρόνο ημίσειας ζωής του μόλις εισέλθει στους ζωντανούς οργανισμούς, μπορεί να δικαιολογήσει τις διαφοροποιήσεις στα αποτελέσματα. Τα ποσοστά ανίχνευσης για το σύνολο των DDTs της παρούσας μελέτης είναι παρόμοια με τα περισσότερα από τα αναφερόμενα ποσοστά στην υπάρχουσα βιβλιογραφία [242-244] ή υψηλότερα σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Αυτό μπορεί επίσης να αποδοθεί στα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης με την προτεινόμενη μέθοδο. Μετά από μελέτη της βιβλιογραφίας, αυτή φαίνεται να είναι η πρώτη προσπάθεια για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των προαναφερθέντων αναλυτών χρησιμοποιώντας την τεχνική της SMPE/GC-MS. Η μόνη παραπλήσια μελέτη είναι του Salquebre και των συνεργατών του (2012) [258], όπου παρουσιάζεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός 22 φυτοφάρμακων με χρήση της τεχνικής SPME/GC-MS/MS. Μεταξύ αυτών των 22 φυτοφάρμακων, προσδιορίστηκαν και οι μεταβολίτες του DDT με LOQ από 0,02 pg/mg (για ppDDE) έως 0,5 pg/mg (για ppDDT). Σε σύγκριση με τα όρια ανίχνευσης της παρούσας μελέτης (Πίνακας 8.1), ο Salquebre και οι συνεργάτες του πέτυχαν ακόμα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης λόγω της τεχνικής που αεριοχρωματογραφήσαν. Από την άλλη πλευρά, με την

παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε μια γρήγορη τεχνική προκατεργασίας για τον προσδιορισμό έμμονων οργανικών ρύπων στις τρίχες μικρών παιδιών με την τεχνική της HSSPME σε συνδυασμό με ένα απλό GC-MS με ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης.

8.8 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας με την παρούσα μελέτη επετεύχθη η ανάπτυξη μιας γρήγορης και οικονομικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό έμμονων οργανικών ρύπων όπως PCBs και DDTs σε βιολογικά δείγματα με την τεχνική SPME σε συνδυασμό με ένα απλό GC-MS. Η προτεινόμενη μέθοδος επιτρέπει τον προσδιορισμό έμμονων οργανικών ρύπων σε μικρές περιεκτικότητες της τάξης των $\mu\text{g}/\text{mg}$ και είναι ιδιαίτερα ικανή να εφαρμοστεί για τη βιοπαρακολούθηση της έκθεσης των ανθρώπων σε ρυπαντές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9^ο

Γενικά συμπεράσματα

9.1 Εισαγωγή

Η βιοπαρακολούθηση έχει καθιερωθεί σαν ένα απαραίτητο εργαλείο για τη μελέτη της επαγγελματικής και περιβαλλοντικής έκθεσης σε ξеноβιοτικές χημικές ενώσεις, στις οποίες περιλαμβάνονται οι έμμονοι οργανικοί ρυπαντές [262]. Η ερμηνεία και η χρήση των δεδομένων από την βιοπαρακολούθηση στα πλαίσια της Επιστήμης της Τοξικολογίας, που είναι αυτά του εντοπισμού της δυνητικής έκθεσης σε συγκεκριμένες πηγές επιμόλυνσης ή της ταυτοποίησης αυξημένης βιοσυσώρευσης μετά από έκθεση, απαιτεί τη μελέτη πολλών παραγόντων, στους οποίους περιλαμβάνονται οι τοξικοκινητικές ιδιότητες των επιμολυντών, τα προβλήματα που παρουσιάζονται στις αναλυτικές μεθόδους και στους προσδιορισμούς της συγκέντρωσης των επιμολυντών σε ανθρώπινες βιολογικές μήτρες, αλλά και τις πιθανές οδούς της έκθεσης σε ξеноβιοτικές ενώσεις.

Η σημαντικότητα της βιοπαρακολούθησης επεκτάθηκε έτσι ώστε να γίνει το κύριο εργαλείο για την ανθρώπινη έκθεση σε POPs. Οι ίδιες χημικές και φυσικές ιδιότητες που οδήγησαν στη χρόνια παραμονή των POPs στο περιβάλλον, οδήγησαν και στην παραμονή στα βιολογικά συστήματα, με περιορισμένους ρυθμούς μεταβολισμού, αργής αποβολής και βιοσυσώρευσης. Για τους λόγους αυτούς οι πολύ χαμηλοί ρυθμοί έκθεσης του πληθυσμού, προσθέτουν επιπλέον δυσκολία στην ανίχνευση και στον αναλυτικό προσδιορισμό που μπορούν να οδηγήσουν σε συσώρευση των χημικών αυτών ενώσεων στους ανθρώπινους ιστούς κατά τη διάρκεια του χρόνου, και στην ευκολότερη ποσοτικοποίηση τους.

9.2 Επιλογή μέσου βιοπαρακολούθησης των POPs

Ως μέσο βιοπαρακολούθησης στη συγκεκριμένη μελέτη επιλέχθηκε η τρίχα, αφού η ραγδαία διάδοση της ανάλυσής της ως βιολογικής μήτρας για τοξικολογικές αναλύσεις, την έχει μεταφέρει από τη κατηγορία των "εναλλακτικών" υποστρωμάτων στην κατηγορία των "κλασσικών" υποστρωμάτων, στα οποία ανήκουν το αίμα και τα ούρα [263]. Η τρίχα έχει πάρει τη θέση της ως μία φυσική μήτρα σε πολλούς χώρους, όπως αυτοί των τοξικολογικών ή των κλινικών αναλύσεων για τον προσδιορισμό των φαρμάκων ή των ναρκωτικών, της εκτίμησης της έλλειψης ιχνοστοιχείων από

τον ανθρώπινο οργανισμό ή της βιοπαρακολούθησης των ανόργανων ενώσεων [240,259,264-275].

Το αυξημένο ενδιαφέρον που δέχεται η ανάλυση της τρίχας μπορεί εύκολα να ερμηνευθεί από τα αρκετά πλεονεκτήματα τα οποία αφορούν σε αυτή τη μήτρα και κυρίως η ευκολία που παρουσιάζει η δειγματοληψία και η αποθήκευσή της, που δεν απαιτούν ιδιαίτερα μέτρα, όπως η παρουσία ιατρικού προσωπικού, μέτρα προφύλαξης ή συνθήκες ψύξης. Τα φαινόμενα μνήμης της τρίχας εξαιτίας της βιοσυσσώρευσης των ξеноβιοτικών σε αυτή και η δυνατότητα αναδρομικής ανάλυσης προστίθενται στην επιτυχία της σε διάφορους τομείς όπως στην διαλεύκανση εγκλημάτων από υπερβολική δόση φαρμάκων ή στον προσδιορισμό του ιστορικού σε περιπτώσεις εθισμού σε ναρκωτικά. Το ευρύ παράθυρο ανίχνευσης, συγκρινόμενο με άλλα βιολογικά υγρά, συνετέλεσε στο να θεωρείται η ανάλυση της τρίχας ο πιο σημαντικός βιοδείκτης. Η τρίχα ως μέσο για την βιοπαρακολούθηση των έμμονων οργανικών ρυπαντών όπως είναι τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια και τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα που εξετάζονται σε αυτή τη διατριβή, παρουσιάζει ένα ακόμη πολύ μεγάλο πλεονέκτημα, τον λιπόφιλο χαρακτήρα της. Οι POPs είναι έχουν έντονα υδροφοβικές ιδιότητες και απορροφώνται σε πολύ μεγάλο ποσοστό από μέσα με λιπόφιλο υπόστρωμα. Όπως ήδη παρουσιάστηκε στη συγκεκριμένη διατριβή, ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης - νερού ($\log K_{ow}$) είναι πολύ μεγάλος και κατά συνέπεια και η απορρόφησή τους πραγματοποιείται αντίστοιχα σε υψηλά επίπεδα. Η τρίχα έχει ένα ποσοστό 1-9% κατά βάρος λίπος το οποίο είναι αρκετό για να ενσωματώσει τους επίμονους οργανικούς επιμολυντές [276,277].

Η ποσότητα του δείγματος της τρίχας αποτέλεσε σημαντική παράμετρο για τη χρήση της τρίχας ως μέσο βιοπαρακολούθησης στη συγκεκριμένη μελέτη. Τα δείγματα συλλέχτηκαν εύκολα από τους εθελοντές αφού ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της τρίχας συγκρινόμενη με τις άλλες βιολογικές μήτρες είναι η ευκολία της δειγματοληψίας, το γεγονός ότι δεν προκαλεί πόνο, δεν είναι επεμβατική και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς να προκαλέσει πρόσθετη ενόχληση ή ανησυχία στο άτομο που υποβάλλεται σε αυτή. Ως αποτέλεσμα, η δειγματοληψία της τρίχας απολαμβάνει υψηλά επίπεδα συναίνεσης από εθελοντές ακόμα και από ευαίσθητες ομάδες όπως τα παιδιά ή οι έγκυες γυναίκες. Χρησιμοποιώντας μία μεγάλη ποσότητα τρίχας

αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου και αυτό μπορεί να γίνει κατανοητό σε ένα περιορισμένο μέρος του πληθυσμού αλλά μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό περιορισμό σε μελέτες που απαιτούν τη συμμετοχή πολυάριθμων ομάδων. Είναι γνωστό ότι οι εθελοντές δότες μειώνονται δραματικά όταν αυξάνεται η αιτούμενη ποσότητα τρίχας. Επιπλέον δεν θα γίνει δυνατό να γίνει δειγματοληψία από νεογνά και μικρής ηλικίας παιδιά [279]. Για τους λόγους αυτούς, στην παρούσα εργασία δόθηκε ιδιαίτερη προτεραιότητα στην ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων που απαιτούν μικρές ποσότητες δείγματος και για το λόγο αυτό το δείγμα το οποίο λήθηκε από τους εθελοντές δεν ξεπέρασε τα 400 mg, ενώ η ποσότητα της τρίχας που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα δεν ξεπέρασε τα 200 mg .

9.3 Η σημασία της ευαισθησίας της αναλυτικής τεχνικής στην ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση για τον προσδιορισμό χαμηλών επιπέδων έκθεσης

Όταν πραγματοποιείται εκτίμηση της έκθεσης του πληθυσμού σε ρυπαντές από το περιβάλλον μέσω της ποσοτικοποίησης χημικών ουσιών σε μία βιολογική μήτρα η αναλυτική ευαισθησία είναι πολύ σημαντικός παράγοντας επειδή σε αντίθεση με τις περιπτώσεις έντονης έκθεσης (Π.χ. δηλητηρίασης) τα επίπεδα συγκέντρωσης τα οποία μετρώνται μετά από έκθεση είναι σχετικά μικρά. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση που βρέθηκε στον ορό σε περιπτώσεις που αφορούσαν οξεία δηλητηρίαση από φυτοφάρμακα κυμαίνονται από 20 g/L (για το bifenthrin) έως 1,5 και 6,5 mg/L (για το carbofuran και το endosulfan, αντίστοιχα) [279]. Για να έχουμε μία σύγκριση τα επίπεδα της συγκέντρωσης των φυτοφαρμάκων που ανιχνεύτηκαν σε ορό γενικού πληθυσμού είναι περίπου 10 ng /L ή μικρότερα [280] δηλαδή ποσότητες από εκατό έως χίλιες φορές χαμηλότερα. Η ευαισθησία είναι ακόμη πιο σημαντική στην περίπτωση της ανάλυσης της τρίχας γιατί το βάρος του χρησιμοποιούμενου δείγματος περιορίζεται συχνά στα 200- 500 mg σε αντίθεση με τις άλλες βιολογικές μήτρες όπως ούρα, αίμα/ορός, μηκόνιο, για τις οποίες όταν θέλουμε να προσδιορίσουμε οργανικούς ρυπαντές χρησιμοποιούμε 2-5 mL [281-284] ενώ στο μητρικό γάλα χρησιμοποιούμε ακόμη μεγαλύτερη ποσότητα, που φτάνει στα 10 mL [285,286]. Βεβαίως θα πρέπει να τονιστεί ότι όταν η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση χρησιμοποιείται ως εργαλείο διάγνωσης η επίτευξη μεγάλης ευαισθησίας θα πρέπει να συνδυάζεται απαραίτητα με υψηλά

επίπεδα διακριτικής ικανότητας. Η μεγάλη διακριτική ικανότητα στη συγκεκριμένη μελέτη διασφαλίστηκε με οργανολογίες όπως η GC-MS και η GC-DFHRMS. Μόνο με αυτές τις τεχνικές επιτεύχθηκε ο περιορισμός στο ελάχιστο του κινδύνου παραγωγής ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Στον πίνακα 9.1 εμφανίζονται τα χαρακτηριστικά των οργάνων της χρωματογραφίας που είναι κατάλληλα για τον προσδιορισμό των POPs.

Πίνακας 9.1: Σύγκριση των λειτουργικών χαρακτηριστικών των Φασματογράφων Μάζας που θεωρούνται κατάλληλοι για τον προσδιορισμό των POPs

	GC-HRMS	GC-HRMS TOF	GC MS/MS	FAST GC-TOF-MS	GC-ION TRAP MS	GCxGC-MS/TOFMS	GC-LRMS	GC-FTICR LC-FTICR	GCXGC ECD	LC-MS/MS	LC-QTOF MS
Ενδεικτικό κόστος επένδυσης (σε χιλιάδες Ευρώ)	500	300-500	150-200	300	100	300	100	1000	150	300-500	300-500
Λειτουργικά κόστη	οοο	οο	οο	ο	ο	οο	ο	οοοο	ελάχιστα	οο	οο
Παραγωγική ικανότητα	ο	οο	ο	οοο	οο	οο	ο	ο	οοοο	οοο	οο
Αριθμός των αναλυτών που μπορούν να προσδιοριστούν στη μονάδα του χρόνου	ο	ο	ο	οοο	οοο	οοο	ο	οοο	οοο	οοο	οο
Ευαισθησία του οργάνου - Ελαχιστο όριο ανίχνευσης - LOD	οοοο	οο	οοο MRM οοο SCAN	ο	οο	οο	οο SIM οοο SCAN	Πολύ χαμηλή	Υψηλά μόνο για οργανοχλωριωμένες ενώσεις	οοο MRM οοο SCAN	οοο MRM οοο SCAN
Διακριτική ικανότητα του οργάνου	οοο	οο	οο	ο	ο	οο	ο	οοοο	οο	οο	οοο
Δεξιότητες και επίπεδο δεξιοτήτων του αναλυτή	οοο	οο	οο	οο	οο	οοο	ο	οοοο	οο	οο	οο
Καταλληλότητα για προσδιορισμούς ιχνοστοιχείων	οοοο	οοο	οοο	ο	ο	οο	ο	Πολύ χαμηλή	ο	Πολύ χαμηλή	Πολύ χαμηλή
Ικανότητα προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης άγνωστων ενώσεων	αμφίβολη	οοοο	αμφίβολη	οο	οο	οοο	αμφίβολη	οοο	οο	αμφίβολη	οο
Ικανότητα προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης γνωστών ενώσεων	οοοο	οοο	οοο	οο	ο	οοο	ο	Πολύ χαμηλή	Υψηλά μόνο για οργανοχλωριωμένες ενώσεις	οοο	οοο
Ικανότητα Ανάλυσης με περιορισμένο καθαρισμό δείγματος	Πολύ χαμηλή	ο	οοο	ο	Πολύ χαμηλή	οοο	όχι	αμφίβολη	οοο	οο	οο

Τα χαρακτηριστικά παρουσιάζονται σαν σχετική μέτρηση (οοοο η μεγαλύτερη , οοο Υψηλή ,οο Μέτρια, ο Χαμηλή)

Το επιστημονικό έλλειμμα από μεθόδους με υψηλή ευαισθησία αποτέλεσε προφανώς τον κύριο περιορισμό για να χρησιμοποιηθεί με μεγαλύτερη αποδοχή η τρίχα σαν μέσο βιοπαρακολούθησης. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να μην υπάρχουν ακόμη όρια από επίσημες αρχές Δημόσιας Υγείας για τους επιμολυντές στη τρίχα. Παραμένουν λοιπόν ως μήτρες αναφοράς τα ούρα και το αίμα [287]. Το έλλειμμα από επαρκείς μεθόδους με μεγάλη ευαισθησία συνέβαλε στην σκέψη και την καθιέρωση της ιδέας ότι η ανάλυση της τρίχας δεν μπορεί να αποτελέσει ένα αξιόπιστο δείκτη της περιβαλλοντικής έκθεσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο σαν βοηθητικό εργαλείο [288]. Η δυσκολία στο να τεκμηριωθεί το πότε μία μέθοδος διαθέτει αρκετή ευαισθησία έτσι ώστε να αποδείξει την ανθρώπινη έκθεση έχει τονιστεί σε πάρα πολλές μελέτες. Αν και η τελευταία απόδειξη των μεθόδων παραμένει η θετική ανίχνευση των επιμολυντών στα διάφορα δείγματα, τα αποτελέσματα κάτω από τα όρια ανίχνευσης μπορούν να ερμηνευθούν με διαφορετικούς τρόπους. Από τη μία πλευρά, αρνητικά αποτελέσματα μπορούν να μας οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός που εξετάστηκε δεν εκτέθηκε στους επιμολυντές που εξετάζουμε ή ότι εκτέθηκε σε χαμηλότερα όρια από αυτά που θα ήταν αναμενόμενα. Για τα φάρμακα και τα ναρκωτικά η συγκέντρωση σε μία βιολογική μήτρα αντιστοιχεί σε μία "τυπική δόση" (έτσι ώστε να φτάσουμε τη δόση θεραπείας για τα φάρμακα ή την ποσότητα που αντιστοιχεί σε μία συνήθη δόση για τα ναρκωτικά). Ακόμη και αν οι συγκεντρώσεις κυμαίνονται, υπάρχει περιορισμένη ανάγκη να επιτύχουμε όρια ανίχνευσης χαμηλότερα από την αναμενόμενη συγκέντρωση. Στο πεδίο της περιβαλλοντικής και της επαγγελματικής έκθεσης, δεν υπάρχει αυτή η "θεραπευτική ζώνη" κάτω από την οποία η ευαισθησία δεν θα είναι σημαντική επειδή το επίπεδο της έκθεσης μπορεί να διαφέρει από μεταξύ των ανθρώπων μερικές τάξεις μεγέθους. Με τη συγκεκριμένη μελέτη, έχοντας μελετήσει τα χαρακτηριστικά της οργανολογίας της φασματομετρίας μάζας σύμφωνα με τον πίνακα 9.2, αποφασίστηκε η χρήση της τεχνικής της φασματογραφίας μάζας συζευγμένη με φασματοφωτόμετρο διπλής εστίασης με μαγνητικό και ηλεκτρικό τομέα. Με τη συγκεκριμένη οργανολογία επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της βιοσυσσώρευσης POPs σε τρίχες και η εκτίμηση της έκθεσης των συγκεκριμένων ρυπαντών στον άνθρωπο, αφού η συγκεκριμένη τεχνική παρείχε από τα μικρότερα όρια ανίχνευσης που απαντώνται στη βιβλιογραφία.

