

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ-ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**  
**ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ**  
**ΤΩΝ ΠΑΡΑΒΕΝΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΔΙΣΦΑΙΝΟΛΗΣ-Α ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΜΕ ΧΡΗΣΗ**  
**ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΔΙΔΥΜΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ**

**ΜΠΑΛΑΣΚΑ ΤΣΑΜΠΙΚΑ-ΕΙΡΗΝΗ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΣΤΕΦΑΝΟΥ ΕΥΡΙΠΙΔΗΣ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ, ΙΟΥΛΙΟΣ 2014**

**UNIVERSITY OF CRETE-DEPARTMENT OF CHEMISTRY**  
**MASTER OF SCIENCE DEGREE (M.Sc)**  
**ENVIRONMENTAL ANALYTICAL CHEMISTRY**  
**ENVIRONMENTAL CHEMICAL PROCESSES LABORATORY**

**METHOD DEVELOPMENT FOR THE DETERMINATION OF PARABENS  
AND BISPHENOL-A METABOLITES IN HUMAN URINE BY HIGH PRESSURE  
LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY**

**BALASKA TSABIKA-EIRINI**

**SUPERVISOR PROFESSOR: STEPHANOU EURIPIDES**

**HERAKLION, JULY 2014**

Στους γονείς μου,

***Μηνά και Καλλιόπη***

Επιβλέπων καθηγητής

**Ευριπίδης Στεφάνου**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής

**Ευριπίδης Στεφάνου**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Χαράλαμπος Κατερινόπουλος**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Σπυρίδων Περγαντής**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

## ***Ευχαριστίες***

Η παρούσα διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, στα πλαίσια του Γενικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Αναλυτική Χημεία Περιβάλλοντος», υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ευριπίδη Στεφάνου στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες για την ανάθεση της συγκεκριμένης διατριβής.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς μου επιτροπής, καθηγητές κ. Χ. Κατερινόπουλο και κ. Σ. Περγαντή για την συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τον Αντώνη Μυριδάκη για την πολύτιμη βοήθεια που μου έδωσε σε όλη τη διάρκεια της διατριβής καθώς και την Δρ. Καργάκη Σοφία για τις συμβουλές και την βοήθεια που μου παρείχε, στο πρόσωπο της οποίας βρήκα και μια καλή φίλη. Ευχαριστώ βαθύτατα τους Δρ. Μαρία Αποστολάκη και Δρ. Αντώνη Κουβαράκη για τις πολύτιμες γνώσεις και τις εύστοχες υποδείξεις που συνέβαλλαν σημαντικά στην λύση αρκετών προβλημάτων που συνάντησα στην πορεία μου μέσα στο εργαστήριο. Ιδιαίτερο ευχαριστώ στον Μηνά Ιακωβίδη και την Ιωάννα Κατσικαντάμη για την υπέροχη συνύπαρξη που είχαμε στο εργαστήριο όλο αυτό το διάστημα καθώς και για την στήριξη σε στιγμές πίεσης που πέρασα. Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου που συνέβαλλαν στο ευχάριστο κλίμα και ιδιαίτερα την Κατσακού Άλκηστη και την Γαλλιάκη Άννα που με στήριξαν σαν να με ήξεραν χρόνια και μου χάρισαν τη φιλία τους καθώς και τις Ρόδι Αθηνά και Μπούντα Διονυσία που γέμισαν με ζωντάνια το εργαστήριο.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, Μαναρωλάκη Έφη, Ακτουδιανάκη Κατερίνα, Νάζο Χάρη που ήταν δίπλα μου σε κάθε μου στιγμή προσωπική και επαγγελματική, σε κάθε αδυναμία και απογοήτευση, από το πρώτο έτος σπουδών και ελπίζω και για πάντα, καθώς χωρίς αυτούς τίποτα δεν είναι το ίδιο. Ακόμη την Έφη, την Ανδριάνα, την Ελένη και τον Λευτέρη που ήταν δίπλα μου ο καθένας με το δικό του τρόπο. Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω και τους φίλους μου από την Ρόδο, Ειρήνη, Μαρία, Αϊσέ και Κυριάκο.

Το μεγαλύτερο όμως ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου που χωρίς την βοήθεια και την στήριξη τους δεν θα είχα καταφέρει τίποτα. Είναι τα πιο σημαντικά πρόσωπα που υπάρχουν στη ζωή μου και το λιγότερο που μπορώ να κάνω για τους δείξω την ευγνωμοσύνη μου είναι να τους αφιερώσω την διατριβή αυτή.

## Περίληψη

Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες (Endocrine Disruptors, EDs) είναι ουσίες που διαταράσσουν την ομαλή λειτουργία του ορμονικού συστήματος των θηλαστικών. Οι επιστημονικές έρευνες των τελευταίων δεκαετιών κατέδειξαν πληθώρα χημικών ουσιών με ενδοκρινική δραστικότητα. Η έκθεση στους EDs λαμβάνει χώρα μέσω της δερματικής επαφής, της κατάποσης και της αναπνευστικής οδού. Ο άνθρωπος είναι περισσότερο ευάλωτος στις χημικές αυτές ουσίες κατά την εμβρυϊκή ζωή και την παιδική ηλικία.

Η Δισφαινόλη-A (Bisphenol-A, BPA), χρησιμοποιείται κυρίως ως πλαστικοποιητής, ενώ φαίνεται να προκαλεί σημαντικά προβλήματα υγείας λόγω της ενδοκρινικής της δραστικότητας. Αποβάλλεται δε, κυρίως μέσω των ούρων είτε με την γλουκουρονιδιομένη και την σουλφονιομένη της μορφή, είτε ως ελεύθερη. Τα παραβένια (Parabens, PBs) χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακοί παράγοντες. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν σημαντική τοξικότητα και έχουν συνδεθεί έντονα με τον καρκίνο του μαστού στους ανθρώπους. Έρευνες αποδεικνύουν ότι τα PBs εκκρίνονται στα ούρα στην αρχική τους μορφή, ως παρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ (para-hydroxy benzoic acid, PHBA) ή ως γλυκινικά, γλουκουρονικά και θειϊκά συζεύγματα. Το σύνολο των μεταβολιτών της BPA και των PBs αποτελούν βιοδείκτη έκθεσης (biomarkers).

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η τροποποίηση μιας υπάρχουσας αναλυτικής μεθόδου ανίχνευσης μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε ανθρώπινα ούρα, ώστε να καταστεί δυνατή και η ανίχνευση BPA και PBs σε αυτά. Δόθηκε έμφαση στον διαχωρισμό των δύο ισομερών του πρόπτυλοο-παραβενίου (PPB) και του βούτυλοο-παραβενίου (BPB). Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα ούρων που προήλθαν από 80 άντρες.

Η μέθοδος χρησιμοποιεί εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμό (HPLC-ESI-MS/MS). Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου ήταν από 0,04 ng/mL έως 0,13 ng/mL για τα PBs και 0,07 ng/mL για την BPA, οι ανακτήσεις

ήταν ικανοποιητικές, τα τυφλά δείγματα μηδενικά και η επαναληψιμότητα πολύ καλή.



## **Abstract**

Endocrine disruptors (EDs) can interfere with the hormone system in mammals. Scientific research has demonstrated many compounds which act as endocrine disruptors that have endocrine activity. Exposure to endocrine disruptors can occur through skin, ingestion and via the respiratory tract. People are more vulnerable to these chemicals, through fetal life and childhood.

Bisphenol-A (BPA), is used mainly as plasticizers and it has been associated with some problems due to its endocrine activity. It is excreted in urine unmetabolized or as its glucuronide and the sulphate conjugates. Parabens (PBs), are used as antimicrobial agents. These compounds exhibit toxicity and they are linked with breast cancer in humans. Studies determine that they are excreted in urine in their original form, as a para-hydroxy-benzoic acid (PHBA) or as its glycine, glucuronic and sulfate conjugates. The total metabolites of BPA and PBs are biomarkers of the exposure to these chemicals.

The aim of this study is the modification of an existing analytical method for the determination of phthalate metabolites in human urine, in order to also detect BPA and PBs. Emphasis was given to the separation of the two isomers of propyl paraben (PPB) and butyl paraben (BPB). The method was applied to real urine samples, obtained from 80 men.

The applied method uses solid phase extraction (SPE) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry with electrospray ionization source (HPLC-ESI-MS/MS). The method detection limits were from 0,04 ng/mL to 0,13 ng/mL for PBs and 0,07 ng/mL for BPA, the recoveries were satisfactory, blanks were zeros and the repeatability was very good.

## Περιεχόμενα

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Θεωρητικό μέρος.....  | 21 |
| 1.1.   | Εισαγωγή.....   | 21 |
| 1.2.   | Δισφαινόλη-A.....   | 23 |
| 1.2.1. | Δομή και Φυσικοχημικές Ιδιότητες της Δισφαινόλης-A.....             | 23 |
| 1.2.2. | Παραγωγή και χρήσεις της BPA.....                                   | 24 |
| 1.2.3. | Πηγές έκθεσης BPA.....  | 27 |
| 1.2.4. | Μεταβολισμός της BPA.....   | 29 |
| 1.2.5. | Επιδράσεις της BPA στην Υγεία.....                                  | 31 |
| 1.2.6. | Εναλλακτικές λύσεις.....  | 33 |
| 1.3.   | Παραβένια.....  | 34 |
| 1.3.1. | Δομή και Φυσικοχημικές ιδιότητες των Παραβενίων.....                | 34 |
| 1.3.2. | Παραγωγή και Χρήσεις PBs.....                                       | 35 |
| 1.3.3. | Έκθεση στα PBs.....   | 37 |
| 1.3.4. | Μεταβολισμός των PBs.....   | 39 |
| 1.3.5. | Επιδράσεις των PBs στην Υγεία.....                                  | 41 |
| 1.3.6. | Εναλλακτικές λύσεις.....  | 42 |
| 1.4.   | Αναλυτικές τεχνικές μέτρησης BPA και PBs σε βιολογικά δείγματα..... | 43 |
| 1.5.   | Σκοπός της μελέτης.....   | 44 |
| 2.     | Πειραματικό μέρος.....  | 45 |
| 2.1.   | Εκχύλιση στερεάς φάσης.....   | 45 |
| 2.2.   | Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης.....                             | 46 |
| 2.2.1. | Οργανολογία.....  | 48 |
| 2.3.   | Φασματομετρία Μάζας.....  | 50 |
| 2.3.1. | Πηγή Ηλεκτροψεκασμού (ESI).....                                     | 52 |
| 2.3.2. | Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI).....                  | 53 |
| 2.3.3. | Αναλυτής Μάζας.....   | 55 |
| 2.3.4. | Τεχνική Σάρωσης με Μελέτη Χαρακτηριστικών Αντιδράσεων (SRM).....    | 57 |
| 2.4.   | Υλικά και μέθοδοι.....  | 58 |
| 2.4.1. | Αντιδραστήρια.....  | 58 |
| 2.4.2. | Φυσίγγια (cartridges) για SPE.....                                  | 58 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.4.3. | Διαλύματα.....  | 59 |
| 2.4.4. | Ενόργανη Ανάλυση .....  | 60 |
| 2.4.5. | Συνθήκες Φασματογράφου Μάζας .....  | 60 |
| 2.4.6. | Συνθήκες Υγρής Χρωματογραφίας .....   | 62 |
| 2.4.7. | Επεξεργασία δειγμάτων .....   | 63 |
| 2.4.8. | Αναλυτικές Παράμετροι.....  | 64 |
| 2.4.9. | Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα .....   | 66 |
| 3.     | Αποτελέσματα- Συζήτηση.....   | 67 |
| 3.1.   | Βελτιστοποίηση του Φασματογράφου Μάζας.....                                   | 67 |
| 3.2.   | Βελτιστοποίηση της Υγρής Χρωματογραφίας .....                                 | 69 |
| 3.3.   | Χαρακτηριστικά της Μεθόδου .....  | 77 |
| 3.4.   | Συγκεντρώσεις σε πραγματικά δείγματα .....                                    | 78 |
| 4.     | Συμπεράσματα.....   | 84 |
| 5.     | Παράρτημα .....   | 86 |
| 5.1.   | Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων.....           | 86 |
| 5.2.   | Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Μη Πειραματικών/Εργαζόμενων Τμ. Χημείας<br>..... | 89 |
| 5.3.   | Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Τραπεζικών Υπαλλήλων .....                       | 92 |
| 5.4.   | Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Κομμωτών.....                                    | 94 |
| 5.5.   | Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Εθελοντών διαφόρων Επαγγελμάτων.....             | 96 |
| 6.     | Βιβλιογραφία .....  | 99 |

## Ευρετήριο Σχημάτων

|  |    |
|--|----|
| Σχήμα 1. Επίπεδα συγκεντρώσεων (μέσες τιμές) χωρίς (ng/mL) και με (μg/g) κανονικοποίηση ως προς την κρεατινίνη.....                      | 80 |
| Σχήμα 2. Επίπεδα συγκεντρώσεων (διάμεσες τιμές) ενώσεων χωρίς (ng/mL) και με (μg/g) κανονικοποίηση ως προς την κρεατινίνη.....           | 80 |
| Σχήμα 3. Διάμεσες τιμές των ενώσεων ,κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη, για κάθε ομάδα εθελοντών (μg/g).....                      | 81 |
| Σχήμα 4. Διάμεσες τιμές των ενώσεων για κάθε ομάδα εθελοντών, χωρίς τους Κομμωτές , κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη (μg/g)..... | 82 |

## Ευρετήριο Πινάκων

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 1. Φυσικοχημικές ιδιότητες BPA .....  | 24 |
| Πίνακας 2. Ποσοστιαία κατανάλωση BPA στις ΗΠΑ, το 2007.....                                 | 26 |
| Πίνακας 3. Επιδράσεις BPA στα ζώα .....   | 32 |
| Πίνακας 4. Έκθεση σε ποσά BPA, μέσω εισπνοής και δερματικής επαφής .....                    | 33 |
| Πίνακας 5. Φυσικοχημικές ιδιότητες PBs.....   | 35 |
| Πίνακας 6. Διαλυτότητα σημαντικότερων παραβενίων σε διάφορα μέσα.....                       | 35 |
| Πίνακας 7. Μέγιστα επιτρεπτά όρια (mg/kg) παραβενίων.....                                   | 36 |
| Πίνακας 8. Έκθεση σε PBs .....  | 38 |
| Πίνακας 9. NOAEL και LOAEL κυριότερων PBs .....   | 39 |
| Πίνακας 10. Ιόντα και Βέλτιστες Συνθήκες παρακολούθησης τους ανά SRM.....                   | 61 |
| Πίνακας 11. Βελτιστοποιημένες παράμετροι MS, ανά Segment .....                              | 61 |
| Πίνακας 12. Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης .....  | 62 |
| Πίνακας 13. Παράμετροι Λειτουργίας αυτόματου δειγματολήπτη.....                             | 62 |
| Πίνακας 14. Βελτιστοποιημένες παράμετροι ανά SRM στον APCI .....                            | 68 |
| Πίνακας 15. Χαρακτηριστικά στηλών .....   | 71 |
| Πίνακας 16. Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης, με μια στήλη διαχωρισμού στον APCI .....          | 72 |
| Πίνακας 17. Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης με τη χρήση δύο στηλών διαχωρισμού στον APCI ..... | 73 |
| Πίνακας 18. Όρια ανίχνευσης οργάνου με και χωρίς την προσθήκη οξικού οξέος....              | 74 |
| Πίνακας 19. Βαθμιδωτό Πρόγραμμα έκλουσης Φθαλικών εστέρων, BPA και PBs ....                 | 76 |
| Πίνακας 20. Χαρακτηριστικά της μεθόδου .....  | 77 |
| Πίνακας 21. Επίπεδα συγκεντρώσεων σε πραγματικά δείγματα .....                              | 79 |

|  |    |
|--|----|
| Πίνακας 22. Επίπεδα συγκεντρώσεων, κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη σε πραγματικά δείγματα .....                                      | 79 |
| Πίνακας 23. Επίπεδα συγκεντρώσεων (Διάμεσες τιμές) των ενώσεων για κάθε ομάδα εθελοντών κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη (μg/g)..... | 81 |
| Πίνακας 24. Σύγκριση με άλλες μελέτες .....  | 83 |
| Πίνακας 25. Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων .....   | 86 |
| Πίνακας 26. Στατιστικά στοιχεία για την ομάδα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων.....   | 87 |
| Πίνακας 27. Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη στα δείγματα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων.....                   | 87 |
| Πίνακας 28. Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Πειραματικούς Χημικούς και Βιολόγους.....                   | 89 |
| Πίνακας 29. Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Μη Πειραματικών/Εργαζομένων του Τμ. Χημείας .....   | 89 |
| Πίνακας 30. Στατιστικά στοιχεία για τους Μη Πειραματικούς/Εργαζομένους του Τμ. Χημείας .....   | 90 |
| Πίνακας 31. Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη για τους Μη Πειραματικούς/Εργαζομένους του Τμ. Χημείας .....              | 90 |
| Πίνακας 32. Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Μη πειραματικούς/ Εργαζόμενους του Τμ. Χημείας .....        | 91 |
| Πίνακας 33. Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Τραπεζικών Υπαλλήλων .....  | 92 |
| Πίνακας 34. Στατιστικά στοιχεία για τους τραπεζικούς υπαλλήλους.....   | 92 |
| Πίνακας 35. Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη για τους Τραπεζικούς Υπαλλήλους .....                                     | 93 |
| Πίνακας 36. Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Τραπεζικούς Υπαλλήλους .....                                | 93 |

|   |    |
|---|----|
| Πίνακας 37. Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Κομμωτών.....  | 94 |
| Πίνακας 38. Στατιστικά στοιχεία για τους Κομμωτές.....  | 95 |
| Πίνακας 39. Συγκεντρώσεις, κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη στα δείγματα των Κομμωτών .....                   | 95 |
| Πίνακας 40. Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Κομμωτές .....                       | 96 |
| Πίνακας 41. Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Διαφόρων Επαγγελματιών .....   | 96 |
| Πίνακας 42. Στατιστικά στοιχεία για τους Διαφόρους Επαγγελματίες.....   | 97 |
| Πίνακας 43. Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες , ως προς την κρεατινίνη για τα δείγματα των Διαφόρων Επαγγελματιών ..... | 97 |
| Πίνακας 44. Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Διαφόρους Επαγγελματίες .....        | 98 |

## Ευρετήριο Εικόνων

|   |    |
|---|----|
| Εικόνα 1. Δράση ενδοκρινικών διαταρακτών .....  | 22 |
| Εικόνα 2. Δομή εστραδιόλης .....  | 23 |
| Εικόνα 3. Δομή BPA .....  | 23 |
| Εικόνα 4. Αντίδραση σύνθεσης BPA.....   | 24 |
| Εικόνα 5. Παράγωγα της BPA (BADGE πάνω και BFDGE κάτω) .....  | 25 |
| Εικόνα 6. Υδρόλυση του εστερικού δεσμού, που συνδέει τα μόρια της BPA, για την δημιουργία πολυανθρακικών υλικών .....   | 27 |
| Εικόνα 7. Μεταβολίτες της BPA.....  | 30 |
| Εικόνα 8. Ποσά BPA και μεταβολιτών της σε ούρα και ορό αίματος .....  | 31 |
| Εικόνα 9. (α) Μέθυλο-παραβένιο (MPB), (β) αίθυλο-παραβένιο (EPB), (γ) ισο-πρόπυλο-παραβένιο (iso-PPB), (δ) κ-πρόπυλο-παραβένιο (n-PPB), (ε) ισο-βούτυλο-παρα-βένιο (iso-BPB), (στ) κ-βούτυλο-παραβένιο (n-BPB)..... | 34 |
| Εικόνα 10. Μεταβολικές οδοί PBs στον άνθρωπο .....  | 40 |
| Εικόνα 11. Απεικόνιση SPE .....   | 46 |
| Εικόνα 12. Απεικόνιση συστήματος υγρής χρωματογραφίας .....   | 50 |
| Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση των βασικών μερών ενός Φασματομέτρου Μάζας .....  | 52 |
| Εικόνα 14. Μηχανισμός ιοντισμού με ESI .....  | 53 |
| Εικόνα 15. Σχηματική απεικόνιση συστήματος Χημικού Ιοντισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης .....   | 55 |
| Εικόνα 16. Σύγκριση πηγών ιοντισμού .....   | 55 |
| Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας .....   | 56 |
| Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση τετραπόλου .....  | 56 |
| Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση SRM .....   | 57 |



|  |    |
|--|----|
| Εικόνα 20. Διάγραμμα συσχέτισης σχετικής έντασης των 4 πιο άφθονων θυγατρικών ιόντων του n-PPB σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης, στον APCI ..... | 68 |
| Εικόνα 21. Διάγραμμα συσχέτισης σχετικής έντασης των 4 πιο άφθονων θυγατρικών ιόντων του MPB σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης, στον ESI .....    | 69 |
| Εικόνα 22. Δομή ανισόλης .....   | 70 |
| Εικόνα 23. Θεωρητικές παράμετροι της Χρωματογραφικής στήλης (H: ύψος θεωρητικής πλάκας, L:μήκος στήλης) .....  | 70 |
| Εικόνα 24. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος, με μια στήλη διαχωρισμού, στον APCI.....  | 72 |
| Εικόνα 25. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος με χρήση 2 στηλών διαχωρισμού, στον APCI.....  | 74 |
| Εικόνα 26. Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος με τη στήλη Thermo BetaSil Phenyl 3μm, 100 *2.1 mm, στον ESI.....                                      | 75 |
| Εικόνα 27. Χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος με τη στήλη Thermo BetaSil Phenyl 3μm, 100 *2.1 mm, στον ESI.....                                    | 76 |
| Εικόνα 28. Καμπύλη βαθμονόμησης MPB, χωρίς οξικό οξύ.....  | 78 |