Πίνακας 9.2: Σύγκριση αναλυτικών χαρακτηριστικών της παρούσας διατριβής σε σχέση με τη βιβλιογραφία

Αναλύτης	Αρ. δειγμάτων-ηλικία	Όριο ανίχνευσης	Περιοχή	Αναφορά
PCB 28, 52, 101	n = 14, 26-68y	LOD: 500	Europe	[243]
PCB 28, 101	n = 47 _d	LOD: 0.3-2	Europe	[244]
PCB28	n = 5 _h , 20-40y	n.a.	Italy	[261]
	n = 10, 25-53y	LOD: 10-320	USA	[255]
	n = 40	LOD: 20-120	China	[248]
		LOD:0,017		Παρούσα Διατριβή με DFS MassSpec
		LOD:0,2		Παρούσα Διατριβή με SingleQuad
PCB52	n = 5 _h , 20-40y	n.a.	Italy	[261]
	n = 74, 2-9y	LOD: 2-60	China	[247]
	n = 10, 25-53y	LOD: 10-320	USA	[255]
	n = 40	LOD: 20-120	China	[248]
		LOD:0,016		Παρούσα Διατριβή με DFS MassSpec
		LOD:0,2		Παρούσα Διατριβή με SingleQuad
PCB101	n = 5 _h , 20-40y	n.a.	Italy	[261]
	n = 10, 25-53y	LOD: 10-320	USA	[255]
	n = 40	LOD: 20-120	China	[248]
		LOD:0,013		Παρούσα Διατριβή με DFS MassSpec
		LOD:0,3		Παρούσα Διατριβή με SingleQuad
PCB118	n = 42, adoe	LOD: 100-200	Romania	[242]
	n = 6 _i , 20-40y	n.a.	Italy	[261]
	n = 40	LOD: 20-120	China	[248]
	n = 40	LOD: 20-120	China	[248]
	n = 40	LOD: 20-120	Romania	[242]
		LOD:0,012		Παρούσα Διατριβή με DFS MassSpec

PCB138	n = 42, ado n = 5 _h , 20-40y	LOD:0,2		Παρούσα Διατριβή με SingleQuad
		LOD: 100-200	Italy	[261]
		n.a.	China	[248]
		LOD:0,013		Παρούσα Διατριβή με DFS MassSpec
PCB153	n = 42, ado _e n = 5 _h , 20-40y	LOD:0,2		Παρούσα Διατριβή με SingleQuad
		n.a.	Romania	[242]
		LOD: 100-200	Italy	[261]
		n.a.	China	[248]
PCB180	n = 42, ado _e	LOD:0,012		Παρούσα Διατριβή με DFS MassSpec
		LOD:0,4		Παρούσα Διατριβή με SingleQuad
		LOD: 100-200	Italy	[261]

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Polychlorinated biphenyls	Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
Plasticizers	Πλαστικοποιητές
Surface coatings	Επικαλύψεις επιφανειών
Inks	Μελάνες
Adhesives	Κόλλες
Flame retardants	Επιβραδυντικά φλόγας
Pesticide extenders	Διαλυτικά φυτοφαρμάκων
Paints	Βαφές
Pesticide extenders	Διαλυτικά φυτοφαρμάκων
Microencapsulation of dyes	Μικροενθυλάκωση βαφών
Polychlorinated dibenzofurans	Πολυχλωριωμένα διβεζοφουράνια
Polychlorinated dibenzodioxins	Πολυχλωριωμένες διφαινυλοδιοξίνες
Silica gel	Γέλη πυριτίας
Bio-concentration factor	Συντελεστή βιοσυσσώρευσης
in-vitro	Πειράματα στο εργαστήριο
Non spatial discrimination reversal	Μη χωρικές αντιστροφές διάκρισης
in utero	Χρησιμοποιείται στην Βιολογία για να περιγράψει την κατάσταση του εμβρύου
World Health Organisation	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
Anagen	Ανάπτυξη
Catagen	Απόπτωσης
Telogen	Ανάπαυσης
Medulla	Μεδούλι
Cortex	Φλοιός
Cell membrane complex	Συμπλέγματα κυτταρικής μεμβράνης
Sulfur rich proteins	Πρωτεΐνες πλούσιες σε θείο

Classes	Κατηγορίες
Types	Τύποι
Head Space-Solid Phase Microextraction	Μικροεκχύλιση στερεής φάσης από την υπερκείμενη αέρια φάση
Gas chromatography	Αεριοχρωματογραφία
Gas chromatography mass spectrometry	Αεριοχρωματογραφία με ανιχνευτή φασματομετρία μάζας
Purge & trap	Εκδίωξη και παγίδευση
Finite difference method	Μέθοδος της πεπερασμένης διαφοράς
Electron Impact	Πρόσκρουση ηλεκτρονίων
Chemical Ionization	Χημικού ιοντισμού
Fast Atom Bombardment	Βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας
Matrix Assisted Desorption Ionization	Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας
Electrospray Ionization	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό
Quadrupole mass analyzer	Τετραπολικός αναλυτής μαζών
Resolution	Διακριτική ικανότητα
Electron multiplier	Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής
Discrete-dynode	Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών-δυνόδων
Full Scan	Πλήρους σάρωσης
Single Ion Monitoring	Επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων
Repeller	Απωθητής
Deflection	Εκτροπή
10% valley definition	Ορισμός της κοιλάδας 10%
forward geometry	Εμπρόσθια γεωμετρία
Relative Standard Deviation	Σχετική τυπική απόκλιση
Limit of detection	Όριο ανίχνευσης
Limit of Quantification	Όριο ποσοτικοποίησης
Agency for Toxic Substances and	Υπηρεσία Καταγραφής Τοξικών

Disease Registry	Ουσιών και Ασθενειών
Gas Chromatography double focusing high resolution mass spectrometry	Αεριοχρωματογραφία υψηλής διακριτικής ικανότητας (διπλής εστίασης) με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών
Split / splitless	Διαμοιρασμού/μη διαμοιρασμού
Hot needle technique	Τεχνική της βελόνας εν θερμώ
Low bleed	Χαμηλής γήρανσης
Signal to noise	Λόγος σήματος προς θόρυβο
Multiple ion detection	Λειτουργία πολλαπλής ανίχνευσης ιόντων
MID cycle time	Συνολικός χρόνος σάρωσης
Dwell time	Χρόνοι παραμονής
Standard deviation	Τυπική απόκλιση
Solid phase extraction	Εκχύλιση στερεής φάσης

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

PCBs	Polychlorinated biphenyls
PCDFs	Polychlorinated dibenzofurans
PCDDs	Polychlorinated dibenzodioxins
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane
DDD	Dichlordiphenyldichlorethan
DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene
ΗΠΑ	Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής
IQ	Intelligence quotient
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
GC/ECD	Gas Chromatography with Electron Capture Detector
BSF	Bio-concentration factor
IPCS	International Programme on Chemical Safety
EPA	Environmental Protection Agency
DLPCBs	Dioxin-like polychlorinated biphenyls(
NDL-PCB	No Dioxin-like polychlorinated biphenyls(
TEQ	Toxic equivalents
LD	Lethal dose
NOAEL	No observed adverse effect level
LOAEL	Lowest-observed-adverse-effect level
MDI	Multiple Developmental Impairment
TEF	Toxic Equivalency Factor
WHO	World Health Organisation
KIF	Keratin Intermediated Filaments
KAP	Keratin- associated proteins
HS	High sulfur
HS-SPME	Head Space-Solid Phase Microextraction
GC	Gas chromatography
GC/MS	Gas chromatography mass spectrometry
EI	Electron Impact
CI	Chemical Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
MALDI	Matrix Assisted Desorption Ionization
ESI	Electrospray Ionization

R	Resolution
FS	Full Scan
SIM	Single Ion Monitoring
RSD	Relative Standard Deviation
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of Quantification
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
GC-DFHRMS	Gas Chromatography double focusing high resolution mass spectrometry
MID	Multiple ion detection
SD	Standard deviation
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane
SPE	Solid phase extraction

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. J.T. Borlakoglu and K. D. Haegel, Comparative aspects on the bioaccumulation, metabolism and toxicity with PCBs *Camp. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, Vol. 100, No. 3, 1991, pp. 327-338.
2. H.-J. Lehmler and L.W. Robertson, Synthesis of hydroxylated PCB metabolites with the Suzuki-coupling, *Chemosphere*, Vol. 45, No 2, 2001, pp. 1119-1127.
3. E.E. McConnell, Comparative toxicity of PCBs and related compounds in various species of animals. *Environmental Health Perspectives*, Vol 60, 1985, pp. 29–33.
4. S. Tanabe, PCB problems in the future: Foresight from current knowledge, *Environmental Pollution*, Vol. 50, Nos 1–2, 1988, pp. 5–28.
5. K. Ballschmiter and M. Zell, Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography: Composition of technical Aroclor and Clophen. PCB mixtures. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, Vol. 302, No 1, 1980, pp. 20-31.
6. B. Afghan and A. Chau, *Analysis of trace organics in the aquatic environment*, Boca Raton, FL, CRC Press, 1989, pp. 33-68.
7. IPCS, Polychlorinated biphenyls and terphenyls, 2nd ed. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety, 1993, pp. 682 (Environmental Health Criteria 140).
8. ATSDR, Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs). Atlanta, GA, US Department of Health and Human Services, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2000, pp. 765 pp. + app.
9. US EPA (1980), Code of Federal Regulations. 40 CFR 707.60. Washington, DC, US Environmental Protection Agency.
10. N. Quinete, Th. Schettgen, J. Bertram and Th. Kraus, Analytical approaches for the determination of PCB metabolites in blood: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 406, No 25, pp. 6151-6164.

11. V. Burse, M. Korver, L. Needham, C. Lapeza, E. Boozer, S. Head, J. Liddle and D. Bayse, Gas chromatographic determination of polychlorinated biphenyls (as Aroclor 1254) in serum: Collaborative study, *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, Vol. 72, No 4, 1989, pp. 649-659.
12. C. Koopman-Esseboom, M. Huisman, N. Weisglas-Kuperus, C. Van der Paauw, L. Tuinstra, E. Boersma, and P. Sauer, PCB and dioxin levels in plasma and human milk of 418 Dutch women and their infants. Predictive value of PCB congener levels in maternal plasma for fetal and infant.s exposure to PCBs and dioxins, *Chemosphere*, Vol. 28, No 9, 1994, pp. 1721-1732.
13. M. Djordjevic, D. Hoffmann, J. Fan, B. Prokopczyk, M. Citron and S. Stellman, Assessment of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in adipose breast tissue using a supercritical fluid extraction method, *Carcinogenesis*, Vol. 15, No 5, 1994, pp. 2581-2585.
14. A.S. Andrade, D. Sacheto, R.B. Hoff and T.M. Pizzolato, Evaluation of lipid removal from animal fats for the determination of organochlorine, pesticides, and polychlorinated biphenyl indicators by gas chromatography with electron capture detector, *Journal of Separation Science*, Vol. 35, No 17, 2012, pp. 2233-2240.
15. M.N. Tzatzarakis, E.G. Barbounis, M.P. Kavvalakis, E. Vakonaki, E. Renieri, A.I. Vardavas and A.M. Tsatsakis, Rapid method for the simultaneous determination of DDTs and PCBs in hair of children by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HSSPME/GC-MS), *Drug testing and Analysis*, Vol. 6, No S1, 2014, pp. 85-92.
16. R. Fuoco, S. Giannarelli, M. Onor, A. Ceccarini and V. Carli, Optimized cleanup methods of organic extracts for the determination of organic pollutants in biological samples, *Microchemical Journal*, Vol. 79, Nos 1–2, 2005, pp. 69–76
17. P Wang, Q. Zhang, Y. Wang, Th. Wang, X. Li, L. Ding and G. Jiang, Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated

- biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples
Analytica Chimica Acta, Vol. 663, No 1, 2010, pp. 43–48.
18. US EPA (1988a) Drinking water criteria document for polychlorinated biphenyls (PCBs). Final. Cincinnati, OH, US Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office (ECAO-CIN-414).
 19. R. Thomas, *Volatilization from water*. In: Lyman W, Reehl W, Rosenblatt DH, eds. Handbook of chemical property estimation methods. New York, NY, McGraw-Hill Book Co., 1982, pp. 16.16
 20. D. Swackhamer and D. Armstrong, (1986) Estimation of the atmospheric and nonatmospheric contributions and losses of polychlorinated biphenyls for Lake Michigan on the basis of sediment records of remote lakes. *Environmental Science & Technology*, 1986, Vol. 20, No 9, pp. 879.883.
 21. M. McLachlan, D. Mackay and P. Jones, A conceptual model of organic chemical volatilization at waterfalls. *Environmental Science & Technology*, 1990, 24, No 2, pp. 252-257.
 22. Y.-J. Lin, H.-C. Liu, Z.-Y. Hseu and W.-J. Wu Study of transportation and distribution of PCBs using an ecologically simulated growth chamber, *Chemosphere*, Vol. 64, No 4, 2006, pp. 565–573.
 23. M. Lee, R. Griffin, M. Miller and E. Chian, Adsorption of water-soluble polychlorinated biphenyl Aroclor 1242 and used capacitor fluid by soil materials and coal chars, *Journal of Environmental Science and Health Part A-Environmental Science and Engineering & Toxic and Hazardous Substance Control*, Vol. 14, No 5, 1979, pp. 415-442.
 24. US EPA (1985a) Code of Federal Regulations. 40 CFR 302.4. Washington, DC, US Environmental Protection Agency.
 25. US EPA (1985b) Code of Federal Regulations. 40 CFR 797. Washington, DC, US Environmental Protection Agency.
 26. H.-G. Yeo, M. Choi, M.-Y. Chun and Y. Sunwoo, Concentration distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides and their relationship with temperature in rural air of Korea, *Atmospheric Environment*, Vol. 37, No 27, 2003, pp. 3831–3839.

27. J.-S. Park, T.L. Wade and S. Sweet, Atmospheric deposition of organochlorine contaminants to Galveston Bay, Texas, *Atmospheric Environment*, Vol. 35, No 19, 2001, pp. 3315-3324.
28. S. Eisenreich, B. Looney and J. Thornton, Airborne organic contaminants in the Great Lakes ecosystem, *Environmental Science & Technology*, Vol. 15, No 1, 1981, pp. 30-38.
29. D. Leister and J Baker (1994) Atmospheric deposition of organic contaminants to the Chesapeake Bay. *Atmospheric Environment*, Vol. 28, No 8, 1994, pp. 1499-1520.
30. S.M. Miller, M.L. Green, J.V. DePinto and K.C. Hornbuckle, Results from the Lake Michigan Mass Balance Study: Concentrations and Fluxes of Atmospheric Polychlorinated Biphenyls and trans-Nonachlor, *Environmental Science and Technology*, Vol. 35, No 2, 2001, pp 278–285.
31. K. Hart, J. Tremp, E. Molinar and W. Eawag, (1993) The occurrence and the fate of organic pollutants in the atmosphere. *Water, Air and Soil Pollution*, Vol. 68, Nos 1-2, 1993, pp. 91-112.*†
32. http://moodleres.unitec.ac.nz/mod/book/view.php?id=146464&chapterid=9410&lang=de_du (τελευταία επίσκεψη 01-03-2015).
33. Y. Zhang, B. Rott, and D. Freitag, Accumulation and elimination of 14C-PCBs by *Daphnia magna* strains 1820, *Chemosphere*, Vol. 12, Nos 11-12, 1983, pp. 1645-1651.
34. C Porte and J. Albaiges, Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 26, No 3, 1993, pp. 273-281.
35. G. Bremle, L. Okla and P. Larsson, Uptake of PCBs in fish in contaminated river system: Bioconcentration factors measured in the field, *Environmental Science & Technology*, Vol. 29, No 8, 1995, pp. 2010-2015.
36. R. Pruell, N. Rubinstein, B. Taplin, J. LiVolsi and R. Bowen, Accumulation of polychlorinated organic contaminants from sediment by three benthic marine species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 24, No 3, 1993, pp.:290-297.

37. S. Safe, S. Bandiera, T Sawyer, L. Robertson, L. Safe, A. Parkinson, P. Thomas, D. Ryan, L. Reik, W. Levin, M. Denomme and T. Fujita PCBs: structure/function relationships and mechanism of action. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 60, 1985, pp. 47-56.
38. J. Warner, J.R. Osuch, W. Karmaus, J.R. Landgraf, B. Taffe, Common classification schemes for PCB congeners and the gene expression of *CYP17*, *CYP19*, *ESR1* and *ESR2*. *Science of The Total Environment* Vol. 414, 2012, pp 81–89.
39. G. Su, X. Liu, Z. Gao, Q. Xian, J. Feng, X. Zhang, J.P. Giesy, S. Wei, H. Liu and Hongxia Yu, Dietary intake of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) from fish and meat by residents of Nanjing, China, *Environment International* Vol. 42, 2012, pp. 138–143
40. G. Ottonello, A. Ferrari and E. Magi. Determination of polychlorinated biphenyls in fish: Optimisation and validation of a method based on accelerated solvent extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Food Chemistry* Vol. 142, 2014, pp. 327–333.
41. C. Secor, E. Mills, J. Harshbarger, H. Kuntz, W. Gutenmann and D. Lisk, Bioaccumulation of toxicants, element and nutrient composition, and soft tissue histology of zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from New York State waters, *Chemosphere*, Vol. 26, No 8, 1993, pp. 1559-1575.
42. G. Salata, T. Wade, J. Sericano, J. Davis and J. Brooks (1995) Analysis of Gulf of Mexico bottlenose dolphins for organochlorine pesticides and PCBs. *Environmental Pollution*, Vol. 88, No2, 1995, pp. 167-175.
43. C. Travis and A. Arms, Bioconcentration of organics in beef, milk and vegetation, *Environmental Science & Technology*, 22, No 3, 1988, pp. 271-274.
44. H. Geyer, I. Scheunert and F. Korte, Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 6, No 4, 1986, pp. 313-347.
45. C. Hebert, D. Weseloh, L. Kot and V. Glooschenko, Organochlorine contaminants in a terrestrial foodweb on the Niagara Peninsula,

- Ontario, Canada 1987.89. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 26, No 3, 1994, 356-366.
46. S. Winter and B. Streit, Organochlorine compounds in a three-step terrestrial food chain, *Chemosphere*, Vol. 24, No 12, 1992, pp. 1765-1774.
47. M. Callahan, M. Slimak, N. Gabel, I. May C. Fowler, J. Freed, P. Jennings, R. Durfee, F. Whitmore, B. Maestri, W. Mabey, B. Holt and C. Gould, Water-related environmental fate of 129 priority pollutants. Vol. I. Washington, DC, *US Environmental Protection Agency* 1979, (EPA 440/4-79-029a).
48. A. Leifer, R. Brink, G. Thom and K. Partymiller, Environmental transport and transformation of polychlorinated biphenyls. Washington, DC, *US Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances*, 1983 (NTIS PB84-142579; EPA-560/5-83-025).
49. US EPA (1984) method 624 Fed. Regist. 49:141.
50. A. Kubatova, M. Matucha, P. Erbanova, C. Novotny, V. Vlasakova, and V. Sasek, Investigation into PCB biodegradation using uniformly ¹⁴C-labelled dichlorobiphenyl, *Isotopes in Environmental and Health Studies*, Vol. 34, No 4, 1998, pp. 325-334.
51. J. Quensen, M. Mousa, S. Boyd, J. Sanderson, K. Froese and J. Giesy, Reduction of aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of polychlorinated biphenyl mixtures due to anaerobic microbial dechlorination, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 17, No 5, pp 806-813.
52. M. Biterna, and D. Voutsas, Polychlorinated biphenyls in ambient air of NW Greece and in particulate emissions, *Environment International*, Vol. 31, No 5, 2005, pp. 671-677
53. S. Batterman, S. Chernyak, Y. Gouden, J. Hayes, T. Robins and S. Chetty, PCBs in air, soil and milk in industrialized and urban areas of KwaZulu-Natal, South Africa, *Environmental Pollution*, Vol. 157, No 2, 2009, pp. 654-663.
54. H. A. Alegria, F. Wong, L.M. Jantunen, T.F. Bidleman, M. S. Figueroa, G.G. Bouchot, V.C. Moreno, S.M. Waliszewski and R. Infanzon, Organochlorine pesticides and PCBs in air of southern Mexico (2002-

- 2004), *Atmospheric Environment*, Vol. 42, No 38, 2008, pp. 8810–8818.
55. A. Colombo, E. Benfenati, S.G. Bugatti, M. Lodi, A. Mariani, L. Musmeci, G. Rotella, V. Senese, G. Ziemacki and R. Fanelli, PCDD/Fs and PCBs in ambient air in a highly industrialized city in Northern Italy, *Chemosphere*, Vol. 90, No 9, 2013, pp. 2352–2357
56. K. MacLeod, Polychlorinated biphenyls in indoor air. *Environmental Science & Technology*, Vol. 15, No 8, 1981, pp. 926-928.
57. D.L MacIntosh, T. Minegishi, M.A Fragala, J.G Allen, K.M Coghlan, J.H Stewart and John F McCarthy, Mitigation of building-related polychlorinated biphenyls in indoor air of a school MacIntosh et al., *Environmental Health*, Vol 11, No, 24, 2012, pp 1-10.
58. C.J. Bryant, R.W. Hartle, M.S. Crandall, P. Roper, Polychlorinated biphenyl, polychlorinated dibenzo-p-dioxin, and polychlorinated dibenzofuran contamination in PCB disposal facilities, *Chemosphere*, Vol. 18, Nos 1-6. 1989, pp. :569-576.
59. European Food Safety Authority (EFSA) SCIENTIFIC REPORT OF EFSA Update of the monitoring of levels of dioxins and PCBs in food and feed *EFSA Journal* Vol. 10, No 7, 2012, pp. :2832.
60. K. Kreiss (1985) Studies on populations exposed to polychlorinated biphenyls. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 60, 1986, pp. 193-199.
61. H. Humphrey and M. Budd, Michigan's fisher cohort: A prospective history of exposure. *Toxicology and Industrial Health*, Vol. 12, Nos 3-4, 1996, pp. 499-505.
62. F. Kutz, P. Wood and D. Bottimore, Residues in human adipose tissue, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 120, 1991, pp. 61-81.
63. I. Kraul and O. Karlog, Persistent organochlorinated compounds in human organs collected in Denmark: 1972-73, *Acta Pharmacologica Toxicologica*, Vol. 38, No 1, 1976, pp. 38-48.
64. E. DeKoning and W. Karmaus, PCB exposure in utero and via breast milk: A review. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, Vol. 10, No 3, 2000, pp. 285-293.

65. R. Letcher, E. Klasson-Wehler and A Bergman (2000) Methyl sulfone and hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls. In: Paasivirta J, ed. The handbook of environmental chemistry. Vol. 3. Part K. New types of persistent halogenated compounds. Berlin, Springer-Verlag.
66. R. Lutz and R Dedrick (1987) Physiologic pharmacokinetic modeling of polychlorinated biphenyls. In: Safe S, ed. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and environmental toxicology. Berlin, Springer-Verlag, pp. 111-131.
67. L. Hansen (1987) Environmental toxicology of polychlorinated biphenyls. In: Safe S, ed. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and environmental toxicology. Berlin, Springer-Verlag, pp. 15-48.
68. T. Yakushiji, I. Watanabe, K. Kuwabara, R. Tanaka, T. Kashimoto, N. Kunita and I. Hara, Postnatal transfer of PCBs from exposed mothers to their babies: influence of breast-feeding. *Archives of Environmental Health*, Vol. 39, No 6, 1984, pp. 368-375.
69. R. Kimbrough, R. Linder and T. Gaines, Morphological changes in livers of rats fed polychlorinated biphenyls. *Archives of Environmental Health*, Vol. 25, No 5, 1972, pp. 354-364.
70. J. Bruckner K. Khanna and H. Cornish, Biological responses of the rat to polychlorinated biphenyls, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol 24, No 3, 1973, pp. 434-448.
71. L. Fishbein, Toxicity of chlorinated biphenyls. *Annual Review of Pharmacology*, Vol. 14, 1974, pp. 139-156.
72. D. Grant and W. Phillips (1974) The effect of age and sex on the toxicity of Aroclor 1254, a polychlorinated biphenyl, in the rat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 12, No 4, 1974, pp. 145-152.
73. R. Linder, T. Gaines and R. Kimbrough, The effect of polychlorinated biphenyls on rat reproduction. *Food and Cosmetics Toxicology*, Vol. 12, No 1, 1974, pp. 63-77.
74. R. Aulerich and P. Ringer (1977) Current status of PCB toxicity to mink and effects on their reproduction, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 6, No 1, 1977, pp. 279-292.

75. L. Garthoff, F. Cerra, and E. Marks, Blood chemistry alteration in rats after single and multiple gavage administration of polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 60, No 1, 1981, pp. 33-44.
76. R. Seegal, K. Brosch and B Bush, Regional alterations in serotonin metabolism induced by oral exposure of rats to polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology*, Vol. 7, No 1, 1986, pp. 155-166.
77. S. Puhvel, M. Sakamoto, D. Ertl and R. Reisner, Hairless mice as models for chloracne: A study of cutaneous changes induced by topical application of established chloracnogens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 64, 1982, pp. 492-503.
78. S. Price, S. Ozalp and R Weaver, Thyroid hyperactivity caused by hypolipodaemic compounds and polychlorinated biphenyls, *Archives of Toxicology*, Supplement Vol. 12, 1988, pp. 85-92.
79. B. Mayes, E. McConnell, B. Neal, M. Brunner, S. Hamilton, T. Sullivan, A. Peters, M. Ryan, J. Toft, A.W. Singer, J. Brown R. Menton, J. Moore, Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260, *Toxicological Sciences*, Vol. 41, No 1, 1998, pp. 62-76.
80. M. Brunner, T. Sullivan, A. Singer, M. Ryan, J. Toft II, R. Menton, S. Graves and A. Peters, 1996, Assessment of the chronic toxicity and oncogenicity of Aroclor-1016, Aroclor 1242, Aroclor-1254, and Aroclor-1260 administered in diet to rats. Columbus, OH, Battelle (Battelle Study No. Sc920192).
81. NCI (1978) Bioassay of Aroclor 1254 for possible carcinogenicity. Bethesda, MD, National Cancer Institute (NCI-GC-TR-38; NTIS PB279624).
82. E. Schaeffer, H. Grein and W. Goessner, Pathology of chronic polychlorinated biphenyl (PCB) feeding in rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 75, No 2, 1984, pp. 278-288.
83. D. Norback and R. Weltman, Polychlorinated biphenyl induction of hepatocellular carcinoma in the Sprague-Dawley rat. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 60, 1985, pp. 97-105.

84. C. Rao and S. Banerji, Induction of liver tumors in male Wistar rats by feeding polychlorinated biphenyls (Aroclor 1260). *Cancer Letters*, Vol. 39, No 1, 1988, pp. 59-67.
85. L. Beebe, Y. Kim, S. Amin, C. Riggs, R. Kovatch and L. Anderson, Comparison of transplacental and neonatal initiation of mouse lung and liver tumors by N nitrosodimethylamine (NDMA) and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and promotability by a polychlorinated biphenyls mixture (Aroclor 1254), *Carcinogenesis*, Vol. 14, No 8, 1993, pp. 1545-1548.
86. M. Hattula, Mutagenicity of PCBs and their pyrosynthetic derivatives in cell-mediated assay, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 60, 1985, pp. 255-257.
87. S. Sandal, B. Yilmaz and D.O. Carpenter, Genotoxic effects of PCB 52 and PCB 77 on cultured human peripheral lymphocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Vol. 654, No 1, 2008, pp. 88–92
88. L. Marabini, R. Calò and S. Fucile Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2) *Toxicology in Vitro*, Vol. 25, No 5, 2011, pp. 1045–1052.
89. S. Green, J. Carr, K. Palmer and E Oswald, Lack of cytogenetic effects in bone marrow and spermatogonial cells in rats treated with polychlorinated biphenyls (Aroclors 1242 and 1254), *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 13, 1975, pp. 14-22.
90. J. Whysner, F. Montandon, R. McClain, J. Downing, L. Verna, R. Steward and G. Williams, Absence of DNA adduct formation by phenobarbital, polychlorinated biphenyls, and chlordane in mouse liver using the ³²P-postlabeling assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 148, 1998, pp. 14-23.
91. K. Belpaeme, K. Delbeke, L. Zhu and M. Kirsch-Volders, PCBs do not induce DNA breakage in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis*, Vol. 11, No 4, 1996, pp. 383-389.
92. M. Dubois, A. Pfohl-Leskowicz, Y. Grosse and P. Kremers DNA adducts and P450 induction in human, rat and avian liver cells after

- exposure to polychlorobiphenyls, *Mutation Research*, Vol. 345, Nos 3-4, 1995, 181-190.
93. D. Arnold, F. Bryce and P. McGuire (1995) Toxicological consequences of Aroclor 1254 ingestion by female rhesus monkeys. Part 2. Reproduction and infant findings, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 33, No 6, 1995, pp. 457-474.
94. P. Cooke, Y. Zhao and L. Hansen, Neonatal polychlorinated treatment increases adult testis size and sperm production in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 136, No 1, 1996, pp. 112-117.
95. J. Hany, H. Lilienthal, A. Roth-Harer, G. Ostendorp, B. Heinzow and G. Winneke, Behavioral effects following single and combined maternal exposure to PCB 77 (3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl) and PCB 47 (2,4,2',4'-tetrachlorobiphenyl) in rats, *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 21, No2, 1999, pp. 147-156.
96. H. Jansen, P. Cooke, J. Porcelli, T. Liu and L Hansen, Estrogenic and antiestrogenic actions of PCBs in the female rat: in vitro and in vivo studies, *Reproductive Toxicology*, Vol. 7, No 3, 1993, pp. 237-248.
97. K. Nesaretnam, D. Corcoran, R. Dils and P. Darbre, 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo, *Molecular Endocrinology*, Vol. 10, No 8, 1996, pp. 923-936.
98. S. Kholkute, J. Rodriguez and W. Dukelow, Effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) on in vitro fertilization in the mouse, *Reproductive Toxicology*, Vol. 8, No. 1, 1994, pp. 69-73.
99. E. Levin, S. Schantz, and R. Bowman, Delayed spatial alternation deficits resulting from perinatal PCB exposure in monkeys, *Archives of Toxicology*, Vol. 62, No 4, 1988, pp. 267-273.
100. S. Schantz, E. Levin and R. Bowman Long-term neurobehavioral effects of perinatal polychlorinated biphenyl (PCB) exposure in monkeys, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 10, No 6, 1991, pp. 747-756.
101. S. Schantz, B. Seo, J. Moshtagian, R. Peterson and R. Moore, Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning, *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 18, No 3, 1996, pp. 305-313.

102. G. Pantaleoni, D. Fanini, A. Sponta, G. Palumbo, R. Giorgi and P Adams, Effects of maternal exposure to polychlorobiphenyls (PCBs) on F1 generation behavior in the rat, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 11, No 1, 1988, pp. 440-449.
103. D. Rice and S. Hayward, Effects of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on nonspatial discrimination reversal and delayed alternation performance, *Neurotoxicology*, Vol. 18, No 2, 1997, pp. 479-494.
104. D. Rice, Effect of postnatal exposure to a PCB mixture in monkeys on multiple fixed interval.fixed ratio performance, *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 19, No 6, 1997, pp. 429-434.
105. P. Eriksson and A. Fredriksson, Neurotoxic effects in adult mice neonatally exposed to 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl or 2,3,3',4,4'-pentachlorobiphenyl. Changes in brain nicotinic receptors and behaviour, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Vol. 5, No 1, 1998, pp. 17-27.
106. D. Davis and S. Safe, Dose response immunotoxicities of commercial polychlorinated biphenyls (PCBs) and their interaction with 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin, *Toxicology Letters*, Vol. 48, No 1, 1989, pp. 35-43.
107. F. Fonnum and E. Mariussen, Mechanisms involved in the neurotoxic effects of environmental toxicants such as polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants, *Journal of Neurochemistry*, Vol 111, No 6, 2009, pp. 1327-1347.
108. J. Allen and D. Barsotti, The effects of transplacental and mammary movement of PCBs on infant rhesus monkeys, *Toxicology*, Vol. 6, No 3, 1976, pp. 331-340.
109. J. Truelove, D. Grant, J. Mes, H. Tryphonas, L. Tryphonas and Z. Zawidzka, Polychlorinated biphenyl toxicity in the pregnant cynomolgus monkey: A pilot study, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 11, No 5, 1982, pp. 583-588.
110. H. Tryphonas, S. Hayward, L. O'Grady, J. Loo, D. Arnold, F. Bryce and Z. Zawidzka (1989) Immunotoxicity studies of PCB (Aroclor 1254) in the adult rhesus (*Macaca mulatta*) monkey. preliminary

- report, *International Journal of Immunopharmacology*, Vol. 11, No 2, 1989, pp. 199-206.
111. H. Tryphonas, M. Luster, G. Schiffman, L. Dawson, M. Hodgen, D. Germolec, S. Hayward, F. Bryce, J. Loo, F. Mandy and D. Arnold, Effect of chronic exposure of PCB (Aroclor 1254) on specific and nonspecific immune parameters in the rhesus (*Macaca mulatta*) monkey, *Fundamental and Applied Toxicology*, Vol. 16, No 4, 1991, pp. 773-786.
112. E.G. Sørmo, H. Jørgen, S. Larsen, G.M. Johansen, J.U. Skaare and B.M.Jenssen, Immunotoxicity of Polychlorinated Biphenyls (PCB) in Free-Ranging Gray Seal Pups with Special Emphasis on Dioxin-Like Congeners, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, Vol. 72, Nos 3-4, 2009, pp. 266–276.
113. S. Safe, Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs), *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 2, No 1, 1990, pp. 51-88.
114. S. Safe, Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment, *Critical Reviews in Toxicology*, Vol. 24, No 2, 1994, pp. 87-149.
115. L. Loose, K. Pittman, K. Benitz, J. Silkworth, W. Mueller and F. Coulston, Environmental chemical induced immune dysfunction, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 2, No 2, 1978, pp. 173-198.
116. V. Krishnan and S Safe, Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure.activity relationships, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 120, No 1, 1993, pp. 55-61.
117. R. Seegal, B. Bush and K. Brosch, Comparison of effects of Aroclors 1016 and 1260 on non-human primate catecholamine function, *Toxicology*, Vol. 66, No 2, 1991, pp. 145-163.

118. S. Schantz, B. Seo, P. Wong and I Pessah, Long-term effects of developmental exposure to 2,2',3,5',6-pentachlorobiphenyl (PCB95) on locomotor activity, spatial learning and memory, and brain ryanodine binding, *Neurotoxicology*, Vol. 18, No 2, 1997, pp. 457-467.
119. M. Hayes, Carcinogenic and mutagenic effects of PCBs. In: Safe S, ed. Polychlorinated biphenyls (PCBs): Mammalian and environmental toxicology. Berlin, Springer-Verlag, 1987, pp. 77-95.
120. S. Safe, Polyhalogenated aromatics: Uptake, disposition and metabolism. In: Kimbrough R, Jensen S, eds. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products, 2nd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1989, pp. 131-159.
121. A. Buchmann, S. Ziegler, A. Wolf, L. Robertson, S. Durham and M. Schwartz, Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: Correlation between primary subcellular effects and promoting activity, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 111, No 3, 1991, pp. 454-468.
122. R. Laib, J. Rose and H. Brunn, Hepatocarcinogenicity of PCB congeners. I. Initiation and promotion of enzyme-altered rat liver foci by 2,2',4,5'-tetra- and 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl, *Toxicological and Environmental Chemistry*, Vol. 34, No 1, 1991, pp. 19-22.
123. E. Luebeck, S. Moolgavkar, A. Buchmann and M. Schwarz Effects of polychlorinated biphenyls in rat liver: Quantitative analysis of enzyme-altered foci, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 111, No 3, 1991, pp. 469-484.
124. L. Sargent, G. Sattler, B. Roloff, Y. Xu, C. Sattler, L. Meisner and H. Pitot, Ploidy and specific karyotypic changes during promotion with phenobarbital, 2,5,2',5' tetrachlorobiphenyl, and/or 3,4,3',4-tetrachlorobiphenyl in rat liver, *Cancer Research*, Vol. 52, No 4, 1992, pp. 955-962.
125. L. De Haan, J. Simons, A. Bos, J. Aarts, M. Denison and A. Brouwer, Inhibition of intercellular communication by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and dioxin-like PCBs in mouse hepatoma cells (Hepa1c1c7): involvement of the Ah receptor. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 129, No 2, 1994, pp. 283-293.

126. V. Krutovskikh, M. Mesnil, G. Mazzoleni and H. Yamasaki
Inhibition of rat liver gap junction intercellular communication by tumor-promoting agents in vivo. Association with aberrant localization of connexin proteins, *Laboratory Investigation*, Vol. 72: No 5. 1995, pp. 571-577.
127. T. Sinks, G. Steele, A. Smith, K. Watkins and R. Shults, Mortality among workers exposed to polychlorinated biphenyls, *American Journal of Epidemiology*, Vol. 136, No 4, 1992, pp. 389-398.
128. S. Greenland, A. Salvan, D. Wegman, M. Hallock, and T. Smith, A case control study of cancer mortality at a transformer-assembly facility, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, Vol. 66, No 1, 1994, pp. 49-54.
129. R. Kimbrough, M. Doemland and M. LeVois, Mortality in male and female capacitor workers exposed to polychlorinated biphenyls, *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, Vol. 41, No 3, 1999, pp. 161-171.
130. D. Brown and M. Jones, Mortality and industrial hygiene study of workers exposed to polychlorinated biphenyls, *Archives of Environmental Health*, Vol. 36, No 3, 1981, pp. 120-129.
131. D. Brown, Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls, *Archives of Environmental Health*, Vol. 42, No 6, 1987, pp. 333-339.
132. M. Kuratsune, Y. Nakamura, M. Ikeda and T. Hirohata, Analysis of deaths seen among patients with Yusho. A preliminary report, *Chemosphere*, Vol. 16, Nos 8-9. 1987, pp. 2085-2088.
133. S. Hsieh, Y. Yen, S. Lan, C. Hsieh, C. Lee and Y. Ko, A cohort study on mortality and exposure to polychlorinated biphenyls. *Archives of Environmental Health*, Vol. 51, No 6, 1996, pp. 417-424.
134. B.A Cohn, M.B. Terry, M. Plumb and P.M. Cirillo, Exposure to polychlorinated biphenyl (PCB) congeners measured shortly after giving birth and subsequent risk of maternal breast cancer before age 50, *Breast Cancer Research Treatment*, Vol. 136, No 1, 2012, pp 267-275.
135. E.V. Bräuner, S. Loft, A. Wellejus, H. Autrup, A. Tjønnelan and O. Raaschou-Nielsen, Adipose tissue PCB levels and CYP1B1 and

- COMT genotypes in relation to breast cancer risk in postmenopausal Danish women, *International Journal of Environmental Health Research*, Vol. 24, No. 3, 2014, pp. 256–268,
136. G. Melino, P. Vernole, M. Antinori, B. Nicoletti, C. Concato and A. Finazzi-Agro, Immunological and cytogenetic damage in workers accidentally exposed to polychlorinated biphenyls (PCB), *Clinical Chemistry and Enzymology Communications*, Vol. 4, No 5, 1992, pp. 341-353.
137. I. Kalina, R. Sram, H. Konecna and A. Ondrussekova, Cytogenetic analysis of peripheral blood lymphocytes in workers occupationally exposed to polychlorinated biphenyls, *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, Vol. 11, No 2, 1991, pp. 77-82.
138. E. Emmett, M. Maroni, J. Schmith, B. Levin and J. Jefferys, Studies of transformer repair workers exposed to PCBs: I. Study design, PCB concentrations, questionnaire, and clinical examination results, *American Journal of Industrial Medicine*, Vol. 13, No 4, 1988, pp. 415-427.
139. E. Emmett, M. Maroni, J. Schmith, B. Levin and J. Jefferys, Studies of transformer repair workers exposed to PCBs: II. Results of clinical laboratory investigations, *American Journal of Industrial Medicine*, Vol. 14, No1, 1988, pp. 47-62.
140. B. Bush, A. Bennett and J. Snow, Polychlorobiphenyl congeners, p,p-DDE, and sperm function in humans, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 15, No 4, 1986, pp. 333-341.
141. A. Pines, S. Cucos, P. Ever-Hadani and M. Ron, Some organochlorine insecticide and polychlorinated biphenyl blood residues in infertile males in the general Israeli population of the middle 1980.s, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 16, No 5, 1987, pp. 587-597.
142. J. Jacobson and S. Jacobson, Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero, *New England Journal of Medicine*, Vol. 335, 1996, pp. 783-789.

143. S. Jacobson, G. Fein, J. Jacobson, P.M. Schwartz and J. Dowler, The effect of intrauterine PCB exposure on visual recognition memory, *Child Development*, Vol. 56, No 4, 1985, pp. 853-860.
144. J. Jacobson, S. Jacobson, P. Schwartz, G. Fein and J. Dowler, Prenatal exposure to an environmental toxin: A test of the multiple effects model, *Developmental Psychobiology*, Vol. 20, No 4, 1984, pp. 523-532.
145. J. Jacobson, S. Jacobson and H. Humphrey, Effects of exposure to PCBs and related compounds on growth and activity in children. *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 12, 1990, pp. 319-326.
146. J. Jacobson, S. Jacobson and H. Humphrey, Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children, *Journal of Pediatrics*, Vol. 116, No 1, 1990, pp. 38-45.
147. G. Winneke, A. Bucholski, B. Heinzow, U. Krämer, E. Schmidt, J. Walkowiak, J. Wiener and H. Steingrüber, Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): cognitive and psychomotor functions in 7-month-old children, *Toxicology Letters*, Vol. 102-103, 1998, pp. 423-428.
148. P. Stewart, J. Reihman, E. Lonky, T. Darvill and J Pagano, Prenatal PCB exposure and Neonatal Behavioral Assessment Scale (NBAS) performance. *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 22, No 1, 2000, pp. 21-29.
149. B. Svensson, T. Hallberg, A. Nilsson, A. Schutz and L Hagmar, Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds, *International Archives of Occupational and Environmental Health*, Vol. 65, No 6, 1994, pp. 351-358.
150. D. Mergler, S. Belanger, F. Larribe, M. Panisset, R. Bowler, M. Baldwin, J. Lebel and K Hudnell, Preliminary evidence of neurotoxicity associated with eating fish from the Upper St. Lawrence River lakes, *Neurotoxicology*, Vol. 19, Nos 4-5, 1998, pp. 691-702.
151. U. Ahlborg, G. Becking, L. Birnbaum, A. Brouwer, H. Derks, M. Feeley, G. Golor, A. Hanberg, J. Larsen, A. Liem, S. Safe, C. Schlatter, F. Waern, M. Younes, and E. Yrjänheikki, Toxic equivalency

- factors for dioxin-like PCBs, *Chemosphere*, Vol. 28, No 6, 1994, pp. 1049-1067.
152. H. Tilson, J. Jacobson, and W. Rogan, Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system cross-species comparisons, *Neurotoxicology and Teratology*, Vol. 12: No 3, 1990, pp. 239-248.
153. G. Perelló, J. Gómez-Catalán, V. Castell, J.M. Llobet and J.L. Domingo, Assessment of the temporal trend of the dietary exposure to PCDD/Fs and PCBs in Catalonia, over Spain. Health risks, *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 50, No 2, 2012, pp. 399–408
154. L.W. Robertson and G. Ludewig, Polychlorinated Biphenyl (PCB) carcinogenicity with special emphasis on airborne PCBs, *Gefahrst Reinhalt Luft.*, Vol. 71, Nos 1-2, 2011, pp. 25–32.
155. J.M. Llobet, A .Bocio and J.L Domingo, A. Teixidó, C. Casas, and L. Müller, Levels of polychlorinated biphenyls in foods from Catalonia, Spain: estimated dietary intake, *Journal of Food Protection*, Vol. 66, No 3, 2003, pp. 479–484.
156. J.M. Llobet, R. Martí-Cid, V. Castell, and J.L. Domingo, Significant decreasing trend in human dietary exposure to PCDD/PCDFs and PCBs in Catalonia, Spain, *Toxicology Letters*, Vol. 178, No 2, 2008, pp. 117–126.
157. R. Lavker, T. Sun, H. Oshima, Y. Barrandon, M. Akiyama, C. Ferraris, G. Chevalier, B. Favier, C. Jahoda, and D. Dhouailly, Hair follicle stem cells, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, Vol. 8, 2003, pp. 28-38.
158. S. Millar, Molecular mechanisms regulating hair follicle development, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 118, 2002, pp. 216-225.
159. S. Muller-Rover, B. Handjiski, C. van der Veen, S. Eichmuller, K. Foitzik, I. McKay, K. Stenn and R. Paus, A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 117, 2001, pp. 3-15.
160. R. Schmidt-Ullrich and R Paus, Molecular principles of hair follicle induction and morphogenesis, *BioEssays*, Vol. 27, No 3, 2005, pp. 247-261.

161. C. Jahoda, K. Horne, and R. Oliver, Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells, *Nature*, Vol. 311, 1985, pp. 560-562.
162. J. Kishimoto, R. Burgeson and B. Morgan, Wnt signaling maintains the hair inducing activity of the dermal papilla, *Genes and Development*, Vol. 14, 2000, pp. 1181-1185.
163. T. Andl, K. Ahn, A. Kairo, E. Chu, L. Wine-Lee, S. Reddy, N. Croft, J. Cebra-Thomas D. Metzger, and P. Chambon, Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development, *Development*, Vol. 131, 2004, pp. 2257-2268.
164. K. Foitzik, G. Lindner, S. Mueller-Roever, M. Maurer, N. Botchkareva, V. Botchkarev, B. Handjiski, M. Metz, T. Hibino and T. Soma, Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF-beta1 in vivo, *The FASEB Journal*, Vol. 14, No 5, 2000, pp. 752-760.
165. L. Hansen, N. Alexander, M. Hogan, J. Sundberg, A. Dlugosz, D. Threadgill, T. Magnuson and S. Yuspa, Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development, *The American Journal of Pathology*, Vol. 150, No 6, 1997, pp. 1959-1975.
166. J. Hebert, T. Rosenquist, J. Gotz and G. Martin, FGF5 as a regulator of the hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations, *Cell*, Vol. 78, No 6, 1994, pp. 1017-1025.
167. L. Alonso, H. Okada, H. Pasolli, A. Wakeham, A. You-Ten, T. Mak and E. Fuchs, Sgk3 links growth factor signaling to maintenance of progenitor cells in the hair follicle, *The Journal of Cell Biology*, Vol. 170, No 4, 2005, pp. 559-570.
168. L. Ma, J. Liu, T. Wu, M. Plikus, T. Jiang, Q. Bi, Y. Liu, S. Muller-Rover, H. Peters and J. Sundberg, Cyclic alopecia in Msx2 mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation, *Development*, Vol. 130, 2003, pp. 379-389.
169. G. Lindner, V. Botchkarev, N. Botchkareva, G. Ling, C. van der Veen and R. Paus, Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen), *The American Journal of Pathology*, Vol. 151, No 6, 1997, pp. 1601-1617.