## Συντομογραφίες

|  |  |   |
|--|--|---|
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -MPB        | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -methyl paraben   | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -μέθυλο παραβένιο    |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -EPB        | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -ethyl paraben    | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -αίθυλο παραβένιο    |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -n-PPB      | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -n-propyl paraben | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -κ-πρόπυλο παραβένιο |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -n-BPB      | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -n-butyl paraben  | <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -κ-βούτυλο παραβένιο |
| <b>4-methylumbelliferrone</b>            | 4-methyl-UMB                                   | 4-μέθυλο ουμπελιφερόνη                            |
| <b>4-methylumbelliferryl glucuronide</b> | 4-methyl-UMB-glucuronide                       | 4-μέθυλο ουμπελιφερόνη γλουκουρονιδιομένη         |
| <b>4-methylumbelliferryl sulphate</b>    | 4-methyl-UMB-sulphate                          | 4-μέθυλο ουμπελιφερόνη σουλφονιωμένη              |
| <b>APCI</b>                              | Atmospheric Pressure Chemical Ionization       | Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης            |
| <b>BADGE</b>                             | Bisphenol-A Diglycil Ether                     | Διγλυκιδικός Αιθέρας της Δισφαινόλης-A            |
| <b>BFDGE</b>                             | Bisphenol-F Diglycil Ether                     | Διγλυκιδικός Αιθέρας της Δισφαινόλης-Φ            |
| <b>BPA</b>                               | Bisphenol-A                                    | Δισφαινόλη-A                                      |
| <b>BPA-G</b>                             | Bisphenol-A Glucuronated                       | Γλουκουρονιδιομένη Δισφαινόλη-A                   |
| <b>BzPB</b>                              | Benzyl paraben                                 | βένζυλο παραβένιο                                 |
| <b>CID</b>                               | Collision Induced Dissociation                 | Διάσπαση Επαγόμενη από Σύγκρουση                  |
| <b>d16-BPA</b>                           | d16-Bisphenol A                                | d16-Δισφαινόλη-A                                  |
| <b>EDs</b>                               | Endocrine Disruptors                           | Ενδοκρινικοί Διαταράκτες                          |
| <b>ELISA</b>                             | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay              | Ένζυμο-ανοσοροφητική Δοκιμασία                    |
| <b>EPB</b>                               | ethyl paraben                                  | αίθυλο παραβένιο                                  |
| <b>ESI</b>                               | Electrospray Ionization                        | Ηλεκτροψεκασμός                                   |

|                 |  |   |
|-----------------|--|---|
| <b>FDA</b>      | Food and Drug Administration                       | Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων                      |
| <b>GC-MS</b>    | Gas Chromatography-Mass Spectrometry               | Αέρια Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας |
| <b>HeptylPB</b> | heptyl paraben                                     | έπτυλο παραβένιο                                      |
| <b>HMW</b>      | High Molecular Weight                              | Υψηλό Μοριακό Βάρος                                   |
| <b>HPLC</b>     | High Performance Liquid Chromatography             | Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης                      |
| <b>iLOD</b>     | instrumental Limit Of Detection                    | Όριο Ανίχνευσης Οργάνου                               |
| <b>iso-BPB</b>  | iso-butyl paraben                                  | ίσο-βούτυλο παραβένιο                                 |
| <b>iso-PPB</b>  | iso-propyl paraben                                 | ίσο-πρότυλο παραβένιο                                 |
| <b>Kow</b>      | Octanol-Water Partition Coefficient                | Συντελεστής Λιποφιλίας                                |
| <b>LC</b>       | Liquid Chromatography                              | Υγρή Χρωματογραφία                                    |
| <b>LC-ED</b>    | Liquid Chromatography-Electron Detector            | Υγρή Χρωματογραφία με Ανιχνευτή Ηλεκτρονίων           |
| <b>LC-MS</b>    | Liquid Chromatography-Mass spectrometry            | Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με Φασματομετρία Μάζας  |
| <b>LMW</b>      | Low Molecular Weight                               | Χαμηλό Μοριακό Βάρος                                  |
| <b>Koc</b>      | Soil Organic Carbon-Water Partitioning Coefficient | Συντελεστής προσκόλλησης                              |
| <b>LOAEL</b>    | Lowest Observed Adverse Effect Level               | Χαμηλότερο Όριο Παρατηρούμενων Κακών Επιδράσεων       |
| <b>MCF-7</b>    | Michigan Cancer Foundation                         | αναφέρεται στα Καρκινικά Κύτταρα του Μαστού           |

|              |   |   |
|--------------|---|---|
| <b>mLOD</b>  | method Limit Of Detection               | Όριο Ανίχνευσης Μεθόδου                 |
| <b>MPB</b>   | methyl paraben                          | μέθυλο παραβένιο                        |
| <b>MS</b>    | Mass Spectrometer                       | Φασματογράφος Μάζας                     |
| <b>n-BPB</b> | n-butyl paraben                         | κ-βούτυλο παραβένιο                     |
| <b>NOAEL</b> | No Observed Adverse Effects Level       | Όριο Μη Παρατηρούμενων Κακών Επιδράσεων |
| <b>n-PPB</b> | n-propyl paraben                        | κ-πρόπυλο παραβένιο                     |
| <b>PBs</b>   | Parabens                                | Παραβένια                               |
| <b>PHBA</b>  | para-hydroxy-benzoic acid               | πάρα-ύδροξυ-βενζοϊκό οξύ                |
| <b>SD</b>    | Standard Deviation                      | Τυπική Απόκλιση                         |
| <b>SIM</b>   | Selected Ion Monitoring                 | Παρακολούθηση Επιλεγμένου Ιόντος        |
| <b>S/N</b>   | Signal to Noise                         | Σήμα προς Θόρυβος                       |
| <b>SPE</b>   | Solid Phase Extraction                  | Εκχύλιση Στερεάς Φάσης                  |
| <b>SRM</b>   | Selected Reaction Monitoring            | Παρακολούθηση Επιλεγμένης Αντίδρασης    |
| <b>TCS</b>   | Triclosan                               | Τρικλοζάνη                              |
| <b>TIC</b>   | Total Ion Current                       | Συνολικό Ρεύμα Ιόντων                   |
| <b>UPLC</b>  | Ultra Performance Liquid Chromatography | Υγρή Χρωματογραφία Υπέρ-υψηλής Απόδοσης |

## 1. Θεωρητικό μέρος

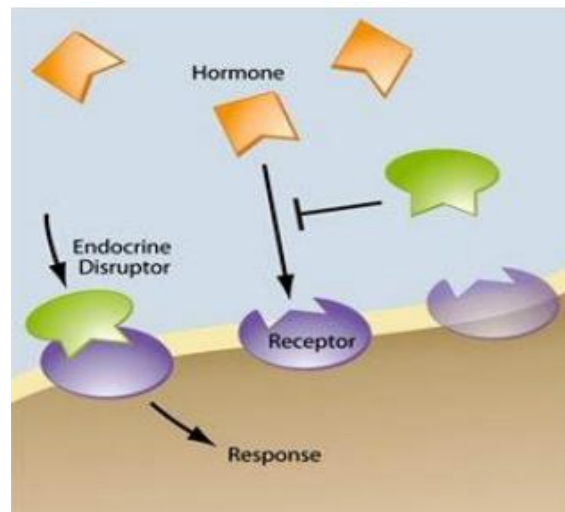
### 1.1. Εισαγωγή

Το ενδοκρινικό σύστημα, αποτελείται από αδένες που βρίσκονται σε όλο το σώμα και εκκρίνουν ορμόνες που απελευθερώνονται στο αίμα ή στα βιολογικά υγρά που περιβάλλουν τα κύτταρα καθώς και από υποδοχείς σε διάφορα όργανα και ιστούς που αναγνωρίζουν και δέχονται τις ορμόνες [1]. Οι ορμόνες απελευθερώνονται από τους αδένες, «ταξιδεύουν» στο σώμα λειτουργώντας ως χημικοί διαβιβαστές και συνδέονται με κύτταρα που διαθέτουν κατάλληλους υποδοχείς στις επιφάνειες τους. Παρόλο που οι ορμόνες φτάνουν σε όλα τα μέρη του σώματος, μόνο τα κύτταρα-στόχοι με τους συμβατούς υποδοχείς είναι ικανά να αλληλεπιδράσουν μαζί τους. Όταν ο υποδοχέας και η ορμόνη συνδεθούν, ο υποδοχέας είτε διαφοροποιεί τις πρωτεΐνες του κυττάρου, είτε ενεργοποιεί γονίδια για τη σύνθεση νέων πρωτεϊνών. Το ενδοκρινικό σύστημα ρυθμίζει όλες τις βιολογικές διαδικασίες, συμπεριλαμβανομένων της ανάπτυξης του εγκεφάλου και του νευρικού συστήματος, της ανάπτυξης και λειτουργίας του αναπαραγωγικού συστήματος καθώς επίσης και του μεταβολισμού. Οι ωοθήκες, οι όρχεις η υπόφυση, ο θυρεοειδής και άλλοι αδένες είναι τα κύρια μέρη του ενδοκρινικού συστήματος [2,3].