170. H. Oshima, A. Rochat, C. Kedzia, K. Kobayashi and Y. Barrandon, Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells, *Cell*, Vol. 104, No 2, 2001, pp. 233-245.
171. G. Taylor, M. Lehrer, P. Jensen, T. Sun and R Lavker, Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis, *Cell*, Vol. 102, No 4, 2000, pp. 451-461.
172. C. Blanpain, W. Lowry, A. Geoghegan, L. Polak, and E. Fuchs, Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche, *Cell*, Vol. 118, No 5, 2004, pp. 635-648.
173. T. Tumber, G. Guasch, V. Greco, C. Blanpain, W. Lowry, M. Rendl and E. Fuchs, Defining the epithelial stem cell niche in skin, *Science*, Vol. 303, No 5656, 2004, pp. 359-363.
174. U. Gat, R. DasGupta, L. Degenstein and E Fuchs, De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin, *Cell*, Vol. 95, No 5, 1998, pp. 605-614.
175. J. Huelsken, R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis and W. Birchmeier, beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin, *Cell*, Vol. 105, No 4, 2001, pp. 533-545.
176. C. Lo Celso, D. Prowse and F. Watt, Transient activation of beta-catenin signalling in adult mouse epidermis is sufficient to induce new hair follicles but continuous activation is required to maintain hair follicle tumours, *Development*, Vol. 131, 2004, pp. 1787-1799.
177. W. Lowry, C. Blanpain, J. Nowak, G. Guasch, L. Lewis and E. Fuchs, Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells, *Genes and Development*, Vol. 19, 2005, pp. 1596-1611.
178. D. Van Mater, F. Kolligs, A. Dlugosz and E Fearon, Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. *Genes and Development*, Vol. 17, 2003, pp. 1219-1224.
179. C. Callahan, T. Ofstad, L. Horng, J. Wang, H. Zhen, P. Coulombe and A. Oro (2004) MIM/BEG4, a Sonic hedgehog-responsive gene that potentiates Gli-dependent transcription, *Genes and Development*, Vol. 18, 2004, pp. 2724-2729.

180. P. Mill, R. Mo, H. Fu, M. Grachtchouk, P. Kim, A. Dlugosz and C. Hui (2003) Sonic hedgehog-dependent activation of Gli2 is essential for embryonic hair follicle development, *Genes and Development*, Vol. 17, 2003, pp. 282-294.
181. B. St-Jacques, H. Dassule, I. Karavanova, V. Botchkarev, J. Li, P. Danielian, J. McMahon, P. Lewis, R. Paus and A. McMahon, Sonic hedgehog signaling is essential for hair development, *Current Biology*, Vol. 8, No 19, 1998, pp. 1058-1068.
182. V. Botchkarev, N. Botchkareva, W. Roth, M. Nakamura, L. Chen, W. Herzog, G. Lindner, J. ,McMahon, C. Peters and R. Lauster (1999) Noggin is a mesenchymally derived stimulator of hairfollicle induction, *Nature Cell Biology*, Vol. 1, 1999, pp. 58-164.
183. H. Kulesa, G. Turk and B. Hogan, Inhibition of Bmp signaling affects growth and differentiation in the anagen hair follicle, *The EMBO Journal*, Vol 19, No 24, 2000, pp. 6664-6674.
184. B.M Appenzeller, and A.M. Tsatsakis, Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: State of the art, critical review and future needs, *Toxicology Letters*, Vol. 210, No 2, 2012, pp. 119–140
185. C.R. Robbins, *Chemical and physical behavior of human hair*. Fourth edition. New York: Springer Verlag; 2002.
186. C.E. Orfanos and R.Happle. *Hair and hair diseases*. Heidelberg, Germany: Springer-Verlag; 1990.
187. P. Jolles, H. Jahn and H. Höcker, *Formation and structure of human hair*. Boston, Berlin Basel: Birkhäuser Verlag; 1997.
188. R.R. Ogle Jr, and M.J. Fox, *Atlas of human hair—microscopic characteristics*. Boca Raton, London: CRC Press; 1999.
189. L.C. Sperling, *An atlas of hair pathology with clinical correlations*. New York: Parthenon publishing group; 2003.
190. J. Powell, N. Stone and R.R. Dawber, *An atlas of hair and scalp diseases*. New York, London: Panthenon publishing group; 2002.
191. <http://waukesha.uwc.edu/lib/reserves/pdf/zillgitt/zoo170/> (τελευταία επίσκεψη 10-02-2015).

192. G.E. Rogers, Newer findings on the enzymes and proteins of hair follicles, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 83, pp. 408–428, 1959.
193. G.E. Rogers, *Structural and biochemical features of the hair follicle*, in: *The Epidermis*, edited by W.Montagna and W.Lobitz. New York: Academic Press, pp. 179–236, 1964.
194. L. Auber, The anatomy of follicles producing wool fibres, with special reference to keratinization, *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, Vol. 62, No 1, pp.191–254, 1952.
195. L.A. Hausman, Structural characteristics of the hair of mammals, *The American Naturalist*, Vol. 54, No 635, pp. 496–526, 1920.
196. A.B. Wildman, *The Microscopy of Animal Textile Fibres*, Leeds: Wool Industries Research Association, pp. 49–53, 1954.
197. R.D.B. Fraser, T.P. Macrae and G.E.Rogers, *Keratins. Their Composition, Structure and Biosynthesis*, Springfield, IL: Charles C.Thomas, 1972.
198. R.C. Marshall, Characterization of the proteins of human hair and nail by electrophoresis, *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 80, pp. 519–524, 1983.
199. J.M. Gillespie, *The structural proteins of hair: isolation, characterization and regulation of biosynthesis*, In: *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*, Second edition, Volume I, edited by L.A.Goldsmith, New York and Oxford: Oxford University Press, pp. 625–659, 1991.
200. J. Yu, D.-W. Yu, D.M. Checkla, I.M. Freedberg and A.P. Bertolino, Human hair keratins. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 101, 56S–59S, 1993.
201. H.P. Baden, *Characterization of hair keratins*, In: *Hair Research*, edited by C.E.ORFANOS, 1981.
202. P.M. Steinert and I.M. Freedberg, *Molecular and cellular biology of keratins*, In: *Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology of the Skin*, Second edition, Volume I, 1991.
203. G.L. Henderson, Mechanism of drug incorporation into hair, *Forensic Science International*, Vol. 63, Nos 1-3, pp. 19–29, 1993.

204. H. Sato, T. Uematsu, K. Yamada and M. Nakashima Chlorpromazine in human scalp hair as an index of dosage history, comparison with simultaneously measured haloperidol, *European Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 44, No 5, pp. 439–444, 1993.
205. A. Mizuno, T. Uematsu, A. Oshima, M. Nakamura and M. Nakashima, Analysis of nicotine content of hair for assessing individual cigarette-smoking behavior, *Therapeutic Drug Monitoring*, Vol. 15, No 2, pp. 99–104, 1993.
206. M. Rothe, F. Pragst, S. Thor and J. Hunger, Effect of pigmentation on the drug deposition in hair of grey-haired subjects, *Forensic Science International*, Vol. 84, Nos 1-3, pp. 53–60, 1997.
207. D.E. Rollins, D.G. Wilkins, G.G. Krueger, M.P. Augsburger, A. Mizuno, C. O'Neal, C.R. Borges and M.H. Slawson, The effect of hair color on the incorporation of codeine into human hair, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 27, No 8, pp. 545–551, 2003.
208. G.L. Henderson, M.R. Harkey and C. Zhou, Incorporation of isotopically labeled cocaine into human hair: race as a factor, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol. 22, No 2, pp. 156–165, 1998.
209. R. Kronstrand, S. Förstberg-Peterson, B. Kägedal, J. Ahlner and G. Larson, Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanine content, *Clinical Chemistry*, Vol. 45, No 9, pp. 1485–1494, 1999.
210. R. Kronstrand, M.C. Anderson, J. Ahlner and G. Larson, Incorporation of selegiline metabolites into hair after oral selegiline intake, *Journal of Analytical Toxicology*, Vol 25, No 7, pp. 594-601, 2001.
211. L. Pötsch, G. Skopp and M.R. Moeller, Influence of pigmentation on the codeine content of hair fibers in guinea pigs, *Journal of forensic sciences*; Vol. 42, pp. 1095–1098, 1997.
212. L. Pötsch, G. Skopp and G Rippin, A comparison of 3H-cocaine binding on melanin granules and human hair in vitro, *International Journal of Legal Medicine*, Vol. 110, No 2, pp. 55–62.
213. D.J. Claffey, P.R. Stout and J.A. Ruth, 3H-nicotine, 3H-flunitrazepam, 3H-cocaine incorporation into melanin: a model for the

- examination of drug–melanin interactions. *Journal of Analytical Toxicology*; Vol. 25, No 7, pp. 607–611, 2001.
214. Z. Zhang, M. J. Yang and J. Pawliszyn, Solid Phase Microextraction: A New Solvent-Free Alternative for Sample Preparation, *Analytical Chemistry*, Vol. 66, No 17, pp. 844A-853A 1994.
215. J. Novak and J. Drozd, *Instrumentation in Analytical Chemistry*, Zyka J, Ed. Ellis Horwood West Sussex, England, Vol. 1, Chapter 10, 1991.
216. J. Ho, P. Hodaklevic and T. Bellar, *Solid Phase extraction*, American Laboratory, July 14, 1989.
217. L. Doherty, American Environment Laboratory, 6, 11, 1991.
218. H.-P. Lv, Q.-S. Zhong, Z. Lin, L. Wang, J.-F. Tan and L. Guo, Aroma characterisation of Pu-erh tea using headspace-solid phase microextraction combined with GC/MS and GC– olfactometry, *Food Chemistry*, Vol. 130, No 4, pp. 1074–1081, 2012.
219. L. Segovia-Martínez, A. Bouzas-Blanco, P. Campíns-Falcó and A. Seco-Torrecillas, Improving detection limits for organotin compounds in several matrix water samples by derivatization-headspace-solid-phase microextraction and GC–MS, *Talanta*, Vol. 80, No 5, pp. 1888–1893, 2010.
220. R. Agius, Th. Nadulski, H.-G. Kahl, J. Schröder, B. Dufaux, M. Yegles and F. Pragst Validation of a headspace solid-phase microextraction–GC– MS/MS for the determination of ethyl glucuronide in hair according to forensic guidelines, *Forensic Science International* Vol 196, Nos 1–3, 2010, pp. 3–9.
221. F. Maggi, F. Papa, G. Cristalli, G. Sagratini, S. Vittori, Characterisation of the mushroom-like flavour of *Melittis melissophyllum* L. subsp. *melissophyllum* by headspace solid- phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography (GC– FID) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), *Food Chemistry*, Vol. 123, No 4, pp. 983–992, 2010.
222. P. Atkins, *Physical Chemistry*, 1st ed. W. H. Freeman and Co. San Francisco, CA, Chapter 8, 1978.

223. D. Louch, S. Motlagh and J. Pawliszyn, Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers, *Analytical Chemistry*, Vol. 64, No 10, pp. 1187-1199, 1992.
224. J. Riggs, *An Introduction to Numerical Methods for Chemical Engineers*; Texas Tech University Press, Lubbock, TX, 1988.
225. J. Crank, *The Mathematics of Diffusion*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford, U.K., 1989.
226. A. News and G. Park, The Diffusion Coefficient of Benzene in a Variety of Elastomeric Polymers, *Journal of Polymer Science Part C: Polymer Symposia*, Vol. 22, No 2, pp. 927-937, 1969.
227. E. Washburn, *International Critical Tables of Numerical Data, Physics, Chemistry and Technology*, McGraw-Hill, NY, 1926.
228. D.A Scoog, F.J. Holler and T.A. Newman, 5th ed., μετ. Μ. Καραγιάννης, Κ. Ευσταθίου και Ν. Χανιωτάκης, *Αρχές της ενόργανης Ανάλυσης*, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002.
229. Peter M. van Galen, *Mass Spectrometry, the Organic Chemistry Department (A guide for novel users)* Organic Chemistry Department Nijmegen University September 2005
230. http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_03_Mass_Spectrometry_pt2.pdf (τελευταία επίσκεψη 7-3-2015)
231. P. Marriott and R. Shellie, Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 21, Nos 9–10, pp. 573–583, 2002.
232. http://forensicscienceeducation.org/wp-content/uploads/2013/04/Fundamental_GC-MS_Introduction.pdf (τελευταία επίσκεψη (7-3-2015)
233. H.H. Maurer and S. Bouchonnet, Introduction to GC-MS coupling, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 405, No 26, pp 8385-8386, 2013.
234. J.R. Chapman, *Practical Organic Mass Spectrometry, A guide for Chemical and Biochemical Analysis*. Second edition, John Willey & Sons Ltd, Chichester, England, 1993.
235. http://www.chemistry.wustl.edu/files/chemistry/imce/courses/sp_12/chem550/MS%20INSTRUMENT-PART%20I.pdf (τελευταία επίσκεψη 21-03-2015).

236. Πασιάς Ιωάννης *Διερεύνηση της χρήσης μόνιμων χημικών τροποποιητών και εσωτερικού προτύπου για τη βελτίωση της πολυστοιχειακής φασματομετρίας ατομικής απορρόφησης με φούρνο γραφίτη*, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα 2012.
237. K. Hewavitharana, Internal Standard—Friend or Foe?, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 39, no. 4, 2009, pp. 272–275.
238. J.M. Mermet and J.C. Ivaldi, Real-time standardization for inductively coupled plasma atomic emission spectrometry using custom segmented-array charge coupled detector, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 8, no. 6, 1993, pp. 795 – 801.
239. Commission regulation (EC) No 653/2007 of 13 June 2007 on the use of a common European format for safety certificates and application documents in accordance with Article 10 of Directive 2004/49/EC of the European Parliament and of the Council and on the validity of safety certificates delivered under Directive 2001/14/EC
240. F. Pragst and M.A.Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 370, Nos 1-2, pp. 17–49, 2006.
241. D.K. Harkins and A.S., Susten, Hair analysis: exploring the state of the sciences, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 111, No 4, pp. 576–578, 2003.
242. A. Covaci, C. Hura, A. Gheorghe, H. Neels and A.C. Dirtu, Organochlorine contaminants in hair of adolescents from Iassy, Romania, *Chemosphere*, Vol. 72, No 1, pp. 16–20, 2008.
243. A. Covaci and P.Schepens, Chromatography aspects of the analysis of selected persistent organochlorine pollutants in human hair, *Chromatographia*, Vol 53, No 1, pp. 366–371, 2001.
244. A. Covaci, M. Tuttudaki, A.M. Tsatsakis and P.Schepens, Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persisted organochlorine pollutants, *Chemosphere*, Vol. 46, No 3, pp. 413–418, 2002.
245. Y. Miyabara, N. Nishimura and C. Tohyama, Determination of dioxins in human hair: estimation of external and internal exposure to

- dioxins, *Environmental Health and Preventive Medicine*, Vol. 10, No 2, pp. 86–93, 2005.
246. T. Nakao, O.Aozasa, S. Ohta and H. Miyata, Survey of human exposure to PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs using hair as an indicator, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 49, No 1, pp. 124–130, 2005.
247. H. Zhang, Z.F. Chai and H.B.Sun, Human hair as a potential biomonitor for assessing persistent organic pollutants, *Environment International*, Vol. 33, No 5, pp. 685–693, 2007.
248. G. Zhao, Z. Wang, M.H. Dong, K. Rao, J. Luo, D. Wang, J. Zha, S. Huang, Y. Xu and M. Ma, PBBs, PBDEs and PVBs levels in hair of residents around e-waste disassembly sites in Zhejiang Province, China, and their potential sources, *Science of The Total Environment*, Vol. 397, Nos 1-3, pp. 46–57, 2008.
249. R.D. Behrooz, A. Esmaili-Sari, S.M. Ghasempouri, N.Bahramifar and S.M.Hosseini, Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl in feathers of resident and migratory birds of South-West Iran, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 56, No 4, pp. 803–810, 2009.
250. Y. Aoki, Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters – what we have learned from Yusho disease, *Environmental Research*, Vol. 86, No 1, pp. 2–11, 2001.
251. P.D. Darbre and P.W.Harvey, Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks, *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 28, No 5, pp. 561–578, 2008.
252. T.N. Mitropoulou, G.N.Tzanakakis, D.Kletsas, H.P.Kalofonos and N.K. Karamanos, Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells, *International Journal of Cancer*, Vol. 104, No 2, pp. 155–160, 2003.
253. O.Ch. Kousidou, A. Berdiaki, D. Kletsas, A. Zafirooulos, A.D. Theocharis, G.N. Tzanakakis and N.K.Karamanos, Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and

- metalloproteinase-9 in breast cancer cells, *Molecular Oncology*, Vol. 2, No 3, pp. 223–232, 2008.
254. U. Gill, A. Covaci and J.J. Ryan, Determination of persistent organohalogenated pollutants in human hair reference material (BCR 397): an interlaboratory study, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 380, Nos 7-8, pp. 924–929, 2004.
255. L. Altshul, A. Covaci and R. Hauser, The relationship between levels of PCBs and pesticides in human hair and blood: preliminary results, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 112, No 11, pp. 1193–1199, 2004.
256. H.B. Matthews and R.L. Dedrick, Pharmacokinetics of PCB, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 24, pp. 85–103, 1984
257. F. Wania and D. Mackay, Global distillation. Our planet: the United Nations environment programme, *Magazine of Environment Sustainable Development*, Vol. 8, pp. 15–16, 1997.
258. G. Salquebre, C. Schummer, M. Millet, O. Briand and B.M.R. Appenzeller, Multi-class pesticide analysis in human hair by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry with solid phase microextraction and liquid injection, *Analytica Chimica Acta*, Vol. 710, pp. 65-74, 2012.
259. A.M. Tsatsakis, M.N. Tzatzarakis and M. Tutudaki, Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator of present and past exposure, *Forensic Science International*, Vol. 176, No 1, pp. 67-71, 2008.
260. M. Llompарт, K. Li, and M. Fingas, Solid-phase microextraction and headspace solid-phase microextraction for the determination of polychlorinated biphenyls in water samples. *Analytical Chemistry*, Vol. 70, No 13, pp. 2510-2515.1998.
261. W. Tirlir, G. Voto and M. Donega, PCDD/F and PCB levels in human hair, *Organohalogen Compounds*, Vol. 52, pp. 290–292, 2001.
262. K. Sexton, L.L. Needham and J.L. Pirkle, Human biomonitoring of environmental chemicals, *American Scientist*, Vol. 92, 38-45, (2004).

263. M. Esteban and A.Castaño, Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review, *Environment International*, Vol. 35, No 2, pp. 438–449, 2009.
264. A.M.Tsatsakis, M.G. Barbounis, M. Kavalakis, M. Kokkinakis, I.Terzi and M.N.Tzatzarakis, Determination of dialkyl phosphates in human hair for the biomonitoring of exposure to organophosphate pesticides, *Journal of Chromatography B, Bioanalysis of organophosphorus toxicants and corresponding antidotes*, Vol. 878, Nos 17-18, pp. 1246–1252, 2010.
265. A.M Tsatsakis, T. Psillakis and N.Paritsis, Phenytoin concentration in head hair sections: a method to evaluate the history of drug use, *Journal of Clinical Psychopharmacology*, Vol. 20, No 5, pp. 560–573, 2000.
266. A.M. Tsatsakis, T.Psillakis, M.N. Tzatzarakis, H. Kourtopoulos and N.Paritsis, Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: a preliminary study, *Clinica Chimica Acta*, Vol. 263, No 2, pp. 187–195, 1997.
267. A.M.Tsatsakis, M.N., Tzatzarakis, M. Tutudaki, F. Babatsikou, A.K. Alegakis and C.Koutis, Assessment of levels of organochlorine pesticides and their metabolites in the hair of a Greek rural human population, *Human and Experimental Toxicology*, Vol. 27, No 12, 933–940, 2008.
268. Y. Nakahara, Hair analysis for abused and therapeutic drugs, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Vol. 733, Nos 1-2, pp. 161–180, 1999.
269. T. Psillakis, A.M. Tsatsakis, P. Christodoulou, M. Michalodimitrakis, N. Paritsis and E.Helidonis, Carbamazepine levels in head hair of patients under longterm treatment: a method to evaluate the history of drug use, *The Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 39, No 1, pp. 55–67, 1999.
270. T. Mieczkowski, A.M.Tsatsakis, M.Kruger and T.Psillakis, The concentration of three anti-seizure medications in hair: the effects of hair color, controlling for dose and age, *BMC Pharmacology and Toxicology*, Vol. 1, No. 2, 2001.

271. E.C. Mantzouranis, G.K. Bertias, E.G. Pallis and A.M. Tsatsakis, Hair analysis differentiates chronic from acute carbamazepine intoxication, *Pediatric Neurology*, Vol. 31, No 1, pp. 73–75, 2004.
272. V.A. Boumba, K.S. Ziavrou and T.Vougiouklakis, Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants, *International Journal of Toxicology*, Vol. 25, No 3, pp. 143–163, 2006.
273. J.L. Rodrigues, B.L. Batista, J.A. Nunes, C.J.S. Passos and F.J. Barbosa, Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements, *Science of The Total Environment*, Vol. 405, Nos 1-3, pp. 370–376, 2008.
274. Y. Li, L. Yang, W. Wang, H. Li, J. Lv and X. Zou, Trace element concentrations in hair of healthy Chinese centenarians, *Science of The Total Environment*, Vol. 409, No 8, pp. 1385–1390, 2011.
275. A. Yasutake, M. Matsumoto, M. Yamaguchi and N.Hachiya, Current hair mercury levels in Japanese for estimation of methylmercury exposure, *Journal of Health Science*, Vol. 50, No 2, pp. 120–125, 2004.
276. Y. Mazukawa, H. Narita and G. Imokawa, Characterization of the lipid composition at the proximal root regions of human hair. *International Journal of Cosmetic Science*, Vol. 56, No 1, pp. 1–16, 2005.
277. T. Takahashi and S Yoshida, Distribution of Glycolipid and Unsaturated Fatty acids in Human Hair, *Lipids*, Vol. 49, No 9, pp. 905-917, 2014.
278. K. Aleksa, A. Carnevale, C. Goodyer and G.Koren, Detection of polybrominated biphenyl ethers (PBDE) in pediatric hair as a tool for determining in utero exposure, *Forensic Science International*, Vol. Nos 1-3, pp. 37-43, 2012.
279. E. Lacassie, P. Marquet, J.M.Gaulier, M.F. Dreyfuss and G.Lachtre, Sensitive and specific multiresidue methods for the determination of pesticides of various classes in clinical and forensic toxicology, *Forensic Science International*, Vol. 121, Nos 1-2, pp. 116-125, 2001.