Οι EDs, αλληλεπιδρούν με φυσικές ορμόνες, όπως είναι η κατηγορία των οιστρογόνων, συμπεριλαμβανομένων της εστραδιόλης, της οιστρόνης και της οιστρόλης, που είναι υπεύθυνες για την ανάπτυξη, τη συμπεριφορά και τη διατήρηση της ομοιόστασης. Ο μηχανισμός δράσης των EDs παρουσιάζεται εν συντομία στην Εικόνα 1. Πιο αναλυτικά, τα στάδια που λαμβάνουν χώρα είναι τα εξής:

1. Πρόσδεση και ενεργοποίηση του οιστρογονικού υποδοχέα (συνεπώς δρουν ως οιστρογόνα).
2. Πρόσδεση αλλά μη ενεργοποίηση του οιστρογονικού υποδοχέα (συνεπώς δρουν ως αντί-οιστρογόνα).
3. Πρόσδεση με άλλους υποδοχείς.

4. Αλλαγή του μεταβολισμού των φυσικών ορμονών.
5. Αλλαγή του αριθμού των ορμονικών υποδοχέων σε ένα κύτταρο.



**Εικόνα 1.** Δράση ενδοκρινικών διαταρακτών [4]

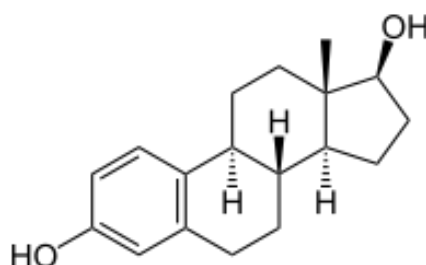
Η έκθεση στους ενδοκρινικούς διαταράκτες κατά τα διάρκεια του «προγραμματισμού» του ενδοκρινικού συστήματος μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη αλλαγή της λειτουργίας του. Η έκθεση κατά τη διάρκεια της ενηλικίωσης, μπορεί να αντισταθμιστεί από φυσιολογικούς ομοιοστατικούς μηχανισμούς και έτσι μπορεί να μην οδηγήσει τελικά σε σημαντικές επιδράσεις [5]. Οι γνωστοί μέχρι σήμερα ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι οι εξής [5] :

- Φυσικές και συνθετικές ορμόνες
- Φυτό-οιστρογόνα
- Μυκοτοξίνες
- Οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα
- Πολυχλωριωμένα διφαινύλια
- Αλκυλοφαινόλες
- Διοξίνες
- Φθαλικοί εστέρες (Phthalates)
- Δισφαινόλη-A (BPA)
- Αντιμικροβιακοί παράγοντες, όπως τα Παραβένια (PBs) και η Τρικλοζάνη (Triclosan, TCS)

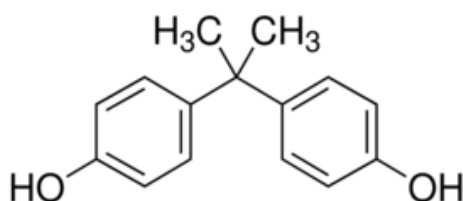
## 1.2. Δισφαινόλη-A

### 1.2.1. Δομή και Φυσικοχημικές Ιδιότητες της Δισφαινόλης-A

Η δομή της Δισφαινόλης-A ή 4,4' (προπάν-2,2-διύλο) δισφαινόλη, (Bisphenol-A, BPA) παρουσιάζεται στην Εικόνα 3. Παρατηρώντας την δομή της BPA και συγκρίνοντας την με αυτήν της εστραδιόλης (Εικόνα 2), η οποία αποτελεί φυσική ορμόνη, εξηγείται η βιομημητική της δράση. Η BPA συντέθηκε αρχικά από τον A. P. Dianin, το 1891 και χρησιμοποιήθηκε αργότερα το 1930 κατά τη διάρκεια έρευνας για συνθετικά οιστρογόνα [5].



Εικόνα 2. Δομή εστραδιόλης



Εικόνα 3. Δομή BPA

Η BPA είναι ένα λευκό στερεό με ήπια φαινολική οσμή. Έχει πολύ χαμηλή τάση ατμών και χαμηλό συντελεστή λιποφιλίας ( $\log K_{ow}$ )<sup>1</sup>, υψηλό σημείο ζέσεως, και μέτρια διαλυτότητα. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες της συνοψίζονται στον Πίνακα 1 [7].

<sup>1</sup> Ως λιποφιλία, ορίζεται η τάση μιας ένωσης να κατανέμεται μεταξύ οκτανόλης (οργανικός διαλύτης) και νερού. Δίνει πληροφορίες για την περιβαλλοντική συμπεριφορά κάθε ένωσης.

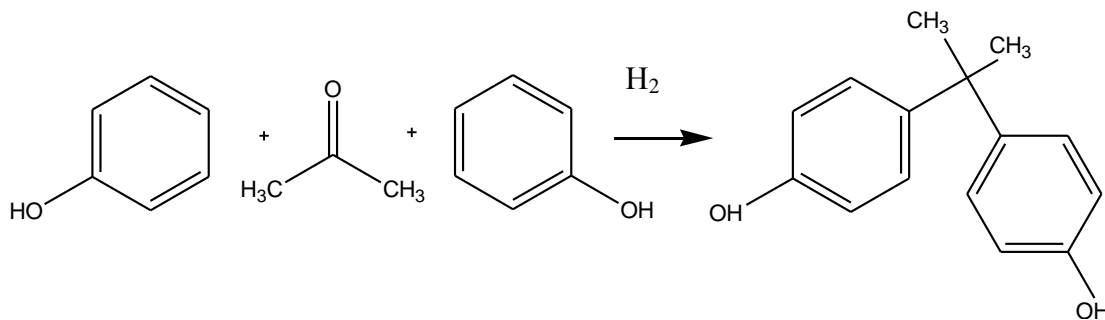
**Πίνακας 1.** Φυσικοχημικές ιδιότητες BPA

| Ιδιότητα                     |  |
|------------------------------|--|
| Μοριακό βάρος                | 228 g/mol                                      |
| Φυσική κατάσταση             | Λευκή σκόνη                                    |
| Μοριακός τύπος               | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub> |
| Πυκνότητα                    | 1,030-1,195 g/cm <sup>3</sup>                  |
| Σημείο βρασμού               | 220 °C (σε 2mm Hg) και 398 °C (σε 760mm Hg)    |
| Σημείο τήξης                 | 150-157 °C                                     |
| Τιμή pKa                     | 9,59   |
| Διαλυτότητα στο νερό         | 120 mg/L (25 °C)                               |
| Τάση ατμών                   | 8,70*10 <sup>-10</sup> mm Hg σε 20-25 °C       |
| Συντελεστής κατανομής logKow | 2,20-3,82                                      |
| Σταθερά Henry                | 1*10 <sup>-10</sup> atm * m <sup>3</sup> /mol  |

### 1.2.2. Παραγωγή και χρήσεις της BPA

Η BPA παρασκευάζεται με τις ακόλουθες μεθόδους:

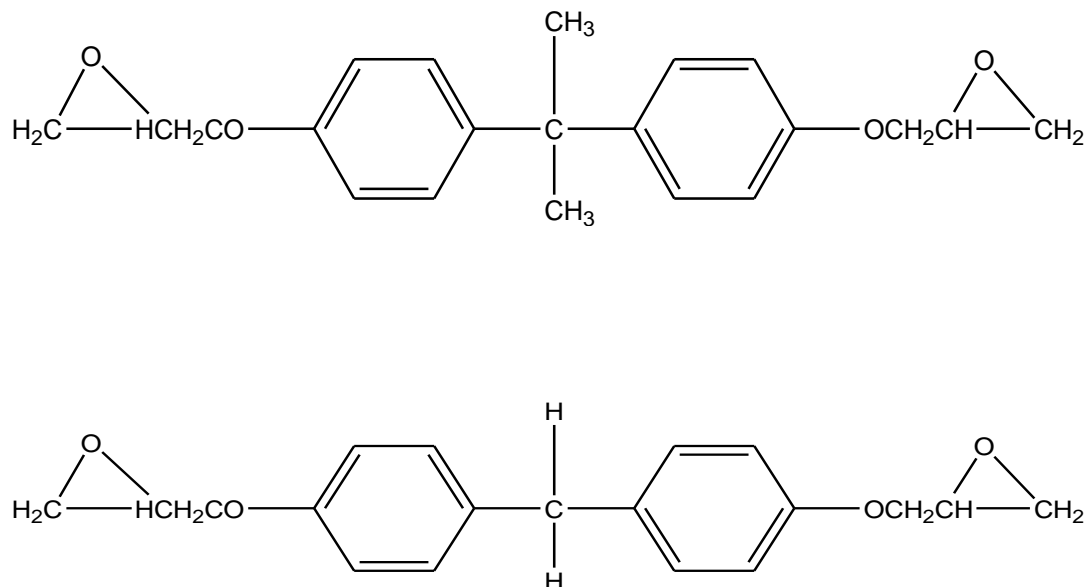
- Συμπύκνωση της φαινόλης με ακετόνη, σε χαμηλό pH και υψηλή θερμοκρασία, παρουσία καταλύτη και εν συνεχεία ο καθαρισμός της.
- Η δεύτερη μέθοδος είναι παρόμοια με την προηγούμενη αλλά διαφοροποιείται ως προς την χρήση των καταλυτών και των συστημάτων καθαρισμού που παράγουν λιγότερα απόβλητα. Η ξηραμένη BPA, που παράγεται και στις 2 μεθόδους, εμφανίζεται υπό μορφή κρυστάλλων, νιφάδων ή σβώλων [5].



**Εικόνα 4.** Αντίδραση σύνθεσης BPA



Δύο παράγωγα της BPA (Εικόνα 5), είναι ο δυγλυκιδικός αιθέρας της BPA (Bisphenol-A diglycil ether, BADGE) και ο δυγλυκιδικός αιθέρας της Δισφαινόλης-Φ (Bisphenol-F diglycil ether, BFDGE) και είναι μεγάλης βιομηχανικής σημασίας.



**Εικόνα 5.** Παράγωγα της BPA (BADGE πάνω και BFDGE κάτω)

Η BADGE συντίθενται από την αντίδραση της BPA με την επιχλωροϋδρίνη. Η BADGE είναι η κύρια ένωση που χρησιμοποιείται στην παραγωγή έποξυ ρητινών με σκοπό τις επικαλύψεις σε κονσέρβες. Το 75% των έποξυ ρητινών που χρησιμοποιούνται είναι παράγωγα της BADGE. Το BFDGE χρησιμοποιείται επίσης για τον ίδιο σκοπό [6].