280. D.B. Barr, J.R. Barr, V.L.Maggio, R.D. Whitehead Jr., M.A. Sadowski, R.M. Whyatt and L.L. Needham, A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using a high-resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, Vol. 778, Nos 1-2, 99-111, 2002.
281. D.B. Barr, R.Allen, A.O. Olsson, R. Bravo, L.M. Caltabiano, A. Montesano, J. Nguyen, S. Udunka, D. Walden, R.D. Walker, G. Weerasekera, R.D.J. Whitehead, S.E. Schober and L.L. Needham, Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population, *Environmental Research* Vol. 99, No 3, pp. 314-326, 2005.
282. S.E. Baker, A.O. Olsson and D.B. Barr, Isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of synthetic pyrethroid insecticides, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 46, No 3, pp. 281-288, 2004.
283. K. Conka, B. Drobna and K.J. Petrik, Simple solid-phase extraction method for determination of polychlorinated biphenyls and selected organochlorine pesticides in human serum, *Journal of Chromatography A*, Vol. 1084, Nos 1-2, pp. 33-38, 2005.
284. G. Zhao, Y. Xu, W. Li, G. Han and B.Ling, Prenatal exposures to persistent organic pollutants as measured in cord blood and meconium from three localities of Zhejiang, China, *Science of The Total Environment*, Vol. 377, Nos 2-3, 179-191, 2007.
285. I.N. Damgaard, N.E.Skakkebaek, J. Toppari, H.E. Virtanen, , H. Shen, K.W.Schramm, J.H.Petersen, T. Jensen and K.M.Main, Persistent pesticides in human breast milk and cryptorchidism. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 114, No 7, pp. 1133-1138, 2006.
286. I. Cok, C. Yelken, E. Durmaz, M. Uner, B. Sever and F. Satir, Polychlorinated biphenyl and organochlorine pesticide levels in human breast milk from the mediterranean city Antalya, Turkey, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 86, No 4, pp. 423-427, 2011.

287. CDC, C.f.D.C.a.P., *Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals*. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention, 2009.
288. D.K. Harkins and A. Susten, Hair analysis: exploring the state of the science, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 111, No 4, pp. 576-578, 2003.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ



Assessment of PCBs exposure in human hair using double focusing high resolution mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry

Emmanouil G. Barbounis^a, Manolis N. Tzatzarakis^{a,*}, Athanasios K. Alegakis^a, Aikaterini Kokkinaki^a, Nikos Karamanos^b, Andreas Tsakalof^c, Aristidis M. Tsatsakis^a

^a Center of Toxicology Science and Research, Division of Morphology, Medical School, University of Crete, 71003 Heraklion, PO Box 1393, Crete, Greece

^b University of Patras, Department of Chemistry, Biochemistry Laboratory, Patras 26100, Greece

^c Laboratory of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Thessaly, BIOPOLIS, Larisa 41110, Greece

ARTICLE INFO

Article history:

Available online 22 August 2011

Keywords:

Hair
Polychlorinated biphenyls
GC–MS
GC–DFHRMS
Biomarkers

ABSTRACT

Polychlorinated biphenyls (PCBs) levels were assessed in human hair samples, originating from two main agricultural regions of Greece. The analysis was performed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and gas chromatography–double focusing high resolution mass spectrometry (GC–DFHRMS). The main analytical procedure involved hair decontamination, solid–liquid extraction and cleanup steps. The recoveries of PCBs ranged from 71.2% to 101.6%, with accuracies greater than 87.5% and the between-run precisions (%RSD) lower than 25% for all analytes. Differences in the frequencies of detection and the median values of PCBs were detected between the examined regions and between the applied analytical techniques. All Peloponnesus' hair examined samples were found positive for each examined PCB, while the percentage of the total positive samples ranged from 86.1% (for PCB 138) to 94.4% (for PCB 28 and 153 congeners) using GC–DFHRMS. The Cretan hair samples were less contaminated (SUM PCBs = 0.61 and 1.47 pg/mg) unlike the Peloponnesus' samples (SUM PCBs = 24.68 and 38.74 pg/mg) measured by GC–DFHRMS and GC–MS, respectively. PCBs with high chlorination gave lower concentration values compared to low chlorination PCBs in both populations. No significant differences were observed between women and men. The GC–DFHRMS technique provided higher percentage of positive samples and low PCBs median values, due to higher sensitivity and interferences from isobaric ions in the GC–MS technique and is therefore considered as a powerful tool for such assessments in hair specimens.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Human exposure to persistent organic pollutants (POPs) assessment is crucial for public health protection and risk assessment. Hair sample is a suitable and important medium for monitoring and evaluation of exposure to drugs (Pragst and Balikova, 2006) or to chemical substances (Jacobs, 1996).

Abbreviations: GC–DFHRMS, gas chromatography–double focusing high resolution mass spectrometry; GC–MS, gas chromatography–mass spectrometry; POPs, persistent organic pollutants; ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry; PCBs, polychlorinated biphenyls; TEF, toxic equivalent factor; HPLC, high performance liquid chromatography; SPE, solid phase extraction; MID, multiple ion detection; FC43, perfluorotributylamine; S/N, signal to noise; RSD, relative standard deviation; LOQ, limits of quantification; LOD, limits of detection; SD, standard deviation; HCHs, sum of α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH and HCB compounds; DDTs, sum of DDT related compounds (op and pp DDD, op and ppDDE, op and ppDDT); EPA, Environmental Protection Agency.

* Corresponding author. Tel.: +30 2810 394777; fax: +30 2810 542098.

E-mail address: tzatzarakis@med.uoc.gr (M.N. Tzatzarakis).

The Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR, USA), during June 2001, held a meeting of experts to review and discuss the current state of hair analysis science and its usefulness in assessing environmental exposure (Harkins and Susten, 2003). One of the conclusions was that the measurement of a substance in hair samples could present difficulties in distinguishing endogenous (internal) from exogenous (external) contamination in hair. Being able to make this distinction is important in evaluating internal doses of the substance of interest. This approach was followed in the next years and its usefulness in the study of human exposure (Covaci and Schepens, 2001; Nakao et al., 2005; Schramm et al., 1992; Zhao et al., 2008; Zhang et al., 2007) and wild life (Schramm, 1997; Behrooz et al., 2009) to persistent organic pollutants was further reinforced. Moreover, recent studies managed to provide estimates of the origin and the levels of the internal and the external exposure (Miyabara et al., 2005).

Hair as a matrix has some unambiguous advantages comparing blood or adipose samples. Hair samples usually exist in sufficient amounts and can be collected without laborious sampling procedures or special precautions for handling, storage, and shipment, in contrast to blood, milk, or tissues samples. Additionally, hair sample

collection would be useful to large epidemiologic studies or to studies involving young children due to blood limits participation rates. The chemical composition of hair also favors the incorporation of lipophilic persistent organic pollutants.

The high level of lipid found in hair makes it a suitable matrix for the POPs, due to the lipophilic nature (Harkey, 1993; Spearman, 1977). The lipophilicity of a compound is an essential factor for its incorporation in hair, as has been previously reported (Pragst and Balikova, 2006). The correlation between the incorporation rate and the lipophilicity of a compound has been found positive following *in vitro* experiments (Kikura and Nakahara, 1998). On this basis, it can be concluded that hair are the most suitable specimen for the assessment of human exposure to POPs.

Water, soil, sewage sludge, human tissues, blood, urine, human hair are matrices in which POPs are still detected in substantial amounts often exceeding levels allowed by current legislation, due to large production, excessive consumption, chemical stability and persistence in nature (Wu et al., 1999). POPs have been observed to be capable of long-range transport; they bio-accumulate in human and animal tissues, bio-magnify in food chains and as a consequence have potential significant impacts on human health and the environment. POPs are also resistant to photolytic, biological and chemical degradation, they have long environmental half-life time which result their wide geographical distribution (Wong et al., 2005). More importantly, POPs have the propensity to enter the gas phase at ambient environmental temperatures. Hence, they may volatilize from soil, vegetation and water into the atmosphere and, because of their resistance to breakdown reactions in the air, travel long distances before being re-deposited. The cycle of volatilization and deposition may be repeated many times, resulting to POPs accumulation in remote areas comparing to where they were initially used or emitted (Jones and Voogt, 1999).

Some of the most known POPs are the polychlorinated biphenyls (PCBs). The PCBs are highly lipophilic, thermally stable and low flammable (De Voogt and Brinkman, 1989). The degree of lipophilicity increases with increasing chlorination (PCB 1, log Kow = 4.46; PCB 209, log Kow = 8.18) (Hawker and Connell, 1988). The PCBs have been detected in various environmental compartments worldwide, and they have been shown to bio-accumulate within food chains (Lundgren et al., 2002).

Since it is almost impossible to analyze all PCBs of potential interest, an appropriate selection of analytes ensures the collections of consistent data and significant information regarding the samples analyzed and the status of the human health (Van den Berg et al., 1998). It is well known that over one hundred PCBs were identified in the technical PCBs mixtures. However, only a part of them could be detected at significant levels in nature. Moreover, it is highly cost-effective to monitor fewer congeners, especially since it may be possible to acquire nearly all desired information from a reduced set of measurements, due to the high correlation of many PCB congeners.

Notably, the toxic equivalent factor (TEF)-concept is extremely useful since it provides a selection of toxicologically relevant congeners including 2,3,7,8-substituted dioxins and planar PCBs (Wingfors et al., 2000). These analytes are present at very low levels, prompting researchers to search for more abundant marker compounds with a high correlation to this group of analytes (Atuma et al., 1996; Van den Berg et al., 1995; Wicklund et al., 2000). Another approach is to analyze the level of the most abundant PCB congeners of each homologue in environmental samples. Most shortlists contain congeners obtained by both approaches, and lists including between seven and 79 PCB congeners have been proposed by different organizations and researchers (Cochran and Frame, 1999). Usually, for practical and economic reasons, seven PCB congeners (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) are monitored to assess environmental exposure in Europe. These congeners

are generally considered to be stable in environmental and biological systems, and have been shown to be correlated with congeners of toxicological relevance.

The main technique used so far for the analysis of chlorinated compounds is gas chromatography coupled to a mass spectrometry detector or to an electron capture detector. In the present study, we introduce the use of gas chromatography coupled to a double focusing high resolution mass detector and compare it with gas chromatography coupled to single quadrupole mass detector. The investment and maintenance cost of a high resolution instrument sufficiently increase the cost of analysis and sometimes deter its application in massive biomonitoring studies. Low resolution mass spectrometry system is substantially cheaper but it lacks the accuracy, selectivity and sensitivity of HRMS. Although, in most applications a quadrupole is adequate, higher mass resolution sometimes is needed in order to increase sensitivity and to avoid matrix isobaric interferences.

The aim of the present study was therefore to assess the burden of the population from two agricultural regions of Greece for PCBs, as well as to compare the differences that were observed between two gas chromatographic techniques, gas chromatography with single quadrupole mass spectrometry (GC-MS) and gas chromatography-double focusing high resolution mass spectrometry (GC-DFHRMS).

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Forty-four hair samples were collected from people living in two agricultural regions of Greece (island of Crete and Helia, Peloponnesus) during the period of 2006–2008; nineteen and twenty five hair samples, respectively. Approximately 200–400 mg of hair was removed from the head of the people participating in this study, with hair length ranged from 3 to 16 cm. All hair samples were labeled and stored in paper envelopes, at ambient temperature until further processing and analysis. All the participants were informed about the aim of the study and provided their consent.

2.2. Reagents and materials

PCB congeners (28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) were purchased from Fluka analytical-Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, 3050, Spruce Street, St. Louis, USA). Dichloromethane and n-heptane (Merck, Darmstadt, Germany) and n-hexane (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were HPLC grade. For solid phase extraction, silica gel 60-200 Mesh, 150A, aluminium oxide Type WB-2 basic (Sigma-Aldrich, 3050, Spruce Street, St. Louis, USA) and sulfuric acid 95–98% (Mallinckrodt, St. Louis, USA) were used. Perfluorotributylamine (FC43) was purchased from Scientific Instrument Services (SIS), 1027 Old York Rd., Ringoes, NJ, USA.

Stock solutions were prepared in hexane for each individual PCB at concentration of 10 and 1 µg/ml and stored at –20 °C. Working solutions of mixed PCBs were prepared in hexane at concentration of 0, 0.83, 1.25, 2.5, 5, 10, 50 and 100 ng/ml and stored at 4 °C in the dark.

2.3. Extraction methodology

200 mg of hair samples washed twice with Milli Q water (5 min), hexane (30 s) and cut in small pieces (2–3 mm). Hexane (3 ml) was added to each sample and incubated in ultrasonic bath (3 h at 40 °C). This procedure was repeated once and the resulting upper layer (6 ml hexane) was transferred to SPE columns for clean up. The SPE columns used were packed with 250 mg deactivated Al₂O₃ and 500 mg acidified silica. The modified silica gel was prepared as follows: 27 ml concentrated sulfuric (95–98%) acid were added (drop wise) to 50 g silica gel, while the mixture was stirred to ensure good homogeneity. The acidified silica was further stirred for 30 min. Deactivated Al₂O₃ and silica gel were used after heating for 2 h at 150 °C. SPE cartridges were activated with the addition of 2 ml of n-hexane:dichloromethane (4:1, v/v), while 2 ml of n-hexane:dichloromethane (1:1, v/v) was used for elution (Covaci et al., 2008). The final eluate was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and reconstituted by the addition of 70 µl heptane.

Table 1
Multi ion detection double focusing high resolution instrument setup.

Multi ion detection instrument setup							
MID window 1		MID window 2		MID window 3		MID window 4	
Start	8:03 min	Start	17:06 min	Start	31:27 min	Start	37:06 min
Measure	9:03 min	Measure	14:21 min	Measure	5:38 min	Measure	2:53 min
End	17:06 min	End	31:27 min	End	37:06 min	End	40:00 min
Cycle time	0.70 s	Cycle time	0.80 s	Cycle time	0.80 s	Cycle time	0.80 s
Targeted masses <i>m/z</i>	Dwell time [ms]	Targeted masses <i>m/z</i>	Dwell time [ms]	Targeted masses <i>m/z</i>	Dwell time [ms]	Targeted masses <i>m/z</i>	Dwell time [ms]
180	1.00	250	1	357	1	424	1
188.0388	28.00	255.9609	29	359.8415	44	425.9770 l	8
190.036	28.00	257.958	29	361.8385	44	427.763	53
200.079	28.00	263.9866 l	7	363.9802 l	11	429.76	53
202.076	28.00	268.001	29	371.8817	44	439.803	53
213.9897 l	5.00	269.998	29	373.8788	44	441.8	53
222	28.00	289.9221	29	393.8025	44	461.724	53
223.997	28.00	291.9194	29	395.7995	44	463.721	53
234.04	28.00	301.9626	29	405.8428	44	463.9738 c	8
236.037	28.00	303.9597	29	407.8398	44	473.764	53
255.961	28.00	323.8834	29	413.9770 c	4	475.761	53
257.958	28.00	325.8804	29	427.763	44	495.685	53
268.001	28.00	335.9237	29	429.76	44	497.682	53
269.998	28.00	337.9207	29	439.803	44	507.725	53
283.81	28.00	359.8415	29	441.8	44	509.722	53
285.807	28.00	361.8385	29	461.724	44		
289.83	28.00	371.8817	29	463.721	44		
291.827	28.00	373.8788	29				
301.9626	28.00	393.8025	29				
303.9597	28.00	395.7995	29				
313.9834 c	5.00	405.8428	29				
		407.8398	29				
		413.9770	7				

3. Analytical techniques

3.1. GC–DFHRMS analysis

Gas chromatography coupled to double focusing high resolution mass detector was performed on the DFS High Resolution GC/MS system (Thermo Scientific, West Palm Beach, USA), equipped with TriPlus™ Autosampler. Fused silica STX-500 capillary column (60 m × 0.25 mm × 0.15 μm), (Restek, Bellefonte, PA, USA) was used, with 2 μl sample extract injected in splitless mode. The oven temperature was programmed as follows: 110 °C (1 min); 20 °C/min to 200 °C; 2 °C/min to 220 °C; 4 °C/min to 310 °C (2 min). Helium 99.999% was used as carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. The injection was performed using the hot needle technique. The empty needle was heated up in the injector for 2–3 s before injecting the sample, thus eliminating any discrimination of higher boiling congeners. The high resolution mass spectrometer was setup in the multiple ion detection (MID) mode at a resolution of 10,000 (10% valley definition). The MID setup is shown in Table 1. FC43 was used as a reference compound. These reference masses are monitored scan-to-scan to insure the highest mass precision, stability and ruggedness necessary for routine target compound analysis on a high resolution mass spectrometer. An electron energy of 48 eV was chosen for optimum sensitivity, since during optimization the best instrument performance was achieved by auto tuning the ion source on the FC43 reference mass *m/z* 414 with a resolution setting of 10,000 (Table 1).

3.2. GC–MS analysis

Electron impact ionisation mass spectrometric analysis of hair extracts was performed on the GC-QP2010 gas chromatography–mass spectrometry system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a fused silica capillary column Equity

TM-5 (30 m × 0.20 mm × 0.20 μm) capillary column supplied by Supelco (Supelco, Bellefonte, USA). Pure helium with at flow rate of 1 ml/min was used as a carrier gas, with 2 μl extract volume injected in splitless mode. The column temperature was initially held at 60 °C for 1 min, raised at 10 °C/min to 300 °C and held for 1 min. The injector, interface and ion source temperatures were set at 230 °C, 310 °C and 220 °C respectively. The mass spectrometer detector was operated at the selected ion-monitoring mode (SIM). The *m/z* ions, target *m/z* ions and the retention times of each PCB congener are listed in Table 2.

4. Statistical analysis

Levels of PCB congeners were expressed as medians and quartiles, while contributions of PCBs were expressed as means, standard deviations and minimum–maximum percentages. Differences between the population groups were examined by Mann–Whitney test. Box and Whisker plots and bar charts were used for presenting the distribution of PCBs levels. Data analysis was made using IBM SPSS Statistics 19.0, with a level of significance set to 0.05.

5. Results

5.1. Method evaluation

Two of the most widely used methods for the extraction of PCBs from hair samples are acidic extraction followed by liquid–liquid extraction (Covaci and Schepens, 2001) and soxhlet extraction (Zhao et al., 2008). In this study, we developed a modified methodology using ultrasound incubation for solid–liquid extraction of PCBs. This method does not require any specific equipment, is simpler and faster than soxhlet and acidic extraction as a liquid–liquid extraction step is omitted (total incubation time 6 h).

Table 2
Analytical and methodology parameters of the PCB target compounds.

	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 118	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Retention time (min)	16.89	17.59	19.31	20.51	21.45	20.92	22.68
Target <i>m/z</i> ion	256	292	326	326	360	360	394
Fragments (<i>m/z</i>)	186	150	184	184	218	218	254
	150	220	256	256	290	290	324
	256	292	326	326	360	360	394
Mean recovery %	71.2	91.8	89.5	94.3	101.6	88.7	85.4
LOD (pg/mg) ^a	0.2/0.017	0.2/0.016	0.3/0.013	0.2/0.012	0.2/0.013	0.2/0.013	0.4/0.012
LOQ (pg/mg) ^b	0.6/0.026	0.6/0.025	0.8/0.017	0.6/0.014	0.6/0.017	0.7/0.017	1.3/0.015
Between-day precision (% RSD)	4.3	9.0	17.5	11.4	21.9	13.2	18.3
Accuracy (%)	98.2	87.5	104.4	95.3	104.9	101.4	92.1

^a The limits of detection (LOD) for GC–MS/GC–DFHRMS.

^b The limits of quantification (LOQ) for GC–MS/GC–DFHRMS.

Human hair samples were analyzed for the presence of PCBs, while samples with PCBs levels below LOQ were combined and used as blank samples. The recovery estimation of the extraction step was performed on spiked blank hair samples at concentration levels of 1, 2.5, 5 and 10 pg/mg. The mean recoveries for PCBs were varied from 71.2% for PCB 28 to 101.6% for PCB 138, with 88.9% mean recovery for all examined PCBs (Table 2).

The limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) for the GC–MS technique were estimated by analysing decreasing concentrations of spiked solutions and defined as the peaks that gave a signal to noise ratio of 10 and 3, respectively. The LOQ and LOD were ranged from 0.6 to 1.3 pg/mg and from 0.2 to 0.4 pg/mg (Table 2).

LOQ limits for the GC–DFHRMS technique were defined on the base of blank level and the LOD is mentioned as the actual value at the acquisition data. The LOQ values were ranged from 0.014 to 0.026 pg/mg and the LOD were ranged from 0.012 to 0.017 pg/mg (Table 2). The between-day precision and the accuracy were both evaluated in spiked hair samples at levels of 2.5, 5 and 10 pg/mg, analyzed in fourfold for each concentration (Table 2).

5.2. Biomonitoring results

The analysis of head hair samples from Cretan and Peloponnesus' population was performed using both GC–MS and GC–DFHRMS techniques. The median, 1st and 3rd quartile levels of each examined PCB congener as well as the % positive samples are presented in Table 3.

Differences in the frequencies of detection and the median values of PCBs were detected between the examined population and the applied analytical techniques. All Peloponnesus' hair samples were positive (100%) for each examined PCB. For Cretan samples, the less frequently detected PCB was PCB 138 (76.2%) and the most frequent were PCB 28 and 153 (90.5%) according to GC–DFHRMS technique (Table 3). On the other hand, GC–MS analysis of the same samples provided much lower frequencies than high resolution analysis. The range of the % positive samples for Peloponnesus' samples was from 46.7% (for PCB 118) to 100% (for PCB 52, 138 and 153) while for Cretan samples the corresponding values were varied from 9.5% (for PCB 28 and 138) to 85.7% (for PCB 52). No positive samples were detected by GC–MS analysis for PCB 101 in Cretan samples and for PCB 180 for both Cretan and Peloponnesus' samples.

The total burden to PCBs for Cretan population measured by double focusing high resolution mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry was 0.61 and 1.47 pg/mg, while that Peloponnesus' population was 24.68 and 38.74 pg/mg, respectively. Significant differences ($p < 0.001$) were observed in median levels for all examined PCBs between the two populations analyzed by GC–DFHRMS (Table 3).

6. Discussion

PCBs have been used for a number of decades, as a dielectric in transformers and capacitors, as plasticizers and as fire resistant liquid in closed fire safety systems. Their production was banned by Environmental Protection Agency (EPA) in 1979 and by the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants in 2001. PCBs were first identified in pike, eagle, and human hair samples by Jensen (1966), 37 years after their introduction as a commercial product in 1929 by the Monsanto Industrial Chemical Corporation. PCBs are ubiquitously distributed in the (aquatic) environment (Environmental Health Criteria, 1993). PCBs toxicity varies considerably among congeners. The most commonly observed health effects in people exposed to extremely high levels of PCBs are skin conditions, such as chloracne, rashes as well as fatigue, headache, cough, unusual skin sores, ocular lesions, irregular menstrual cycles, lowered immune response and poor cognitive development in children (Aoki, 2001). Moreover, PCBs have been shown to mimic the action of estrogens in breast cancer cells and can enhance breast carcinogenesis (Darbre and Harvey, 2008). This is a very serious concern since estrogens affect gene expression of matrix macromolecules implicated in breast cancer cell invasion and metastasis (Mitropoulou et al., 2003; Kousidou et al., 2008).

Theoretically, 209 congeners are possible, although the actual number of congeners found in the environment is much lower. The analysis PCBs is often limited to a selection of seven PCBs, the so-called 'ICES-7' or 'indicator PCBs'. This selection consists of the PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180 and covers a wide range of chlorination degrees (tri- to hepta-chlorination) and boiling points.

Two population groups (residents of different agricultural regions of Greece) were selected in this study and hair analysis was performed in order to assess the total burden to PCBs. Generally, the hair samples collected from the rural population of Peloponnesus gave significantly ($p < 0.01$) higher median concentrations (from 8.8 pg/mg for PCB 28 to 1.14 pg/mg for PCB 180) than Cretan samples (0.24 pg/mg for PCB 28 to 0.04 pg/mg for PCB 118) according to the high resolution analysis for all examined PCB congeners. GC–MS analysis failed to provide significant differences for PCB 28, 118 and 138 ($p > 0.05$) congeners between the two examined populations (Table 3). Moreover, the median levels of PCBs provided by GC–MS were higher than those of GC–DFHRMS for both populations. This can be explained due to the higher LOQ values and consequently the lower number of positive samples found by the single quadrupole mass spectrometry analysis, compared to high resolution analysis.

The SUM PCB median level (0.61 pg/mg) in Cretan hair samples were lower than those reported in previous studies in adolescents, residents of an industrial city in Romania (median 6.3 pg/mg) (Covaci et al., 2008). Peloponnesus' samples total burden to PCBs

Table 3
PCBs median levels, quartiles (1st and 3rd) and % positive samples of Cretan and Peloponnesus' population, measured both by GC–DFHRMS and GC–MS.

	GC–MS					GC–DFHRMS				
	% positive	1st	Median	3rd	p	% positive	1st	Median	3rd	p
PCB 28										
Crete	9.5	1.37	3.22	5.07	0.089	90.5	0.09	0.24	0.31	<0.001
Peloponnesus	93.3	7.70	9.20	18.36		100.0	3.20	8.80	17.70	
Total	44.4	6.89	8.76	16.76		94.4	0.20	0.95	5.20	
PCB 52										
Crete	85.7	0.20	0.78	2.07	<0.001	81.0	0.08	0.14	0.38	<0.001
Peloponnesus	100.0	8.25	10.52	18.26		100.0	2.13	4.80	11.40	
Total	91.7	0.64	2.83	10.34		88.9	0.13	0.61	4.50	
PCB 101										
Crete	–	–	–	–	–	81.0	0.04	0.07	0.16	<0.001
Peloponnesus	66.7	2.11	2.71	4.21		100.0	0.72	2.20	4.70	
Total	27.8	2.11	2.71	4.21		88.9	0.07	0.24	2.04	
PCB 118										
Crete	38.1	0.80	2.72	5.77	0.107	85.7	0.02	0.04	0.07	<0.001
Peloponnesus	46.7	3.97	5.15	6.58		100.0	0.43	2.00	2.80	
Total	41.7	1.98	4.64	6.24		91.7	0.04	0.13	1.76	
PCB 138										
Crete	9.5	0.20	0.82	1.44	0.155	76.2	0.04	0.07	0.13	<0.001
Peloponnesus	100.0	1.37	1.90	4.32		100.0	0.45	1.92	2.60	
Total	47.2	1.35	1.85	3.92		86.1	0.07	0.17	1.70	
PCB 153										
Crete	19.0	0.50	0.50	4.76	0.006	90.5	0.04	0.10	0.18	<0.001
Peloponnesus	100.0	5.99	8.64	9.47		100.0	0.64	2.40	3.20	
Total	52.8	5.12	8.43	9.25		94.4	0.10	0.20	2.20	
PCB 180										
Crete	–	–	–	–	–	81.0	0.03	0.05	0.07	<0.001
Peloponnesus	–	–	–	–	–	100.0	0.33	1.14	1.66	
Total	–	–	–	–	–	88.9	0.05	0.09	1.14	
SUM PCB										
Crete	85.7	0.70	1.47	5.07	<0.001	90.5	0.39	0.61	1.03	<0.001
Peloponnesus	100.0	29.31	38.74	52.99		100.0	8.80	24.68	40.85	
Total	91.7%	1.44	8.41	37.56		94.4%	0.56	2.10	22.64	

(24.68 pg/mg) is higher than those reported for Greek, Romanian and Belgian populations (Covaci et al., 2002), comparable to those from rural children population of Beijing, China (Zhang et al., 2007), but much lower than those noted for residents around of electronic appliances recycling sites, where the mean levels of PCBs were ranged from 28.19 to 181.99 pg/mg (Zhao et al., 2008). As previously reported (Gill et al., 2004), easily metabolized PCB congeners are present in higher proportion in hair compared to the other PCB congeners, while PCB hair profile can be altered by different elimination and distribution mechanisms compared to that in adipose tissue and serum. External contamination from air can also contribute to the problem.

Fig. 1A1 and A2 illustrates the distributions of each individual PCB congener, for the two populations examined, as it was estimated by GC–MS and GC–DFHRMS analysis, concluding to an almost similar PCB hair profile. Low chlorinated PCBs, such as PCB 28 and 52, gave higher detected median concentrations compared to those PCBs with high chlorination degree, since the degree of lipophilicity of PCBs increases with increasing chlorination. The concentrations of PCBs congeners were in the order of PCB 28 > 52 > 153 > 101 > 118 > 138 > 180 for Peloponnesus' hair samples and PCB 28 > 52 > 153 > 101 = 138 > 180 > 118 for Cretan samples according high resolution analysis (Table 3).

Altshul et al. (2004) reported higher concentrations of less-chlorinated PCBs in hair and higher concentrations of highly chlorinated and most persistent PCBs in serum. Moreover, Zhao et al. (2008) supported in their study that the most abundant PCB congeners found in the hair samples were PCB 28, 52, 66 and 138 (all with 100% detection frequency). In the present study, no differences were observed in the percentages of positive samples among

PCB congeners (from 86.1% for PCB 138 to 94.4% for PCB 28, in total population) by high resolution analysis. The most contaminated hair samples from the population of Peloponnesus provided higher frequencies of detection by both techniques compared to Cretan samples. All Peloponnesus' samples were positive for each PCB while the frequencies for Cretan samples were ranged from 76.2% (PCB 138) to 90.5% (for PCB 28 and 153) by high resolution analysis. No positive samples were detected by GC–MS analysis for PCB 101 in Cretan samples and for PCB 180 for both Cretan and Peloponnesus' samples, due to the high LOQ values of the technique (0.8 and 1.3 pg/mg, respectively). At the same time, the median levels of positive samples for PCB 101 and 180 by DFHRMS analysis were 0.07 (0.04–0.16 1st and 3rd quartile) and 0.05 (0.03–0.07 1st and 3rd quartile).

PCB 28 was the most contributed congener of all PCBs burdened for both population groups following by PCB 52 (Table 4). The % contribution of PCB 28 was 33.2% and 42.8% for Cretan and Peloponnesus' samples, respectively. Both PCB 25 and 52 provided % contribution to the total PCBs burden above than 50% for both examined populations.

As mentioned before, PCB 52 is a labile PCB congener in human body, that it is easily metabolized through hydroxylation by hepatic cytochrome p-450 enzyme (Zhang et al., 2007; Matthews and Dedrick, 1984). Moreover, the PCB 52 goes easier into atmosphere than other PCB congeners due to lower pressure and higher mobility (Wania and Mackay, 1997). It was reported (Zhang et al., 2007) that PCB 52, 60, 103 and 173 were the congeners with above than 50% detection frequencies in urban population, while the PCB 52 was the major contributor to total PCB (no data for PCB 28 were presented). Between urban and rural population, only PCB 52 detected

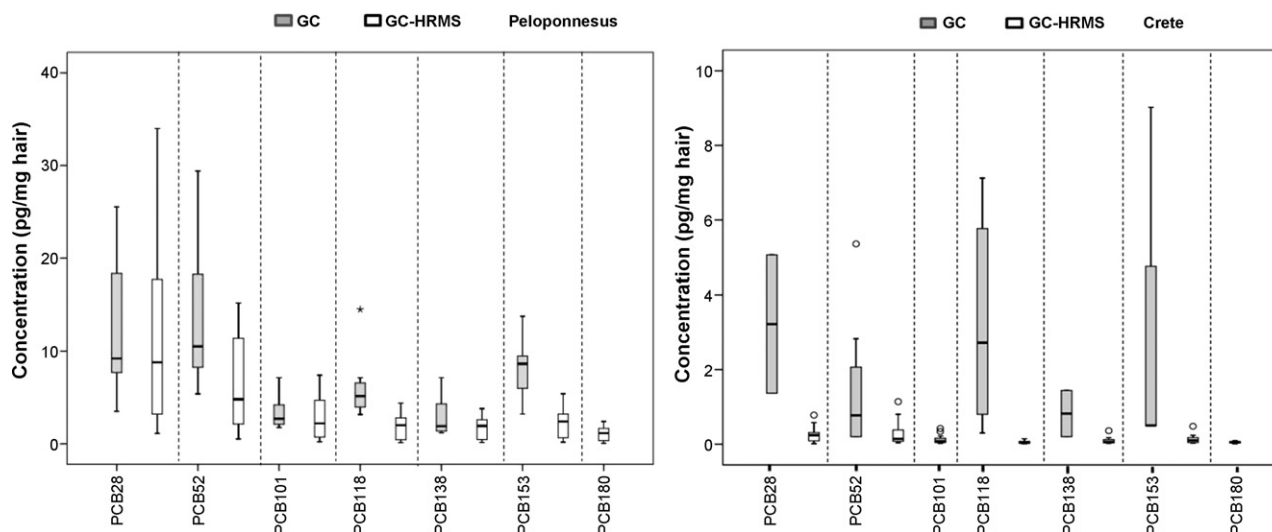


Fig. 1. Distribution of PCBs in Peloponnesus' (A1) and Cretan population (A2) measured by GC-DFHRMS and GC-MS.

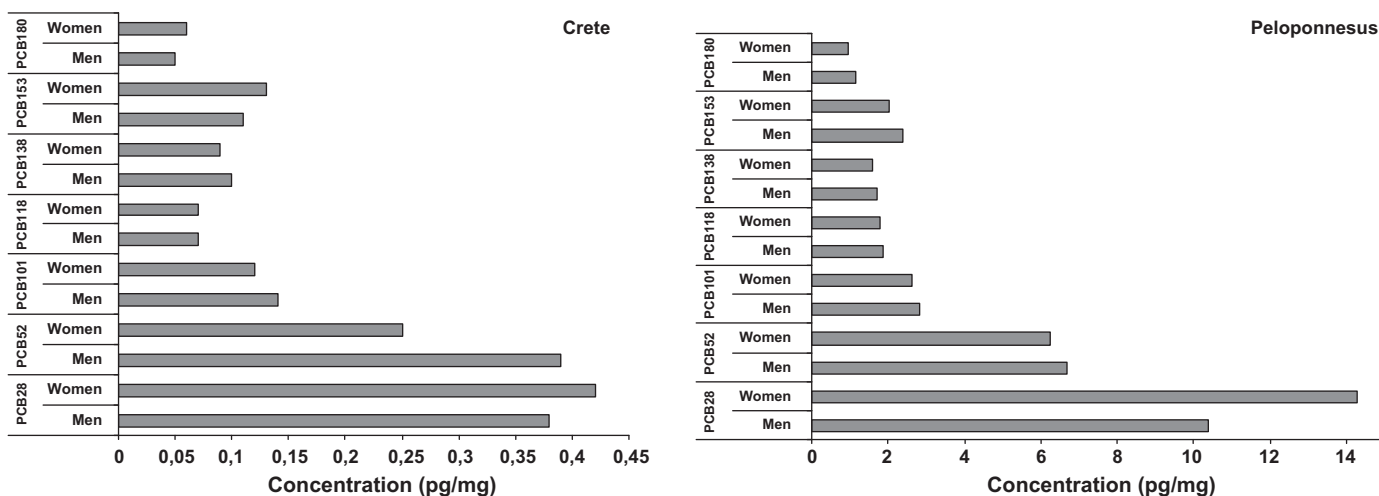


Fig. 2. Distribution of PCBs concentrations between women and men for Cretan and Peloponnesus' population measured by GC-DFHRMS.

Table 4

The % mean contributions, standard deviation (SD), minimum and maximum contribution of each individual PCB congener to total PCBs burden.

	Contribution (%)	SD (%)	Minimum	Maximum
<i>Crete</i>				
PCB 28	33.2	12.5	12.0	56.5
PCB 52	21.4	7.8	9.9	39.6
PCB 101	11.2	4.0	5.8	20.8
PCB 118	6.0	2.1	2.6	10.0
PCB 138	10.0	5.1	3.4	26.0
PCB 153	10.4	9.7	6.3	44.0
PCB 180	7.8	6.1	2.2	27.6
<i>Peloponnesus</i>				
PCB 28	42.8	12.9	9.0	58.8
PCB 52	22.5	6.0	11.5	39.9
PCB 101	9.7	4.3	5.9	21.2
PCB 118	6.7	2.3	4.5	13.3
PCB 138	6.1	2.0	3.9	11.5
PCB 153	8.2	2.3	4.9	13.3
PCB 180	4.0	1.3	2.3	6.4

levels were significant higher in urban samples than rural children hair samples, but no significant differences were found between boys and girls (Zhang et al., 2007).

On the other hand, Covaci et al. (2008) provided significant differences between boys and girls in their study for most organochlorine contaminants (HCHs, DDTs and PCBs). All PCBs examined (PCB 180, 138, 153 and 118) expect PCB 170 were found significantly higher in girls hair samples compared to boys, with authors suggesting girls' longer hair being the source of a longer exposure period, which may include older pollution episodes.

Fig. 2 illustrates the profiles of each individual PCB congener provided by high resolution analysis for men and women subgroups, of both rural populations. Although, significant differences were observed in PCB concentrations between the two populations (Table 3), no significant differences ($p > 0.05$) were observed between women and men population subgroups for both regions.

7. Conclusion

During the last decades, hair analysis has been extensively used for biomonitoring of human exposure to xenobiotic agents. However, in the case of persistent organic pollutants the levels of

exposure are very low. The sensitivity of the analytical techniques is crucial for reliable monitoring results. The high percentage of PCBs positive samples, the low PCBs median values and the significant differences observed in the results, between examined regions obtained by GC–DFHRMS, can be explained by the higher sensitivity of the aforementioned technique, compared to low resolution GC–MS technique. The above findings indicate that GC–DFHRMS can provide more accurate and precise data for biomonitoring of environmental pollutants.

Our study demonstrates the need of a critical evaluation of the PCBs presented data (e.g. percentage of positive samples and PCBs concentrations found) in published studies due to the differences of the sensitivity of the applied analytical techniques in these studies.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgement

The study was funded by the grants of Toxicology Laboratory, University of Crete Research Committee ELKE UC n2600 and n2598.

References

- Altshul, L., Covaci, A., Hauser, R., 2004. The relationship between levels of PCBs and pesticides in human hair and blood: preliminary results. *Environ. Med.* 112 (11), 1193–1199.
- Aoki, Y., 2001. Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disruptors – what we have learned from Yusho disease. *Environ. Res.* 86 (1), 2–11.
- Atuma, S.S., Linder, C.E., Andersson, Ö., Bergh, A., Hansson, L., Wicklund-Glynn, A., 1996. CB153 as indicator for congener specific determination of PCBs in diverse fish species from Swedish waters. *Chemosphere* 33, 1459–1464.
- Behrooz, R.D., Esmaili-Sari, A., Ghasempouri, S.M., Bahramifar, N., Hosseini, S.M., 2009. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl in feathers of resident and migratory birds of South-West Iran. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56 (4), 803–810.
- Cochran, J.W., Frame, G.M., 1999. Recent developments in the high resolution gas chromatography of polychlorinated biphenyls. *J. Chromatogr. A* 843, 323–368.
- Covaci, A., Hura, C., Gheorghe, A., Neels, H., Dirtu, A.C., 2008. Organochlorine contaminants in hair of adolescents from Iassy, Romania. *Chemosphere* 72, 16–20.
- Covaci, A., Schepens, P., 2001. Chromatography aspects of the analysis of selected persistent organochlorine pollutants in human hair. *Chromatographia* 53, 366–371.
- Covaci, A., Tuttudaki, M., Tsatsakis, A.M., Schepens, P., 2002. Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants. *Chemosphere* 46, 413–418.
- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2008. Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *J. Appl. Toxicol.* 28, 561–578.
- De Voogt, P., Brinkman, U.A.T., 1989. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls. In: Kimbrough, Jensen (Eds.), *Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3–43.
1993. *Environmental Health Criteria*, No. 140. World Health Organisation (WHO), Geneva.
- Harkey, M.R., 1993. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci. Int.* 63 (1–3), 9–18.
- Harkins, D.K., Susten, A.S., 2003. Hair analysis: exploring the state of the sciences. *Environ. Health Perspect.* 111, 576–578.
- Hawker, D.W., Connell, D.W., 1988. Octanol–water partition coefficients of polychlorinated biphenyl congeners. *Environ. Sci. Technol.* 22, 382–387.
- Gill, U., Covaci, A., Ryan, J.J., 2004. Determination of persistent organohalogenated pollutants in human hair reference material (BCR 397): an interlaboratory study. *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 924–929.
- Jacobs, R.M., 1996. In: Chang, L.W. (Ed.), *Toxicology of Metals*. Lewis Publishers, New York, pp. 81–107.
- Jones, K.C., Voogt, P., 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environ. Pollut.* 100, 209–221.
- Jensen, S., 1966. Report of a new chemical hazard. *New Sci.* 32, 612.
- Kikura, R., Nakahara, Y., 1998. Studies on mechanism of drug incorporation into hair. *Bull. Nat. Inst. Health Sci.* 116, 30–45.
- Kousidou, O.Ch., Berdiaki, A., Kletsas, D., Zafiroopoulos, A., Theocharis, A.D., Tzanakakis, G.N., Karamanos, N.K., 2008. Estradiol-estrogen receptor: a key interplay of the expression of syndecan-2 and metalloproteinase-9 in breast cancer cells. *Mol. Oncol.* 2 (3), 223–232.
- Lundgren, K., Tysklind, M., Ishaq, R., Broman, D., Van Bavel, B., 2002. Polychlorinated naphthalene levels, distribution, and biomagnification in a benthic food chain in the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5005–5013.
- Matthews, H.B., Dedrick, R.L., 1984. Pharmacokinetics of PCB. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24, 85–103.
- Mitropoulou, T.N., Tzanakakis, G.N., Kletsas, D., Kalofonos, H.P., Karamanos, N.K., 2003. Letrozole as a potent inhibitor of cell proliferation and expression of metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) by human epithelial breast cancer cells. *Int. J. Cancer* 104 (2), 155–160.
- Miyabara, Y., Nishimura, N., Tohyama, C., 2005. Determination of dioxins in human hair: estimation of external and internal exposure to dioxins. *Environ. Health Prev. Med.* 10 (2), 86–93.
- Nakao, T., Aozasa, O., Ohta, S., Miyata, H., 2005. Survey of human exposure to PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs using hair as an indicator. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 124–130.
- Pragst, F., Balikova, M.A., 2006. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* 370, 17–49.
- Schramm, K.W., 1997. Hair: a matrix for non-invasive biomonitoring of organic chemicals in mammals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59 (3), 396–402.
- Schramm, K.W., Kuettner, T., Weber, S., Lutzke, K., 1992. Dioxin hair analysis as monitoring pool. *Chemosphere* 24, 351–358.
- Spearman, R.I.C., 1977. In: Jarrett, A. (Ed.), *The Physiology and Pathophysiology of the Skin*. Academic Press, London.
- Wania, F., Mackay, D., 1997. Global distillation. Our planet: the United Nations environment programme. *Mag. Environ. Sust. Dev.* 8, 15–16.
- Wicklund, G.A., Wolk, A., Aune, M., Atuma, S., Zettermark, S., Maehle-Schmid, M., Darnerud, P.O., Becker, W., Vessby, B., Adami, H.O., 2000. Serum concentrations of organochlorines in men: a search for markers of exposure. *Sci. Total Environ.* 263, 197–208.
- Wingfors, H., Lindström, G., Van Bavel, B., Schuhmacher, M., Hardell, L., 2000. Multivariate data evaluation of PCB and dioxin profiles in the general population in Sweden and Spain. *Chemosphere* 40, 1083–1088.
- Wong, M.H., Leung, A.O.W., Chan, J.K.Y., Choi, M.P.K., 2005. A review on the usage of POP pesticides in China with emphasis on DDT loadings in human milk. *Chemosphere* 60, 740–752.
- Wu, Y., Zhang, J., Zhou, Q., 1999. Persistent organochlorine residues in sediments from Chinese river/estuary systems. *Environ. Pollut.* 105 (1), 143–150.
- Zhang, H., Chai, Z.F., Sun, H.B., 2007. Human hair as a potential biomonitor for assessing persistent organic pollutants. *Environ. Int.* 33, 685–693.
- Zhao, G., Wang, Z., Dong, M.H., Rao, K., Luo, J., Wang, D., Zha, J., Huang, S., Xu, Y., Ma, M., 2008. PBBs, PBDEs and PVBs levels in hair of residents around e-waste disassembly sites in Zhejiang Province, China, and their potential sources. *Sci. Total Environ.* 397, 46–57.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T.C., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., Van Leeuwen, F.X.R., Liem, A.K.D., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775–792.
- Van den Berg, M., Sinnige, T.L., Tysklind, M., Bosveld, B.A.T.C., Huisman, M., Koopmans-Essenboom, C., Koppe, J.G., 1995. Individual PCBs as predictors for concentrations of non and mono-ortho PCBs in human milk. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2 (2), 73–82.