Κατά την χλωρίωση των υδάτων, η BPA δύναται να αντιδράσει με το υπολειμματικό χλώριο, σχηματίζοντας παραπροϊόντα της BPA, εξαρτώμενα από το pH του νερού [7]. Τα χλωριωμένα παράγωγα, είναι πιο κυτταροτοξικά από την BPA και όλα παρουσιάζουν οιστρογονική δραστηριότητα [8]. Στα πρώιμα στάδια της χλωρίωσης σχηματίζονται τα παρακάτω παραπροϊόντα: 2-χλωρο-BPA (MCBPA), 2,6-διχλωρο-BPA (2,6-D<sub>2</sub>CBPA), 2,2-δίχλωρο-BPA (2,2-D<sub>2</sub>CBPA), 2,2,6-τρίχλωρο-BPA (T<sub>3</sub>CBPA), 2,2,6,6-τετράχλωρο-BPA (T<sub>4</sub>CBPA). Εν συνεχεία πραγματοποιείται σχηματισμός των 2,4,6-τριχλωρο-φαινόλη (T<sub>3</sub>CP), 2,6-διχλωρο-1,4-βενζοκινόνη (D<sub>2</sub>CBQ), 2,6-δίχλωρο-1,4-υδροκινόνη (D<sub>2</sub>CHQ), C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>Cl<sub>2</sub>O, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και χλωριωμένων φαινολικών ενώσεων [7].

Παγκοσμίως, η BPA είναι ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα χημικά, με ετήσια παραγωγή που αγγίζει τους 3.000.000 τόνους, με 100 από αυτούς να απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα [5].

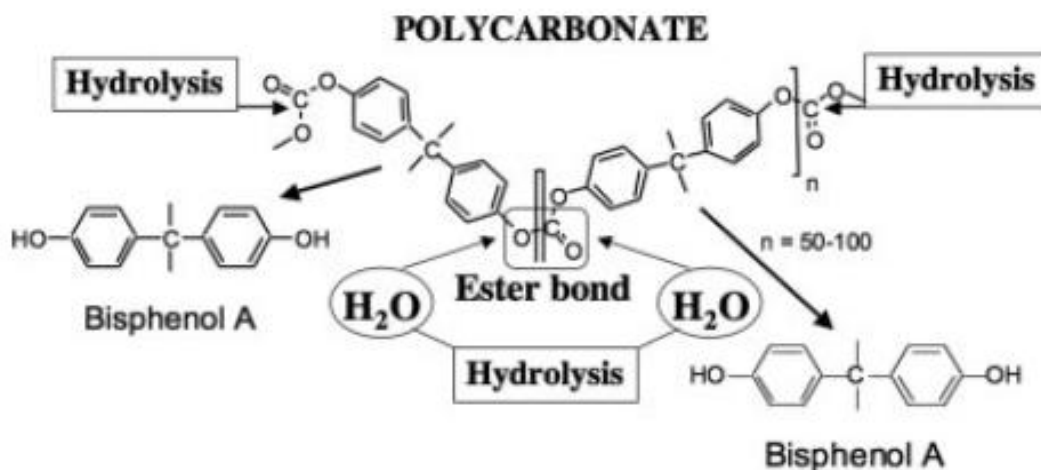
Μπορεί να βρεθεί σε πολλά προϊόντα όπως:

- πλαστικά
- σφραγίσματα στην οδοντιατρική
- προϊόντα προσωπικής περιποίησης
- δομικά υλικά
- στην επεξεργασία φαγητών και ποτών
- επιβραδυντικά φλόγας
- φακούς επαφής
- DVDs
- υλικά για την προστασία τζαμιών
- ηλεκτρονικές συσκευές
- χαρτί αποδείξεων (thermal paper)

Η BPA, χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή φυτοφαρμάκων [9], ρητινών και πολυανθρακικών πλαστικών [10]. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6, η διαδικασία που απαιτείται για την κατασκευή των πολυανθρακικών υλικών είναι η υδρόλυση του εστερικού δεσμού της BPA. Οι έποξυ-ρητίνες χρησιμοποιούνται ως επικαλυπτικά μέσα στις κονσέρβες τροφών και στα ποτά. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφερθεί η χρήση τους σε πολυανθρακικά μπουκάλια τα οποία προορίζονται για χρήση βρεφική ηλικία, καθώς και σε δοχεία αποθήκευσης [11]. Στον Πίνακα 2, παρουσιάζονται ενδεικτικά τα ποσοστά κατανάλωσης της BPA στις ΗΠΑ.

**Πίνακας 2.** Ποσοστιαία κατανάλωση BPA στις ΗΠΑ, το 2007 [12,14]

| Προϊόν  | Ποσοστό κατανάλωσης BPA |
|---|-------------------------|
| Πολυανθρακικές ρητίνες  | 74%                     |
| Έποξυ-ρητίνες   | 20%                     |
| Επιβραδυντικά φλόγας, Πολυακρυλικές ρητίνες, Ρητίνες πολυεστέρα | 6%                      |



**Εικόνα 6.** Υδρόλυση του εστερικού δεσμού, που συνδέει τα μόρια της BPA, για την δημιουργία πολυανθρακικών υλικών [13]

### 1.2.3. Πηγές έκθεσης BPA

Η ανθρώπινη έκθεση στη BPA, γίνεται κυρίως δια μέσου της εισπνοής, της δερματικής επαφής και της κατάποσης και συνδέεται με καρδιακές ασθένειες, ανωμαλίες στο συκώτι, μεταβολές στη λειτουργία του θυρεοειδή αδένος [14], την αναπαραγωγή, τον εγκέφαλο, προκαλεί πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων του προστάτη και έχει συνδεθεί με άσθμα, άγχος, παχυσαρκία, διαβήτη, καρκίνο του μαστού, και οξειδωτικό stress [6, 15].

Η ημερήσια πρόσληψη BPA για τον άνθρωπο υπολογίζεται να είναι μικρότερη από 1 μg/kg βάρους/μέρα [16], ενώ η μέση πρόσληψη είναι στατιστικά μεγαλύτερη για τους άντρες. Μελέτες σε ζώα, αναφέρουν επιδράσεις στη μήτρα και στα νεογνήτα, διαφοροποιήσεις στη συμπεριφορά και αλλαγές στο χρόνο εμφάνισης της εφηβείας σε αρσενικά και σε θηλυκά ποντίκια [17]. Η BPA παρά τον μικρό χρόνο ημιζώης της ( $t=5.4$  h), βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον, λόγω της διαρκούς απελευθέρωσης της που μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της παρασκευής της, τη μεταφορά και την κατεργασία της, καθώς και κατά την επεξεργασία αστικών αποβλήτων [18]. Επίσης μπορεί να εκλυθεί από χωματερές, κατά την καύση οικιακών αποβλήτων καθώς και από την φυσική αποσύνθεση των πλαστικών στο περιβάλλον [18].

Επίσης έχει εξετασθεί η συσχέτιση του φύλου με τα ποσοστά της BPA που ανιχνεύθηκαν σε 30 ενήλικες από την Κορέα. Από την μελέτη αυτή προέκυψε ότι οι συνολικές ποσότητες BPA, δεν εξαρτιόντουσαν από το φύλλο. Ωστόσο, αυτό που παρουσίασε ενδιαφέρον ήταν ότι οι άντρες είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα BPA-G (2,34 ng/mL) σε σχέση με αυτά των γυναικών (1,00 ng/mL), ενώ οι γυναίκες είχαν μεγαλύτερα ποσοστά BPA-S (1,2 ng/mL) σε αντίθεση με τους άντρες (0,49 ng/mL) [19].

Αρκετές μελέτες, έχουν εξετάσει την μετανάστευση της BPA από τα πολυανθρακικά υλικά, όπως τα μπουκάλια μωρών και στα τρόφιμα όπου έχουν ανιχνευθεί συγκεντρώσεις που φτάνουν τα 8,4 ng/mL [20,21]. Βιβλιογραφικές πηγές αναφέρουν επίσης ότι η BPA μεταναστεύει από τα πολυανθρακικά υλικά κυρίως κατά την πρώτη χρήση [23]. Ο Breda διαπίστωσε ότι μετά από πλύσιμο με βραστό νερό και βούρτσισμα των πλαστικών, η BPA διαρρέει σε μεγαλύτερες ποσότητες στο νερό [21,23]. Επιπλέον, ενδιαφέρον φαίνεται να συγκεντρώνεται γύρω τις συνθήκες κάτω από τις οποίες διατηρούνται οι κονσέρβες κατά τη διαρροή της BPA από αυτές. Έτσι διερευνήθηκε το στάδιο παρασκευής τους και εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου θέρμανσης, η θερμοκρασία, ο χρόνος αποθήκευσης, η θερμοκρασία αποθήκευσης, καθώς και άλλοι παράγοντες. Επίσης διαπιστώθηκε ότι φυτικά έλαια και διαλύματα χλωριούχου νατρίου, συνεισφέρουν στην αύξηση της εκλυόμενης BPA [22].

Λιγότερο από 1% της BPA, που βρίσκεται στο περιβάλλον, εμφανίζεται στην ατμόσφαιρα, όπου φώτο-οξειδώνεται και αποσυντίθεται ταχέως [18]. Επίσης, έχει μικρή έως μέτρια υδροφοβικότητα και συνεπώς, μικρή ικανότητα για βιοσυσσώρευση. Άρα, υπολογίζεται πως το μεγαλύτερο μέρος της BPA στο περιβάλλον είναι αβιοτικό και συνδέεται με το νερό και τα αιρούμενα κolloειδή σε ποσοστό 53%, με το χώμα σε ποσοστό 25% και με τα ιζήματα σε ποσοστό 23% [18]. Οι τιμές του συντελεστή προσκόλλησης ( $K_{oc}$ )<sup>2</sup> της BPA στο έδαφος, υπολογισμένες με βάση την διαλυτότητα του νερού σε 120 mg/L και του συντελεστή κατανομής

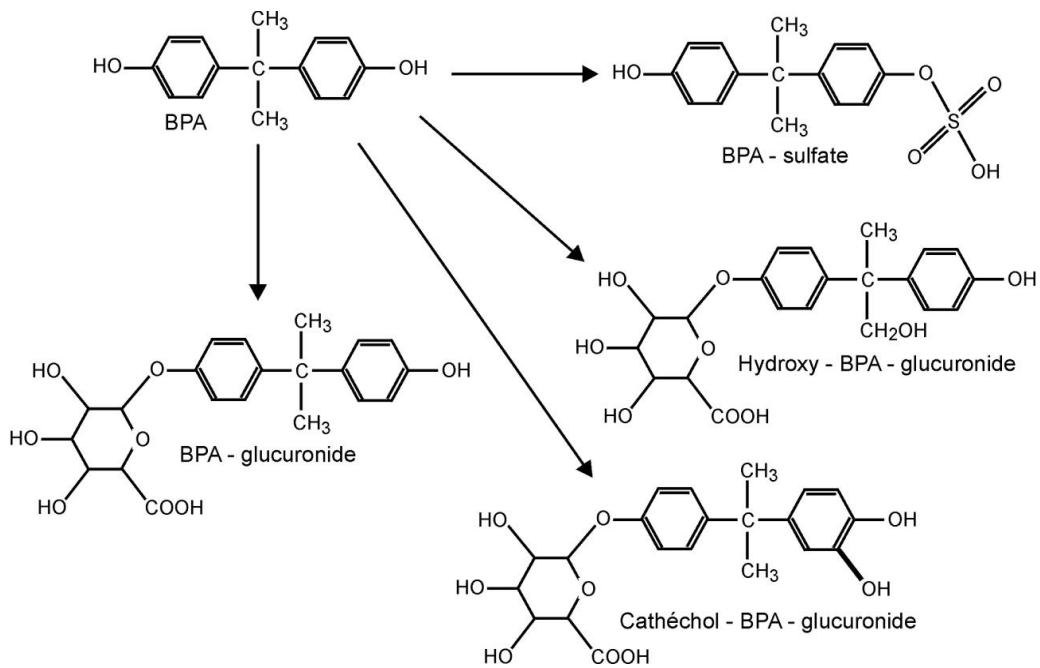
---

<sup>2</sup> Συντελεστής προσκόλλησης, είναι το μέτρο της κατανομής μιας χημικής ένωσης ανάμεσα στο στερεό (έδαφος ή ιζήμα) και στην υδατική φάση και είναι ανεξάρτητος των ιδιοτήτων του εδάφους και του ιζήματος.

οκτανόλης-νερού (Kow) σε 3,32, κυμαίνονται από 314 έως 1524 [9]. Αυτές οι τιμές απορρόφησης, δείχνουν ότι η BPA η οποία απελευθερώνεται στο έδαφος, ή στα επιφανειακά νερά, μπορεί να προσκολληθεί στο έδαφος ή στα ιζήματα. Τα επίπεδα της BPA στο έδαφος, είναι υψηλότερα στα ιζήματα παρά στα επιφανειακά νερά [23]. Η BPA στα νερά των ποταμών, μπορεί να αποσυντεθεί κάτω από αερόβιες συνθήκες αλλά όχι κάτω από αναερόβιες. Μελετήθηκαν βακτήρια που μπορούν να αποσυνθέσουν την BPA και βρήκαν ότι μόνο δύο στελέχη κατάφεραν να την βιοδιασπάσουν σε μεγαλύτερο βαθμό, τα *Pseudomonas sp.* και *Pseudomonas putida*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η BPA, μπορεί να παραμείνει περισσότερο χρόνο σε θαλασσινό νερό, παρά σε νερό ποταμού, χωρίς να διασπαστεί και συνεπώς η μόλυνση σε θαλάσσιους οργανισμούς, είναι μεγαλύτερη. Συνεπώς, η πρόσληψη θαλάσσιων οργανισμών μολυσμένων με BPA, αποτελεί την κύρια πηγή μόλυνσης για τους ανθρώπους από το υδάτινο περιβάλλον [9]. Η πιθανότητα της εισπνοής μεγάλων ποσοτήτων BPA από τον αέρα, είναι χαμηλή. Παρόλα αυτά μελέτες που έγιναν σε εργάτες που δούλευαν σε εταιρίες παραγωγής προϊόντων βασισμένων στην BPA, έδειξαν ότι η απέκκριση στα ούρα ήταν μεγαλύτερη για αυτούς που έρχονταν σε επαφή με ψεκαστίρες από έποξυ ρητίνες (μέσος όρος: 1.06μmol/mol κρεατινίνης) [9]. Τέλος, φαίνεται ότι τα απόβλητα ανθρώπινης δραστηριότητας αποτελούν την κύρια πηγή μόλυνσης με BPA στο έδαφος.

#### **1.2.4 Μεταβολισμός της BPA**

Ο μεταβολισμός της BPA στον άνθρωπο και σε διάφορα άλλα είδη που χρησιμοποιούνται στις τοξικολογικές μελέτες, είναι σημαντικός ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή τοξικότητα της. Το ερώτημα είναι αν αυτή η ουσία είναι βιοσυσσωρεύσιμη και μετατρέπεται σε μια πιο ενεργή μορφή (μεταβολική ενεργοποίηση) ή σε μια λιγότερο ενεργή (μεταβολική αποτοξικοποίηση).

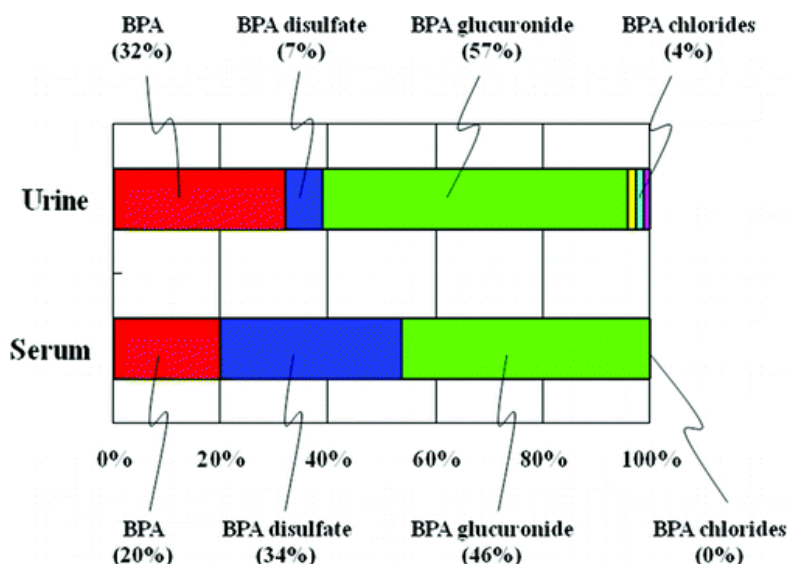


**Εικόνα 7.** Μεταβολίτες της BPA [24]

Γενικά, στα θηλαστικά φαίνεται ότι η BPA εμφανίζεται ελεύθερη στα κόπρανα σε ποσοστό 56-82%, ενώ στα ούρα εμφανίζεται με τη μορφή των μεταβολιτών της σε ποσοστό 13-28% [25,26]. Πειράματα που διεξήχθησαν σε ενήλικες ανθρώπους δείχνουν ότι η BPA απορροφάται πλήρως από τη γαστρεντερική οδό. Στη συνέχεια βιομετατρέπεται από τα ένζυμα του γαστρεντερικού συστήματος και του ήπατος, και απεκκρίνεται ως BPA με την γλουκουρονιδιομένη ή με την σουλφονιομένη μορφή. Οι γλουκουρονιομένοι και σουλφονιομένοι μεταβολίτες, είναι ένας κοινός τύπος μεταβολίτη της BPA που δημιουργείται μετά τον μεταβολισμό που συμβαίνει στο συκώτι με την βοήθεια των *μικροσωμάτων (microsomes)* και των *σουλφοτρανσφερασών (sulfotransferases)* που υπάρχουν εκεί. Επίσης έχει διαπιστωθεί ότι τα μικροσωμάτια του συκωτιού των ποντικών γλουκουρονιδιώνουν πολύ καλύτερα την BPA, απ'ότι τα μικροσωμάτια στον άνθρωπο [27]. Η γλουκουρονιδιομένη μορφή της BPA (BPA-G), είναι η μόνη που ανιχνεύεται στους ανθρώπους μετά από κατάποση [28]. Στην Εικόνα 7 φαίνονται οι διάφοροι μεταβολίτες της BPA.

Η σύζευξη με γλουκουρονικό οξύ ή με θειικό άλας θεωρείται ως μηχανισμός αποτοξικοποίησης και οι χλωριωμένες μορφές της που συναντώνται στα ούρα και στον ορό θεωρούνται ως υποκατεστημένες μορφές της BPA. Όπως φαίνεται και

στην Εικόνα 8, η BPA στα ούρα βρίσκεται περισσότερο με την γλουκουρονιδομένη της μορφή σε σχέση με την ελεύθερη, ενώ στον ορό παρατηρείται και σε μεγάλο ποσοστό ως σουλφονιομένη.



**Εικόνα 8.** Ποσά BPA και μεταβολιτών της σε ούρα και ορό αίματος [29]

Η ελεύθερη BPA εμφανίζεται περισσότερο στα πρωτεύοντα θηλαστικά, ενώ η BPA-G, κυρίως στα τρωκτικά, πράγμα που δηλώνει ότι οι δυσμενείς επιπτώσεις της BPA δεν εμφανίζονται τόσο σε αυτά. Τέλος, η BPA-G δεν εμφανίζει οιστρογονική δραστηριότητα, όπως η ελεύθερη BPA.

### 1.2.5 Επιδράσεις της BPA στην Υγεία

Γενικά, επικρατεί η άποψη ότι η BPA αποτελεί τοξικό παράγοντα και προκαλεί συγκεκριμένες επιπτώσεις ανάλογα με την συγκέντρωση στην οποία εκτίθεται ο οργανισμός (Πίνακας 3). Στους ανθρώπους έχει συνδεθεί με καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη, διατάραξη του θυρεοειδούς αδένος καθώς και παχυσαρκία [28].

**Πίνακας 3.** Επιδράσεις BPA στα ζώα

| Δόση σε mg/kg-bw/day | Επιπτώσεις:   |
|----------------------|---|
| >50                  | καθυστερημένη ανάπτυξη σε αρσενικά ποντίκια και θηλυκούς αρουραίους   |
| >235                 | μειωμένο βάρος κατά τη γέννηση ή και πρόωρη γέννηση                   |
| >500                 | μειώνει την γονιμότητα στα ποντίκια και μειωμένη επιβίωση των εμβρύων |

«Χαμηλές δόσεις» των ενδοκρινικών διαταρακτών, ορίστηκαν από την NIEHS (National Institute of Environmental Health Sciences), ως δόσεις κάτω από το NOAEL<sup>3</sup> για κάθε χημική ένωση, που για την BPA είναι δόσεις <5 mg/kg-bw/day [30].