Rapid method for the simultaneous determination of DDTs and PCBs in hair of children by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (HSSPME/GC-MS)

Manolis N. Tzatzarakis, Emmanouil G. Barbounis, Matthaios P. Kavvalakis, Elena Vakonaki, Elisavet Renieri, Alexander I. Vardavas and Aristidis M. Tsatsakis*

The purpose of this study was to develop a rapid and cost efficient hair extraction method, using the headspace solid phase microextraction (HSSPME) technique for the simultaneous determination and biomonitoring of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane (DDT) and its isomers/metabolites and polychlorinated biphenyls (PCBs) in hair samples. A total of 72 head hair samples were collected from children living in urban and rural regions of the island of Crete. Two hundred milligrams of hair were digested under alkaline conditions and thermostated for 30 min at 90°C while a 65 µm PDMS/DVB fibre was exposed into the headspace of the vial. Analytical parameters of the method (time of incubation, agitation speed, recovery, precision, accuracy, carry over, matrix effect, linearity, and selectivity) were examined. Recoveries of the DDTs in the spiked hair samples were calculated from 42.3% for opDDD to 87.1% for opDDE, while recoveries for PCB congeners were from 52.6% for PCB138 to 96.6 % for PCB28. The method was applied for the analysis of authentic hair samples. Significant differences ($p=0.001$) of the burden to total DDTs (sumDDTs) as well as of the frequencies of detection of positive samples ($p=0.020$) were observed between the examined regions. Moreover, significant differences in the detected concentrations of PCB congeners were observed for PCB52 ($p<0.001$) and PCB28 ($p=0.017$) as well for their prevalence between urban and rural regions. Application of HSSPME for the biomonitoring of DDTs and PCBs biomarkers in hair was tested and successfully applied to the analysis of spiked and authentic hair samples. HSSPME was found to be substantially simpler and faster procedure than previous reported sample treatment procedures. Copyright © 2014 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: DDTs; PCBs; hair; biomonitoring; HSSPME; gas chromatography-mass spectrometry

Introduction

Human hair has mostly been used in forensic and clinical sciences.^[1–3] The idea of using human hair as an indicator in assessing exposure to persistent organic pollutants (POPs) has been advancing for the last two decades.^[4–9] One of the reasons for the late development of environmental biomonitoring using human hair as a matrix is the low detection limits which need to be achieved.

The first attempt to assess exposure to POPs in hair was for organochlorine substances; this was due to the great sensitivity and low detection limits achieved for these substances using an Electron Capture Detector (ECD) detector. Later, gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was employed for the detection and identification of POPs using, in most of cases, a low resolution single quadrupole MS detector.

The rapid development of technology and the use of highly advanced and expensive instruments such as tandem mass spectrometers (MS/MS), high resolution mass spectrometers (HR-MS) or double-focusing HR-MS (DFHR-MS) opened new horizons for the determination of POPs in hair matrix. The detection limits

achieved using DFHR-MS were 10 times lower than those achieved using low resolution mass spectroscopy (LR-MS). This means a bigger percentage of positive samples and lower mean values for organochlorine substances.^[6,10,11]

Due to the high cost of high-resolution instruments, researchers turned to the optimization of sample preparation techniques with a view to achieving lower detection limits at the same time as decreasing sample preparation time. One of the advances in the field of sample preparation was the use of solid phase microextraction (SPME) for extracting POPs from hair samples.^[9] SPME represents a substantial advance in terms of handling matrices, which contain low levels of target compounds and high concentrations of interfering substances.^[12] Arthur and Pawliszyn used SPME in 1990 as a solvent-free sampling technique that

* Correspondence to: Aristidis M. Tsatsakis, Head of Forensic Sciences and Toxicology Department, Medical School, University of Crete, 71003 Heraklion, Crete, PO Box 1393, Greece. E-mail: aris@med.uoc.gr

Center of Toxicology Science and Research, Medical School, University of Crete, Heraklion, Crete, Greece

reduces the steps of extraction, clean-up, and concentration to a unique step.^[13,14]

The SPME method utilizes a fused silica/fiber coated with a liquid or a solid polymer or a combination of both. The two most common SPME modes of absorption of the analytes on fibre take place either by direct immersion or by the head space approach (HSSPME). Application of the head space sampling allowed the SPME technique to be extended to more complex samples that contain solid or high molecular weight materials. The transfer of the analytes from the sample to the headspace is the time-limiting step and thus the extraction can be optimized by heating or stirring. Increasing the sampling temperature was found to have a significant effect on the extraction kinetics of the less volatile compounds.^[15,16]

PCBs and DDTs are some of the most known POPs. They are resistant to biological and chemical degradation and have long environmental half-lives.^[17] PCBs are highly lipophilic, thermally stable, and low flammable compounds^[18] while their degree of lipophilicity increases with increasing chlorination. Since over 100 PCBs have been identified and the analysis of all of them is almost impossible and not cost effective; the most abundant PCB congeners (PCB28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) usually are monitored to assess environmental exposure.^[19] On the other hand, DDT is a very effective organochlorine insecticide. It is slowly metabolized to DDE and DDD metabolites (which have similar physical and chemical properties to DDT), both of which are stored in the fatty tissues.^[8,20]

Both DDTs and PCBs accumulate in the food chain, in human and animal tissues.^[21] As a result, they have potential significant impact on human health and the environment. Since PCBs and DDTs are no longer metabolized or excreted in hair, their quantification could be a biomarker for possible long-time exposure to these pollutants. As has been reported, a ratio of ppDDE/ppDDT lower than 5 indicates recent exposure to parent DDT.^[22]

The biomonitoring of DDTs and PCBs for the estimation of human exposure requires complex sample preparation and analytical procedures using sensitive state-of-the-art instrumentation to achieve the desired selectivity and quantification limits. To our knowledge, the first attempt to use SPME in hair was by Salquebre *et al.*^[9] by testing protocols involving both direct and headspace approaches to analyze pesticides. In that work, a previous overnight sample preparation was necessary for both protocols.

The purpose of this study was to develop a one-step hair-extraction method, using the HSSPME technique, for the simultaneous determination and biomonitoring of DDTs and PCBs in hair samples.

Materials and method

Sample collection and storage

Hair sampling was scheduled and performed by the staff of the Laboratory of Toxicology and Forensic Sciences, Department of Medicine, University of Crete. The sampling target group was children from urban and rural regions of the island of Crete, in southern Greece. A total of 72 hair samples were collected during 2009–2012 from pre-school and elementary school aged children (4.5 to 12 years old). Fifteen (15) samples were collected from the urban region of Heraklion and 28 and 29 samples were collected from two rural regions (rural A and rural B) close to the city of Heraklion. The sample included 43 females (59.7% of total sample).

Questionnaires were completed that included information about personal details of the individual (gender, weight, and age) and information concerning their personal habits, profession of parents, and their possible association with exposure to pesticides. Parents of the participants were informed about the aim of the study and provided their consent. All hair samples were placed in a paper envelope and kept in the dark at room temperature.

Reagent and materials

The organochlorines opDDD, ppDDD, opDDE, ppDDE, opDDT, and ppDDT were obtained from Chem Service (West Chester, PA, USA). Sodium hydroxide was obtained from Merck, D-6100 (Darmstadt, Germany). The 1,2,3,4-tetrachloronaphthalene (TCN) was purchased from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). PCB congeners (28, 52, 101, and 138) and sodium chloride were purchased from Fluka Analytical-Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Ultrapure water was obtained by a Direct-Q 3UV water purification system (Merck, Germany).

Stock solutions of each organochlorine and PCB congener individually were prepared in hexane at a concentration level of 100 ppm. Mixed working solutions of PCB congeners and DDTs were prepared at concentrations 10, 1.0, 0.1, and 0.01 ppm and used for the preparation of the spike hair. All solutions were stored at -20°C.

Sample pretreatment - HSSPME procedure

Approximately 200 mg of hair was washed twice with 5 mL water and once with 5 mL of hexane and dried in an oven set to 40°C and then placed in 8 mL SPME vials. Two (2) mL of NaOH 10 M, 1 mL of ultrapure water, 0.6 gr of NaCl, and 10 ng of TCN [used as an internal standard (IS)] were added. SPME vials were sealed with PTFE/silicon septum caps and placed in the GS-MS tray. Online extraction followed with a PDMS/DVB type extraction fibre at 90°C for 30 min with an agitation speed at 250 rpm.

Whilst the digestion the hair sample was performed, the fibre was dipped in the headspace phase of the sample in order to selectively absorb the chosen substances resulting from the change of the liquid phase to the gas phase. After the absorption process finished, the fibre tip was inserted in the injection port of the GC-MS, where it remained for 3 min until the complete release of the substances.

Instrumentation

Samples were analyzed with a Shimadzu (Kyoto, Japan) QP-2010 GC-MS instrument. The system was equipped with a split/splitless injection inlet, electronic pressure control AFC and an AOC-5000 robotic autosampler with the appropriate functions to operate in SPME mode. GC-MS solution software was used for instrument control and data analysis. GC analysis was conducted on a Supelco Analytical SLBtm-5 ms (Bellefonte, PA, USA) capillary column of 30 m length, 0.25 mm i.d, 0.25 µm film thickness. The AOC-5000 SPME autosampler was equipped with syringe with a 65 µm PDMS/DVB Metal Alloy fibre from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

The following conditions were used: Helium with a constant flow rate of 1 mL/min as a carrier gas, inlet temperature 270°C, splitless injection for 1 min, MS interface temperature 310°C, ion source temperature 230°C. The column temperature was initially held at 60°C for 3 min, raised at 15°C/min to 180°C and held for

1 min. Then there was a gradual increase at a rate of 4°C/min until 250°C and finally at a rate of 30°C it reached 300°C where it remained for 1 min.

The MS detector was operated at the selected ion-monitoring mode (SIM). The qualification m/z ions (Q1 and Q2), the target m/z ion (quantitative ion) and the retention times of each PCB congener and DDTs are listed in Table 1. A typical chromatogram of spiked sample, standards solutions, and authentic sample was presented in Figure 1.

Spiked human samples

Human hair samples with no detected levels of DDTs or PCBs or levels below the LOQ values were used as blank hair. Hair samples were washed as described above and pooled. The pooling samples that provide no detectable levels of the analytes was spiked at different concentrations 0, 2.5, 5, 10, 25, and 50 pg/mg for DDTs and 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 pg/mg for PCBs and then analyzed for the preparation of the spiked calibration curves, as well as for the validation of the method.

Table 1. Analytical parameters of analytes

Analytes	Rt (min)	target m/z	Q1 m/z	Q2 m/z	Standard curves r^2	Mean % error	Spiked curves r^2	Mean % error	Mean recovery (pg/mg) %	LOD (pg/mg)	LOQ (pg/mg)	Accuracy %	Inter-days precision (% RSD)
PCB28	19.26	256	186	150	0.9952	-0.4	0.9905	8.1	96.6	0.06	0.21	118.7	17.5
PCB52	20.54	292	220	255	0.9955	-0.6	0.9872	11.3	82.5	0.09	0.29	99.9	21.8
PCB101	24.05	326	256	290	0.9950	7.9	0.9932	-0.5	59.9	0.04	0.12	98.8	18.2
PCB138	28.82	360	218	290	0.9840	9.9	0.9987	2.8	52.6	0.11	0.36	100.1	12.5
opDDE	23.84	246	318	176	0.9957	-3.7	0.9992	3.5	87.1	0.27	0.89	96.2	17.0
ppDDE	25.25	246	318	176	0.9913	1.7	0.9903	12.2	68.6	0.29	0.96	92.3	8.5
opDDD	25.58	235	165	199	0.9948	-0.8	0.9944	-17.4	42.3	0.51	1.71	104.1	14.6
ppDDD+opDDT	27.19	235	165	199	0.9947	4.0	0.9834	10.1	66.9	1.50	5.00	102.3	10.5
ppDDT	28.63	235	165	199	0.9999	-0.9	0.9994	20.8	61.3	2.14	7.14	87.3	21.9
IS	21.1	266	194	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Q1 and Q2: m/z quantification ions.

Standard curves: curves of standards mix solutions of PCBs and DDTs.

Spiked curves: curves of blank hair sample spiked with known amount of each PCB and DDT.

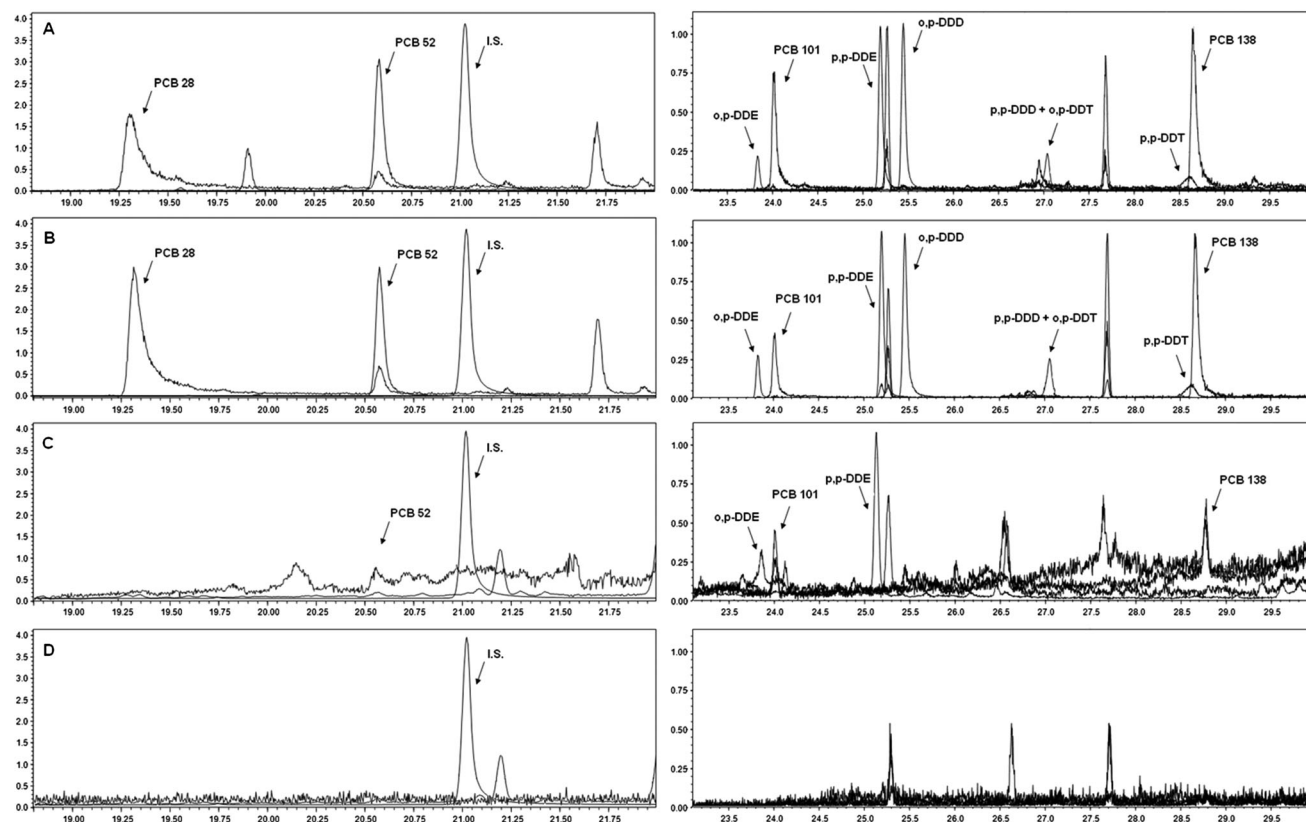


Figure 1. Typical chromatograms of (A) a mix standard solution of PCBs and DDTs, (B) spiked sample at concentration 1 and 10 pg/mg for PCBs and DDTs, respectively, (C) authentic hair sample positive for PCB 52, 101, and 138 and for op and ppDDE and (D) blank hair sample spiked only with IS.

Statistic analysis

Levels of DDTs and PCBs are expressed as mean (SD) and quartiles (1st, median, 3rd), while prevalence of positive samples ($>$ LOD) are expressed as counts and percentages. Differences in prevalence of positive samples are examined using Pearson's chi-square test. Differences in levels between areas are examined using non-parametric tests Mann-Whitney and Kruskal-Wallis. Bar charts and error plots are used for graphical representation of data. IBM SPSS Statistics 20.0 was used for data analysis and a level of 0.050 was set as significant. For the calculation of the mean and median concentrations all negative samples ($<$ LOD) were set as LOD/2.

Results

Method evaluation

The HSPME/GC-MS method was validated by evaluating the parameters of agitation speed, incubation time, recovery, linearity, carry over, specificity, matrix effect, accuracy, and precision.

Linearity and limits of quantification and detection

Both standard and spiked curves were prepared using the ratio of the area of each analyte to area of IS. The instrument response obtained from the analysis of working solutions were linear with $r^2 > 0.98$ for all analytes at the concentration range from 0 to 1 ng/mL for both DDTs and PCBs (Table 1). Spiked curves were constructed by analyzing spiked hair samples at concentrations ranging from 0 to 50 pg/mg for DDTs and from 0 to 10 pg/mg for PCB congeners. All spiked curves had an $r^2 > 0.99$, except for the curve of PCB52 ($r^2 = 0.9872$) and ppDDD+opDDT ($r^2 = 0.9834$) (Table 1). Statistical test for the linearity of the curves was applied (using Excel) and presented as % error of the curve. For standard curves the mean % error was -3.7, 1.7, -0.8, 4.0, and -0.9 % for opDDE, pDDE, opDDD, ppDDD+opDDT, and ppDDT, respectively, and for PCB28, PCB52, PCB101 and PCB138 was -0.4, -0.6, 7.9 and 9.9%, respectively, for the concentration range 0.1 to 1 ng/mL. For spiked curves the respectively values (% error) were 3.5, 12.2, -17.4, 10.1, and 20.8 for opDDE, ppDDE, opDDD, ppDDD+opDDT and ppDDT, respectively, and 8.1, 11.3, -0.50, 2.8 for PCBs for spiked levels 2.5 to 50 pg/mg and 0.5 to 10 pg/mg, respectively (Table 1).

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated by analyzing the lowest spiked level for both PCBs and DDTs and defined as the peaks that gave a signal-to-noise ratio > 3 for LOD and > 10 for LOQ. The LOD values ranged from 0.04 to 0.11 pg/mg for PCBs congeners and from 0.27 to 2.14 pg/mg for DDTs (Table 1). The lowest LOQ value for PCB congeners was observed for PCB101 (0.12 pg/mg) followed by PCB28, PCB52, and finally PCB138 (0.21, 0.29 and 0.36 pg/mg, respectively). For DDTs, the LOQ values were 0.89, 0.96, 1.71, 5.00 and 7.14 pg/mg for opDDE, ppDDE, opDDD, ppDDD+opDDT, and ppDDT, respectively.

Precision, recoveries and accuracy

The inter-day precision (analysis at three consecutive working days) was evaluated at levels 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, and 50.0 pg/mg for DDTs and at 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 pg/mg for PCBs and estimated to be lower than 22% for all PCBs and DDTs. The precision values (expressed as % relative standard deviation, %RSD) for each analyte are presented in Table 1.

The recovery of the method was performed on spiked blank hair samples at concentration levels of 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, and 10.0 pg/mg for PCB congeners and of 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, and 50.0 pg/mg for

DDTs. The mean recovery for PCB28 was 96.6% at the above spiked concentrations, for PCB 52 it was 82.5%, for PCB101 59.9% and for PCB138 52.6% (Table 1). The mean recoveries for DDTs varied from 87.1% for opDDE to 42.3% for opDDD (Table 1).

The accuracy of the method was calculated in three spiked levels 10, 25, and 50 pg/mg for DDTs and the mean accuracy (%) values were 96.2%, 92.3%, 104.1%, 102.3%, and 87.3% for opDDE, ppDDE, opDDD, ppDDD+opDDT, and ppDDT, respectively. The mean % accuracy for PCB28, PCB52, PCB101, and PCB138 were 118.7%, 99.9%, 98.8, and 100.1 % respectively, at concentration levels 0.2, 0.5, 1.0, and 2.0 pg/mg.

Matrix effect, carry over, and selectivity

The matrix effect was evaluated by comparing mix standard solution ($n=3$) of the analytes to spiked blank hair sample at concentration level 2 pg/mg for PCBs and 10 pg/mg for DDTs ($n=3$). In all solutions or spiked samples 10 ng of IS was added. The matrix effect was evaluated and expressed as % mean value and for PCB28, PCB52, PCB101 and PCB138 were 25.3%, 14.4%, 10.3% and 4.3%. For opDDE, ppDDE, opDDD, ppDDD+opDDT and ppDDT were 25.1, 14.5, 1.0, 7.0, and 59.5 %, respectively. The matrix effect % value for the IS was 8.7%.

Lack of carry over was demonstrated analysing blank sample after of three consecutive analysis of hair samples spiked with PCB congeners at level of 10 pg/mg and DDTs at level 50 pg/mg ($n=3$). To investigate the selectivity of the method, pooling blank hair containing no analytes was analyzed. No interference of other compound or endogenous compound with the PCB or DDT analytes was observed (chromatogram D, Figure 1).

Incubation time and agitation speed study

The effect of incubation time on the detected levels of the analytes was performed in blank hair spiked with 2 pg/mg of each PCB congener and with 10 pg/mg for each DDT. Then the spiked hair was incubated at 90°C for 30, 35, and 45 min and the area of each analyte was recorded. The results are shown in Figure 2A.