Σε μελέτη που διενεργήθηκε για τον υπολογισμό της έκθεσης BPA στα παιδιά και περιελάμβανε μόνο 9 παιδιά, διαμορφώθηκε έτσι ώστε να εξετάσει την πιθανή έκθεση τους στο σπίτι και στον παιδικό σταθμό [31]. Η BPA ανιχνεύθηκε σε εσωτερικά και εξωτερικά δείγματα αέρα, σε σκόνη από το έδαφος καθώς και σε χώμα από τον παιδότοπο, έτσι προέκυψε ότι η μέση έκθεση σε BPA για τα παιδιά είναι 42,98 ng/kg/day. Σε αντίστοιχη μελέτη, που αφορούσε 257 παιδιά επιβεβαίωσε ότι η BPA μπορεί να βρεθεί σε πάνω από το 50% του εσωτερικού αέρα, των ξεσκονόπανων, της στερεάς τροφής, καθώς και στα υγρά τρόφιμα [32]. Από αυτή τη μελέτη προέκυψε ότι το 99% της έκθεσης για τα παιδιά νηπιακής ηλικίας είναι διαμέσου της διατροφής. Η έκθεση μέσω της διατροφής είναι στα 52-74 ng/kg/day και η εκτιμώμενη έκθεση διαμέσου της εισπνοής είναι 0.24-0.41 ng/kg/day. Άλλη μελέτη δείχνει ότι τα νεογέννητα, λόγω του μικρού τους βάρους, εκτίθενται στα μεγαλύτερα επίπεδα BPA (24 μg/kg/day) [33]. Στον Πίνακα 4 φαίνεται η έκθεση στην BPA μέσω διαφόρων οδών και χρήσης διαφόρων υλικών.

<sup>3</sup> NOAEL, *No Observed Adverse Effects Level*-η μέγιστη έκθεση σε ένα χημικό στην οποία δεν παρατηρούνται δυσμενείς επιπτώσεις, ακόμα και όταν το χημικό καταναλώνεται καθημερινώς για το υπόλοιπο της ζωής του ανθρώπου.



**Πίνακας 4.** Έκθεση σε ποσά BPA, μέσω εισπνοής και δερματικής επαφής

| Στάδιο ζωής BPA               | Τύπος έκθεσης   | Έκθεση σε BPA (mg/day) |
|-------------------------------|-----------------|------------------------|
| Κατασκευή                     | Εισπνοή         | 0-9,6                  |
|                               | Δερματική επαφή | 882-3,1                |
| Χρήση 1: πολυανθρακικά υλικά  | Εισπνοή         | 0,7-2,7                |
|                               | Δερματική επαφή | 0,31-3,1               |
| Χρήση 2: έποξυ ρητίνες        | Εισπνοή         | 0-28                   |
|                               | Δερματική επαφή | 3,10                   |
| Χρήση 3: επιβραδυντικά φλόγας | Εισπνοή         | 0                      |
|                               | Δερματική επαφή | 3,10                   |

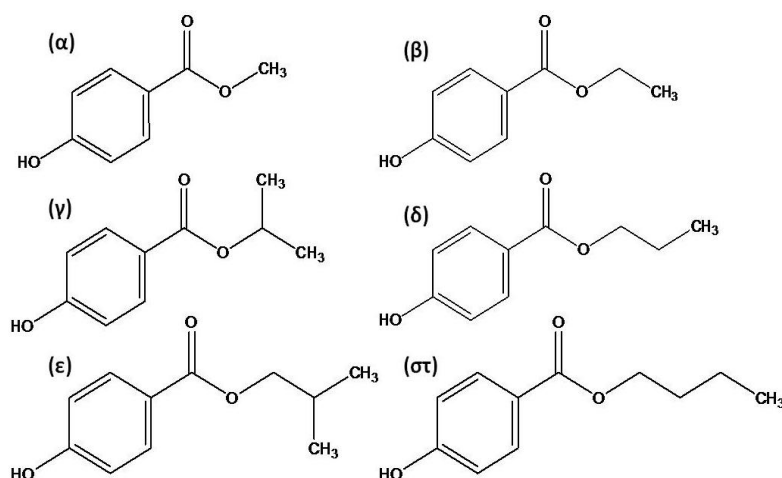
### **1.2.6 Εναλλακτικές λύσεις**

Για την αποφυγή ή την μείωση χρήσης της BPA υπάρχουν εναλλακτικές λύσεις. Πιθανοί αντικαταστάτες της BPA είναι το ακρυλικό, ο πολυεστέρας και το πολυπροπυλένιο. Όμως αυτά τα υλικά παρουσιάζουν και μειονεκτήματα, για παράδειγμα ο πολυεστέρας χαρακτηρίζεται από υψηλό κόστος και το πολυπροπυλένιο είναι ασταθές σε υψηλές θερμοκρασίες. Σε επιστρώσεις κονσερβών μπορούν να χρησιμοποιηθούν και συνθετικές ρητίνες καθώς και PVC. Άλλα υλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ταυτόχρονα είναι και ανακυκλώσιμα είναι τα εξής: το γυαλί, το αλουμίνιο, ο ανοξείδωτος χάλυβας. Στα πλαστικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν υψηλής πυκνότητας πολυαιθυλένιο και Grilamid TR-90. Τέλος, μια άλλη εναλλακτική λύση για την συσκευασία των τροφίμων και των ποτών αποτελούν οι συσκευασίες Tetra-Pak, που δημιουργούνται από συνθετικό χαρτί, πολυαιθυλένιο και αλουμινόχαρτο [18].

## 1.3 Παραβένια

### 1.3.1 Δομή και Φυσικοχημικές ιδιότητες των Παραβενίων

Τα παραβένια (Parabens, PBs) ανήκουν και αυτά στην ομάδα των ενδοκρινικών διαταρακτών (EDs) [34]. Αποτελούν μια ομόλογη σειρά εστέρων του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος (PHBA). Οι δομές των σημαντικότερων PBs φαίνονται στην Εικόνα 9 [35].



**Εικόνα 9.** (α) Μέθυλο-παραβένιο (MPB), (β) αίθυλο-παραβένιο (EPB), (γ) ισο-πρόπυλο-παραβένιο (iso-PPB), (δ) κ-πρόπυλο-παραβένιο (n-PPB), (ε) ισο-βούτυλο-παραβένιο (iso-BPB), (στ) κ-βούτυλο-παραβένιο (n-BPB)

Τα PBs είναι σταθερά σε όλη την κλίμακα του pH και επαρκώς διαλυτά στο νερό. Σε καθαρή μορφή είναι μικροί, άχρωμοι κρύσταλλοι χωρίς γεύση ή οσμή. Όπως φαίνεται και στον Πίνακα 5 η τάση λιποφιλίας στα PBs, τείνει να αυξάνεται όσο αυξάνεται και η αλκυλική αλυσίδα τους. Γενικά είναι σταθερά στον αέρα και δεν υδρολύονται σε όξινα διαλύματα.

Όσον αφορά την διαλυτότητα τους, τα PBs έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, αλλά μπορούν να διαλυθούν σε άλλα συστήματα σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 60 °C. Επιπλέον, τα μικρότερης αλυσίδας PBs διαλύονται στο νερό, ενώ τα μεγαλύτερης στους οργανικούς διαλύτες [38]. Εάν όλα τα PBs πρέπει να εισαχθούν στην υδατική φάση, γίνεται προθέρμανση του νερού. Στον Πίνακα 6 φαίνεται η διαλυτότητα των PBs σε διάφορους διαλύτες.

**Πίνακας 5.** Φυσικοχημικές ιδιότητες PBs [36,37]

| Χαρακτηριστικά   | MPB  | EPB   | PPB  | BPB  |
|------------------|--|---|--|--|
| Χημικός τύπος    | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub> | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> |
| Φυσική κατάσταση | Άχρωμος κρύσταλλος                           | Άχρωμος κρύσταλλος                            | Λευκός κρύσταλλος                              | Άχρωμος κρύσταλλος                             |
| Πυκνότητα        | 1,46g/cm <sup>3</sup>                        | 1,168g/cm <sup>3</sup>                        | 1,063 g/cm <sup>3</sup>                        | 1,28g/cm <sup>3</sup>                          |
| Τάση ατμών       | 2,37*10 <sup>-4</sup> mm Hg                  | 9,9*10 <sup>-5</sup> mm Hg                    | 5,55*10 <sup>-4</sup> mm Hg                    | 1,86*10 <sup>-4</sup> mm Hg                    |
| Μοριακό βάρος    | 152,16                                       | 166,18  | 180,21   | 194,23   |
| Σημείο τήξης     | 131  | 116-118                                       | 96-98  | 68-69  |
| Σημείο βρασμού   | 270-280                                      | 297-298                                       | -  | -  |
| logKow           | 1,96   | 2,47  | 3,04   | 3,57   |
| pKa              | 8,17   | 8,22  | 8,35   | 8,37   |

**Πίνακας 6.** Διαλυτότητα σημαντικότερων παραβενίων σε διάφορα μέσα [38]

| g/100g                           | MPB  | EPB  | n-PPB | n-BPB |
|----------------------------------|------|------|-------|-------|
| Νερό 15°C                        | 0,16 | 0,07 | 0,023 | 0,015 |
| Νερό 25°C                        | 0,25 | 0,12 | 0,04  | 0,15  |
| Νερό 80°C                        | 3,2  | 0,86 | 0,45  | 0,15  |
| Αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O 10% | 0,5  | -    | 0,1   | -     |
| Αιθανόλη σε H <sub>2</sub> O 50% | 18   | -    | 18    | -     |
| Αιθανόλη 100%                    | 52   | 72   | 95    | 200   |
| Γλυκερίνη                        | 1,7  | 0,6  | 0,4   | 0,4   |

### 1.3.2 Παραγωγή και Χρήσεις PBs

Τα PBs χρησιμοποιούνται ως αντιμικροβιακά συντηρητικά, ειδικότερα κατά της μούχλας και των ζυμών σε καλλυντικά και φαρμακευτικά προϊόντα και στην επεξεργασία ποτών και τροφίμων [39]. Μεμονωμένα ή σε συνδυασμούς, τα PBs χρησιμοποιούνται σε πάνω από 13.200 σκευάσματα [56]. Η αντιμικροβιακή τους δράση αυξάνεται, όσο το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας αυξάνεται [40]. Γενικά η μικροβιακή αντιγραφή συμβαίνει στην υδατική φάση και έτσι η ποσότητα των PBs

που διαλύονται εκεί, καθορίζει την ικανότητα διατήρησής τους. Γι' αυτόν το λόγο, τα MPB και PPB είναι αυτά που χρησιμοποιούνται περισσότερο σε σχέση με άλλα στα καλλυντικά σκευάσματα και στην επεξεργασία τροφίμων [40].