A slight decrease in the detected areas of the sumDDTs (sum areas of DDTs) was observed increasing the incubation time. The same tendency was also noticed for sumPCBs (sum areas of PCBs). Nevertheless, individually, for PCB28 and PCB52 an increase of their area (37% and 36% for PCB 28 and 21% and 32% for PCB 52) was noticed by increasing the incubation time to 35 and 45 min, respectively. The opposite was found for PCB101 and PCB138 (a decrease of the detected area at -41% and -50% for PCB101 and at -56% and -74% for PCB138) by increasing the incubation time to 35 and 45 min. Based on these results and in order to develop a time effective method, we chose a 30 min incubation time for authentic hair.

The effect of agitation was also studied at three speed levels (0, 250, and 350 rpm). The results are shown in Figure 2B. PCB congeners' sum areas seem not to be affected by agitation speed in contrast to those of DDTs for which a slight decrease in the sum areas was observed when the agitation speed was increased (from 0 to 350 rpm). Based on the previous observed finding, we chose an agitation speed of 250 rpm for better homogenization of the hair matrix in the alkaline solution during the incubation step.

Biomonitoring of PCBs in hair samples

The percentages of positive hair for PCBs are shown in Table 2 and Figure 3A. There is a significant difference in positive detected samples for PCB52 between urban and rural regions ($p < 0.001$). Samples from rural A and rural B have a high prevalence of 82.1% and 82.8%, respectively, compared to the urban

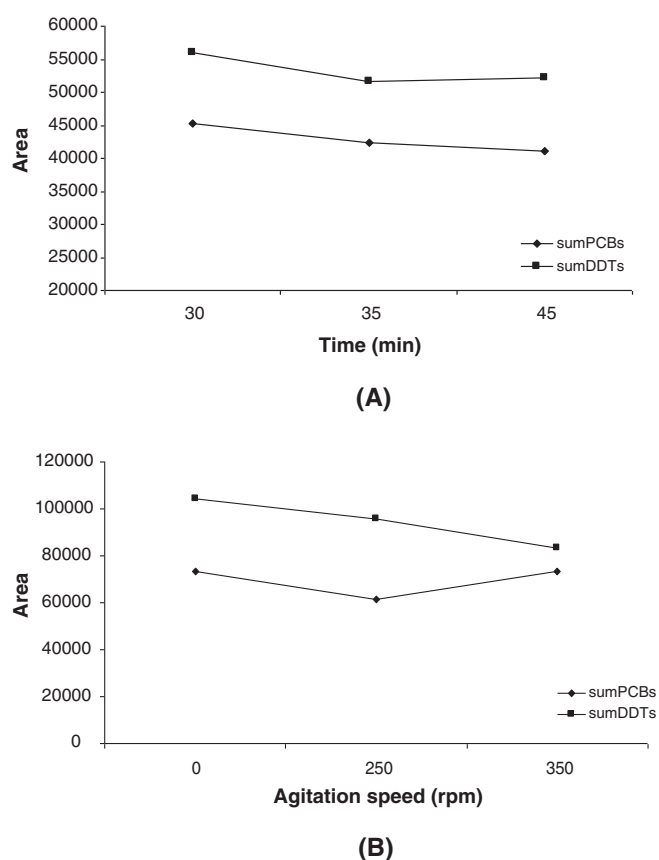


Figure 2. Influence of incubation time (min) (A) and agitation speed (rpm) (B) on the detected area of PCB congeners and DDTs using the HSSPME techniques.

region (13.3%) for PCB52. A higher prevalence was also observed for PCB28 for rural A (75.0%) and for rural B (75.9%) region in comparison with the urban region (46.7%) ($p=0.031$). No significant association was observed on the prevalence of PCB101 ($p=0.817$) and PCB138 ($p=0.647$) (Table 2) between the examined regions. According to the detected concentrations of each PCB congeners, statistical differences exist between the examined regions for PCB28 ($p=0.040$ for all regions and $p=0.017$ between rural and urban regions) and for PCB52 ($p<0.001$) for all regions. No significant statistical differences were observed for PCB101 and PCB138 (Table 2). The mean \pm SD and the median values of PCBs concentrations are shown in Table 2. The median values of PCB28 range from 0.03 to 0.73 pg/mg, for PCB52 from 0.05 to 0.43 pg/mg, for PCB101 and PCB138 0.02 and 0.06 pg/mg for all regions, respectively.

Biomonitoring of DDTs in hair samples

In Table 3, the prevalence of DDT metabolites and the detected mean and media concentrations per region are shown. The majority of the samples were found positive for at least one organochlorine pollutant. The compounds which appeared more frequently were ppDDE and opDDE. ppDDE prevalence is 100% in the rural A region and 96.6% in the rural B region, significantly higher ($p=0.027$) than the urban region prevalence (80.0%) (Table 3). Statistical differences in the percentage of positive samples between rural and urban regions were also observed for opDDE ($p=0.045$), opDDD ($p=0.016$) and sumDDTs ($p=0.027$)

(Table 3, Figure 3B). Moreover, significant differences of the burden to total DDTs (sumDDTs) ($p=0.001$) were observed in the examined regions. Statistical differences were also recorded for ppDDE ($p=0.040$) and for opDDD ($p=0.020$).

Discussion

In this study, we developed a fast, cost efficient, and precise method for the simultaneous detection and determination of PCBs and DDTs in hair samples using an HSSPME/GC-MS analytical technique. The presented method is simpler and faster than previously reported methods,^[6,8] since there is no requirement of any time-consuming matrix pretreatment (e.g. overnight incubation, SPE clean-up step, or ultrasonic extraction). The only step that we adopted from the previously reported methods was the decontamination step for the removal of possible external contaminants.

Children (residents of three different regions of Crete, Greece) were selected as subjects in this study as aforementioned, and hair analysis was performed in order to assess the total burden to PCBs and DDTs. The selection of this population group was based on the estimation of low exposure (past and present) of the children to the targeted pollutants, since the island of Crete is an area with low industrial activity. The only possible source of contamination, mainly for DDTs, could be the extensive past agriculture activity or dietary habits.

The PCB28 and PCB52 congeners were more frequently detected compared to the congeners PCB101 and PCB138. Specifically, for PCB28 detection rates were 46.7% for the urban area, 75.0% for rural area A, and 75.9% for rural area B (in total, 69.4% of all investigated samples were positive for PCB28). For PCB52 detection rates were also relatively high, with detection rates ranging from 13.3% (for the urban area) to 82.8% (for rural area B), while 68.1% of all the investigated samples were positive for this congener. The percentiles of detection for PCB101 and PCB138 were much lower, ranging from 13.3% (PCB138, urban area) to 28.6% (PCB101, rural area A) (Table 2). Significant differences of the % positive samples were observed for PCB28 ($p=0.031$) and PCB52 ($p<0.001$) between urban and rural areas, while for all regions significant differences were observed only for PCB52 ($p<0.001$).

The fact that the PCB28 and PCB52 were detected at higher rates makes these isomers more suitable biomarkers for assessing the health impact on children from these specific environmental pollutants. Significant differences were only observed in the measured levels of PCB28 ($p=0.040$) and PCB52 ($p<0.001$) per region and per urban/rural classification ($p=0.017$ and $p<0.001$, respectively). Based on the literature,^[5,23–26] variations have been noticed amongst population groups from various regions that have different industrial development as aforementioned pollutants are considered to originate mainly from industrial factories or areas.^[5] Therefore, because the chosen areas of this study had no such industrial development, there are insufficient results, especially for PCB101 and PCB138, and the detection rates were relatively lower than the corresponding rates in the literature. Nonetheless, in a previous study^[6] where subjects from similar population groups were examined, the positive % samples for PCB28, 52, 101, and 138 were lower (9.5%, 85.7%, 0%, and 9.5%, respectively) than the reported detection rates in the present study. Therefore, the lower detection limits of the proposed method provided higher detection rates for PCBs, even in non-exposed subjects.

Table 2. Mean, median values, and frequencies (%) of positive samples of PCB congeners in urban and rural regions of Crete

	Region	% positive	p-all regions*	p (urban-rural)*	Mean (pg/mg)	±SD	Median (pg/mg)	Min-Max (pg/mg)	p-all regions**	p (urban-rural)***
PCB28	Urban	46.7	0.098	0.031	3.7	13.1	0.03	LOQ -50.9	0.040	0.017
	Rural A	75.0			2.3	4.5	0.73	LOQ -22.5		
	Rural B	75.9			0.8	0.9	0.53	LOQ -3.7		
	Total	69.4			2.0	6.6	0.50	LOQ -50.9		
PCB52	Urban	13.3	<0.001	<0.001	0.1	0.1	0.05	LOQ -0.4	<0.001	<0.001
	Rural A	82.1			0.7	0.8	0.43	LOQ -3.3		
	Rural B	82.8			0.6	0.9	0.29	LOQ -2.8		
	Total	68.1			0.6	0.8	0.20	LOQ -3.3		
PCB101	Urban	20.0	0.817	0.528	5.4	13.7	0.02	LOQ -51.3	0.826	0.561
	Rural A	28.6			8.6	20.3	0.02	LOQ -93.8		
	Rural B	27.6			5.5	13.2	0.02	LOQ -62.8		
	Total	26.4			6.7	0.02	0.02	LOQ -93.8		
PCB138	Urban	13.3	0.647	0.352	1.3	3.6	0.06	LOQ -13.1	0.725	0.435
	Rural A	25.0			1.8	4.2	0.06	LOQ -17.2		
	Rural B	24.1			1.8	6.2	0.06	LOQ -33.0		
	Total	22.2			1.7	4.9	0.06	LOQ -33.0		

* *p*-values for percentages were resulted from Pearson's chi-square tests *p*-values for imputed concentration were resulted from.

** Kruskal-Wallis.

*** Mann-Whitney tests.

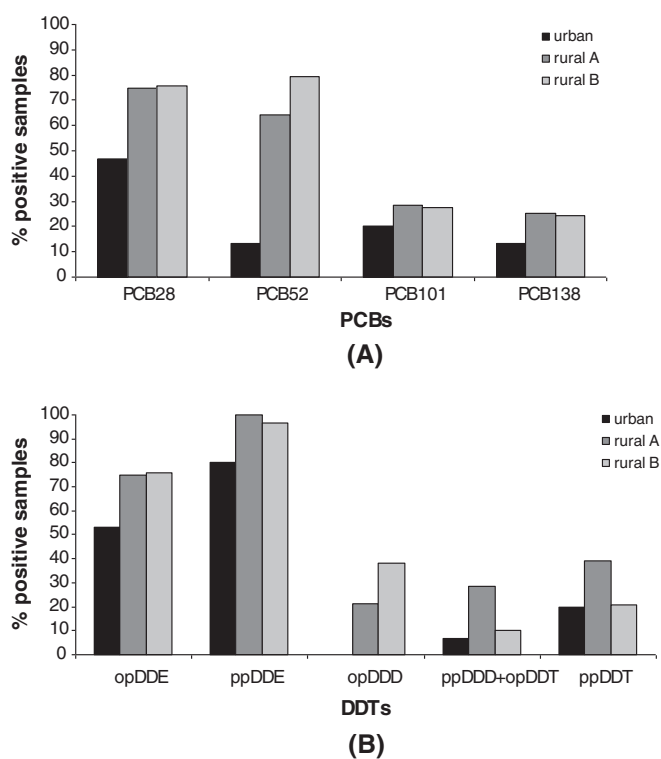


Figure 3. Prevalence of PCB congeners (A) and DDTs (B) in head hair samples collected from urban or rural population of Crete.

The median detected concentration of sumDDTs in rural region A participants' hair was higher (11.7 pg/mg) than urban and rural B regions region participants' samples (4.7 and 4.6 pg/mg, respectively). The majority of hair samples analyzed were positive for DDTs. Specifically 94.4% of hair samples were positive

for at least one of the examined DDTs (Table 3). Samples from rural area A were 100% positive for sumDDTs and samples from rural area B were positive by 96.6%. Even for the urban area the detection rates were 80.0%. The organochlorine pollutants with the higher detection rates were ppDDE (94.4%) and opDDE (73.6%), which are considered to be metabolites of DDT. The opDDD, ppDDD+opDDT and ppDDT compounds were detected in lower detection rates for all investigated areas. Briefly, the detection rates for these compounds ranged from 0% (opDDD, urban area) to 39.3% (ppDDT, rural area A). Moreover, significant differences were observed in detection rates for opDDE ($p=0.045$), ppDDE ($p=0.027$), opDDD (0.016) and sumDDTs (0.027) per urban/rural classification, while per region significant differences were observed for ppDDE ($p=0.020$), opDDD ($p=0.018$) and sumDDTs ($p=0.020$) (Table 3). These differentiations of the detected positive rate from region to region are probably due to its past agricultural activities, which are mainly crops in greenhouses or open cultivations. Although, DDT has been banned for the last few decades in Greece, the observed differences on the rate of positive samples can be justified by its extensive use in the past. That, in combination with the residue activity from the use of DDTs and its long half-life once it enters living organisms, can justify such variations in the results. Detection rates for sumDDTs of the current study are similar to most of the reported rates in the existing literature^[7,23,24] or higher compared to previously published data,^[8] where similar population groups were also investigated for DDTs levels. This may also be attributed to the lower detection limits for DDTs that the proposed method provides.

To our knowledge, this is the very first attempt for the simultaneous detection of the aforementioned analytes using the technique of SMPE/GC-MS. The only study close to ours was that of Salquebre *et al.*,^[9] where a simultaneous detection and quantification method for 22 pesticides was presented using SPME/GC-MS/MS. Amongst these 22 pesticides, DDTs were also included

Table 3. Mean, median values and frequencies (%) of positive samples of DDTs in urban and rural regions of Crete

		% positive	p-all regions*	p (urban-rural)*	Mean (pg/mg)	SD	Median (pg/mg)	Min-Max	p-all regions**	p (urban-rural)***
opDDE	Urban	53.3	0.116	0.045	0.8	0.9	0.54	LOQ-2.9	0.111	0.168
	Rural A	82.1			2.3	4.3	0.98	LOQ -22.5		
	Rural B	75.9			2.7	5.7	0.69	LOQ -23.5		
	Total	73.6			2.1	4.5	0.7	LOQ -23.5		
ppDDE	Urban	80.0	0.020	0.027	2.2	2.2	1.43	LOQ -7.6	0.040	0.081
	Rural A	100.0			8.6	15.2	3.57	1.0-65.3		
	Rural B	96.6			6.3	16.2	1.18	LOQ -68.0		
	Total	94.4			6.4	14.1	1.6	LOQ -68.0		
opDDD	Urban	0.0	0.018	0.016	0.3	-	-	-	0.020	0.018
	Rural A	21.4			2.4	7.7	0.26	LOQ -41.2		
	Rural B	37.9			4.6	10	0.26	LOQ -38.6		
	Total	23.6			2.8	8.1	0.3	LOQ -41.2		
ppDDD+opDDT	Urban	6.7	0.092	0.243	0.9	0.4	0.75	LOQ -2.4	0.100	0.204
	Rural A	28.6			4.7	10.5	0.75	LOQ -41.8		
	Rural B	10.3			2.8	6.4	0.75	LOQ -26.7		
	Total	16.7			3.1	7.7	0.8	LOQ -41.8		
ppDDT	Urban	20.0	0.220	0.450	2.2	2.7	1.1	LOQ -9.6	0.189	0.394
	Rural A	39.3			4.5	5.6	1.1	LOQ -25.5		
	Rural B	20.7			4	9	1.1	LOQ -39.2		
	Total	27.8			3.8	6.8	1.1	LOQ -39.2		
SumDDTs	Urban	80.0	0.020	0.027	6.3	3.9	4.7	LOQ -13.2	0.001	0.021
	Rural A	100.0			22.4	32.6	11.7	3.9-161.9		
	Rural B	96.6			20.5	44.8	4.6	LOQ -189.3		
	Total	94.4			20.5	44.8	4.6	LOQ -189.3		

* p-values for percentages were resulted from Pearson's chi-square tests.

** p-values for imputed concentration were resulted from Kruskal-Wallis.

*** p-values for imputed concentration were resulted from Mann-Whitney tests.

and provided LODs from 0.02 pg/mg (for ppDDE) to 0.5 pg/mg (for ppDDT). Compared to our detection limits (Table 1), Salquebre *et al.* presented an even lower detection limit with the benefits of a more sensitive mass spectrometric system. On the other hand, we managed to combine a fast treatment method for hair with the HSSPME technique coupled with a simple GC-MS system and we achieved lower detection limits than previously reported for the same system^[6,8] for the aforementioned PCBs congeners and for DDTs (except ppDDT where detection limit was still relatively similar). Summarizing, we have presented a cost-effective and low time-consuming method for the simultaneous detection and quantification of PCBs and DDTs in hair, using SPME combined with a simple GC-MS.

Conclusion

Our proposed method includes a rapid HSSPME technique, performed at high temperature (90°C), in alkaline ambient, which allowed particularly low LODs to be achieved and satisfactory validation parameters for all compounds analyzed. The low cost and low time-consumption of the presented method render it very suitable for biomonitoring.

Acknowledgement

The authors thank Stivaktakis Polychronis, PhD, for his assistance in the preparation of the manuscript.

References

- [1] A.M. Tsatsakis, T. Psillakis, M.N. Tzatzarakis, H. Kourtopoulos, N. Paritsis. Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: a preliminary study. *Clin. Chim. Acta* **1997**, *263*, 187.
- [2] Y. Nakahara. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. *J. Chromatogr. B* **1999**, *733*, 161.
- [3] F. Pragst, M.A. Balikova. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta* **2006**, *370*, 17.
- [4] R.D. Behrooz, M. Barghi, N. Bahramifar, A. Esmaili-Sari. Organochlorine contaminants in the hair of Iranian pregnant women. *Chemosphere* **2012**, *86*, 235.
- [5] G. Zhao, Z. Wang, M.H. Dong, K. Rao, J. Luo, D. Wang, J. Zha, S. Huang, Y. Xu, M. Ma. PBBs, PBDEs, and PCBs levels in hair of residents around e-waste disassembly sites in Zhejiang Province, China, and their potential sources. *Sci. Total Environ.* **2008**, *397*, 46.
- [6] E.G. Barbounis, M.N. Tzatzarakis, A.K. Alegakis, A. Kokkinaki, N. Karamanos, A. Tsakalof, A.M. Tsatsakis. Assessment of PCBs exposure in human hair using double focusing high resolution mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Toxicol. Lett.* **2012**, *210*, 225.
- [7] A. Covaci, C. Hura, A. Gheorghe, H. Neels, A.C. Dirtu. Organochlorine contaminants in hair of adolescents from Iassy, Romania. *Chemosphere* **2008**, *72*, 16.
- [8] A.M. Tsatsakis, M.N. Tzatzarakis, M. Tutudaki. Pesticide levels in head hair samples of Cretan population as an indicator of present and past exposure. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *176*, 67.
- [9] G. Salquebre, C. Schummer, M. Millet, O. Briand, B.M.R. Appenzeller. Multi-class pesticide analysis in human hair by gas chromatography tandem (triple quadrupole) mass spectrometry with solid phase microextraction and liquid injection. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *710*, 65.

- [10] B. Wielgomas, W. Czarnowski, E.H.J.M. Jansen. Persistent organochlorine contaminants in hair samples of Northern Poland population, 1968-2009. *Chemosphere* **2012**, *8*, 975.
- [11] F. Perez, M. Llorca, M. Farre, D. Barcelo. Automated analysis of perfluorinated compounds in human hair and urine samples by turbulent flow chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 2369.
- [12] C. Schummer, G. Salquebre, O. Briand, M. Millet, B.M.R. Appenzeller. Determination of farm workers' exposure to pesticides by hair analysis. *Toxic. Lett.* **2012**, *210*, 203.
- [13] C.L. Arthur, J. Pawliszyn. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *J. Anal. Chem.* **1990**, *62*, 2145.
- [14] H. Lord, J. Pawliszyn. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 153.
- [15] T. Gorecki, J. Pawliszyn. Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction. Part 1. Theoretical considerations. *Analyst* **1997**, *122*, 1079.
- [16] T. Gorecki, A. Khaled, J. Pawliszyn. The effect of sample volume on quantitative analysis by solid phase microextraction. Part 2. Experimental verification. *Analyst* **1998**, *123*, 2819.
- [17] M.H. Wong, A.O.W. Leung, J.K.Y. Chan, M.P.K. Choi. A review on the usage of POP pesticides in China with emphasis on DDT loadings in human milk. *Chemosphere* **2005**, *60*, 740.
- [18] P. De Voogt, U.A.T. Brinkman. in Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products, (Eds: R.D. Kimbrough, A.A. Jensen), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands, **1989**, pp. 3-43.
- [19] M. Van den Berg, L. Birnbaum, A.T.C. Bosveld, B. Brunstrom, P. Cook, M. Feeley, J.P. Giesy, A. Hanberg, R. Hasegawa, S.W. Kennedy, T. Kubiak, J.C. Larsen, F.X.R. Van Leeuwen, A.K.D. Liem, C. Nolt, R.E. Peterson, L. Poellinger, S. Safe, D. Schrenk, D. Tillitt, M. Tysklind, M. Younes, F. Waern, T. Zacharewski. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106*, 775.
- [20] P.W.M. Augustijn-Beckers, A.G. Hornsby, R.D. Wauchope. The SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decision-making II. Additional Compounds. *Rev. Environ. Contamin. Tox.* **1994**, *137*, 1.
- [21] K. Lundgren, M. Tysklind, R. Ishaq, D. Broman, B. van Bavel. Polychlorinated naphthalene levels, distribution, and biomagnification in a benthic food chain in the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 5005.
- [22] K. Jaga, C. Dharmani. Global surveillance of DDT and DDE levels in human tissues. *Intern. J. Occup. Med. Environ. Health* **2003**, *16*, 7.
- [23] A. Covaci, P. Schepens. Chromatographic aspects of the analysis of selected persistent organochlorine pollutants in human hair. *Chromatographia* **2001**, *53*, S366.
- [24] A. Covaci, M. Tutudaki, A.M. Tsatsakis, P. Schepens. Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants. *Chemosphere* **2002**, *46*, 413.
- [25] W. Tirlir, G. Voto, M. Donega. PCDD/F and PCB levels in human hair. *Organohalogen Comp.* **2006**, *68*, 1659.
- [26] L. Altshul, A. Covaci, R. Hauser. The relationship between levels of PCBs and pesticides in human hair and blood: preliminary results. *Environ. Health Perspect.* **2004**, *112*, 1193.