Τα PBs μπορεί να έχουν πολλαπλή βιολογική δραστικότητα, όμως πιστεύεται ότι η ανασταλτική τους δράση στη μεταφορά μεμβράνης και στην μιτοχονδριακή λειτουργία είναι το κλειδί για την δράση τους [35]. Όταν αναμιγνύονται δύο ή περισσότερα PBs, η αντιμικροβιακή τους δράση βελτιώνεται λόγω συνεριστικού φαινομένου.

Τα PBs εμφανίζονται φυσικά στα τρόφιμα αλλά παράλληλα προστίθενται σε αυτά για πάνω από 50 χρόνια. Έτσι, χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία λαχανικών, στα λίπη και στα έλαια, στα υποκατάστατα ζάχαρης, στους φρουτοχυμούς, στις σάλτσες, στα κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, σε συγκεντρώσεις μεταξύ 450-2000 ppm [35]. Το MPB έχει βρεθεί ότι είναι συστατικό του λευκού κρασιού, των βατόμουρων και κάποιων φρούτων του δάσους. Επίσης, πρόσφατα το PPB ανιχνεύθηκε στο φυτό *Stocksia brahuic* [35]. Στον Πίνακα 7, φαίνονται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια των PBs σε διάφορα τρόφιμα, που έχουν τεθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization).

**Πίνακας 7.** Μέγιστα επιτρεπτά όρια (mg/kg) παραβενίων [41,42]

| Ε.Ε Κατηγορία Τροφίμου                    | Μέγιστο επιτρεπτό όριο (mg/kg) |
|---|--------------------------------|
| Πατάτες, αλεύρι, δημητριακά, ξηροί καρποί | 300                            |
| Είδη ζαχαροπλαστέιου (εκτός σοκολάτας)    | 300                            |
| Υγρά διαιτητικά συμπληρώματα διατροφής    | 2000                           |

Τα PBs χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα καλλυντικά, γιατί χαρακτηρίζονται από χαμηλή τοξικότητα, αδράνεια, εύκολη βιοαποικοδόμηση, χαμηλό κόστος και μεγάλο εύρος εφαρμογών. Τα PBs χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στα φάρμακα στα μέσα του 1900 και από τότε χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά. Ταυτόχρονα, αποτελούν συστατικά των προϊόντων περιποίησης μαλλιών, ξυριστικών προϊόντων, ενυδατικών κρεμών και αποσμητικών [43]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα προϊόντα που περιέχουν PBs να έρχονται σε επαφή με το δέρμα, τα μαλλιά, τον βλεννογόνο. Επιπρόσθετο πλεονέκτημα αποτελεί η

εξαιρετική χημική σταθερότητα τους σε σχέση με το pH (4,5-7,5) και τη θερμοκρασία. Εξαιτίας της σταθερότητας τους σε υψηλές θερμοκρασίες, τα προϊόντα που περιέχουν PBs μπορούν να αποστειρωθούν με ασφάλεια χωρίς να χάσουν την αντιμικροβιακή τους δράση, ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης. Η συχνότητα με την οποία χρησιμοποιούνται τα PBs στα καλλυντικά είναι η ακόλουθη: MPB>EPB>PPB>BPB>BzPB. Η χρήση των PBs οροθετείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση, η οποία επιτρέπει την χρήση τους στα καλλυντικά σε συγκέντρωση  $\leq 0,4\%$  για το κάθε ένα και με συνολική μέγιστη συγκέντρωση  $0,8\%$  για όλα (EU Cosmetics Directive 76/768/EEC) [44].

Το PPB είναι ένα από τα πιο δραστικά PBs που χρησιμοποιούνται στη φαρμακευτική, κατά των μυκήτων. Πλήθος φαρμακευτικών σκευασμάτων συμπεριλαμβανομένων αναισθητικών, χαπιών, σιροπιών, ενέσιμων διαλυμάτων, περιέχουν PBs ως συντηρητικά [45]. Η FDA (Food and Drug Administration) διαπίστωσε εάν τα MPB και EPB χρησιμοποιούνται μόνο τους και σε συγκεντρώσεις δραστικές έναντι των μικροοργανισμών, δεν είναι κατάλληλα ως συντηρητικά σε οφθαλμιατρικά σκευάσματα γιατί προκαλούν ερεθισμό στα μάτια, όμως θεωρούνται μη δραστικά συστατικά σε οδοντόπαστες, αντισυλληπτικά, αναλγητικά κ.α [41].

### **1.3.3 Έκθεση στα PBs**

Όπως έχει προαναφερθεί, η έκθεση στον άνθρωπο γίνεται μέσω κατάποσης, εισπνοής και δερματικής επαφής. Η συνολική κατανάλωση των PBs από όλες τις πηγές υπολογίζεται  $75,78 \text{ mg/day}$  ( $1,26 \text{ mg/kg/day}$ ) για ένα μέσο άνθρωπο ( $60 \text{ kg}$ ) (FDA). Αναφορικά με την έκθεση στα MPB και PPB, σύμφωνα με την FDA, ο μέσος άνθρωπος υπολογίζεται να καταναλώνει  $0,6 \text{ mg/day}$  ( $0,01 \text{ mg/kg/day}$ ) και  $0,78 \text{ mg/day}$  ( $0,013 \text{ mg/kg/day}$ ) αντίστοιχα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση επιτρέπεται περιεχόμενο σε MPB και EPB στα τρόφιμα σε ποσότητα  $300 \text{ mg PB/kg}$  τροφίμου.

Στον Πίνακα 8 φαίνεται η υπολογιζόμενη έκθεση στα PBs, μέσω των διαφόρων οδών. Η έκθεση του ανθρώπου στα PBs μέσω του περιβάλλοντος είναι πολύ μικρή.

**Πίνακας 8.** Έκθεση σε PBs [35]

| Μέσο έκθεσης                                  | Υπολογιζόμενη έκθεση |
|---|----------------------|
| Τρόφιμα                                       | 1mg/day              |
| Καλλυντικά και προϊόντα καθημερινής φροντίδας | 50mg/day             |
| Φάρμακα                                       | 25mg/day             |

Ωστόσο νέες μελέτες παρουσιάζουν ότι η έκθεση μπορεί να γίνει μέσω της σκόνης που βρίσκεται σε εσωτερικούς χώρους. Τα PBs και ο κύριος μεταβολίτης τους (PHBA) ανιχνεύονται σε συγκεντρώσεις έως και μερικές χιλιάδες ng/g [46]. Τα MPB και PPB, συναντώνται περισσότερο στα δείγματα σκόνης. Έχει υπολογιστεί ότι η ημερήσια πρόσληψη σε PBs μέσω κατάποσης σκόνης είναι 5-10 φορές μεγαλύτερη στα παιδιά σε σχέση με τους ενήλικες. Η χρήση των PBs ως συντηρητικά στα τρόφιμα, στα φαρμακευτικά σκευάσματα και στα χημικά προϊόντα, έχει ως αποτέλεσμα την απελευθέρωση τους στο περιβάλλον δια μέσου των υγρών αποβλήτων. Τα περισσότερα συστατικά των καλλυντικών προϊόντων καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον είτε άμεσα, είτε έμμεσα. Τα PBs, στην ατμόσφαιρα υπάρχουν ως ατμός και μπορούν να κατακρημνιστούν λόγω της αντίδρασης με φωτοχημικά-παραγόμενες ρίζες υδροξυλίου. Ο χρόνος Ημιζωής γι' αυτή την αντίδραση στον αέρα υπολογίζεται να είναι 10-15 μέρες [47]. Ωστόσο δεν υπάρχουν δεδομένα για την μετρήσεις PBs στην ατμόσφαιρα. Στο έδαφος, είναι γρήγορα βιοαποικοδομήσιμα, όπου το MPB βιοαποικοδομείται πλήρως μέσα σε 6 μέρες. Στο νερό, τα MPB και EPB δεν προσκολλώνται σε αιωρούμενα στερεά, σε αντίθεση με τα PPB και BPB λόγω του  $\log K_{oc}^4$  τους που κυμαίνεται στα 3,04-3,57 [48]. Όλα τα PBs αποικοδομούνται στο περιβάλλον, ενώ δεν υπάρχουν πληροφορίες για το iso-PPB και το iso-BPB [42]. Στον Πίνακα 9 φαίνονται τα NOAEL και LOAEL<sup>5</sup> των PBs.

<sup>4</sup> Δείκτης της προσκόλλησης οργανικών ενώσεων σε στερεά και είναι αντιστρόφως ανάλογος με τη διαλυτότητα και ανάλογος με το μοριακό βάρος των ενώσεων

<sup>5</sup> LOAEL, Lowest Observed Adverse Effect Level Η χαμηλότερη συγκέντρωση ή ποσότητα μιας ουσίας που υπολογίζεται μέσω πειραμάτων ή παρακολούθησης και προκαλεί δυσμενείς αλλαγές στη μορφολογία, την λειτουργική ικανότητα, ανάπτυξη και διάρκεια ζωής ενός οργανισμού-στόχου σε αντίθεση με φυσιολογικούς οργανισμούς του ίδιου είδους, υπό καθορισμένες συνθήκες έκθεσης.

**Πίνακας 9.** NOAEL και LOAEL κυριότερων PBs [41,42]

| Ένωση | NOAEL (mg/kg/bw) | LOAEL(mg/kg/bw) |
|-------|------------------|-----------------|
| PHBA  | 0,5              | 5               |
| MPB   | 5,5              | 16,5            |
| EPB   | 6                | 18              |
| PPB   | 6,5              | 20              |
| BPB   | 0,7              | 7               |

Εν κατακλείδι, το μεγαλύτερο ποσοστό της ανθρώπινης έκθεσης στα PBs πραγματοποιείται μέσω της δερματικής επαφής κατά την χρήση καλλυντικών σκευασμάτων, ενώ η έκθεση μέσω των τροφίμων αντιστοιχεί σε ποσοστό μόνο 20%.

#### **1.3.4 Μεταβολισμός των PBs**

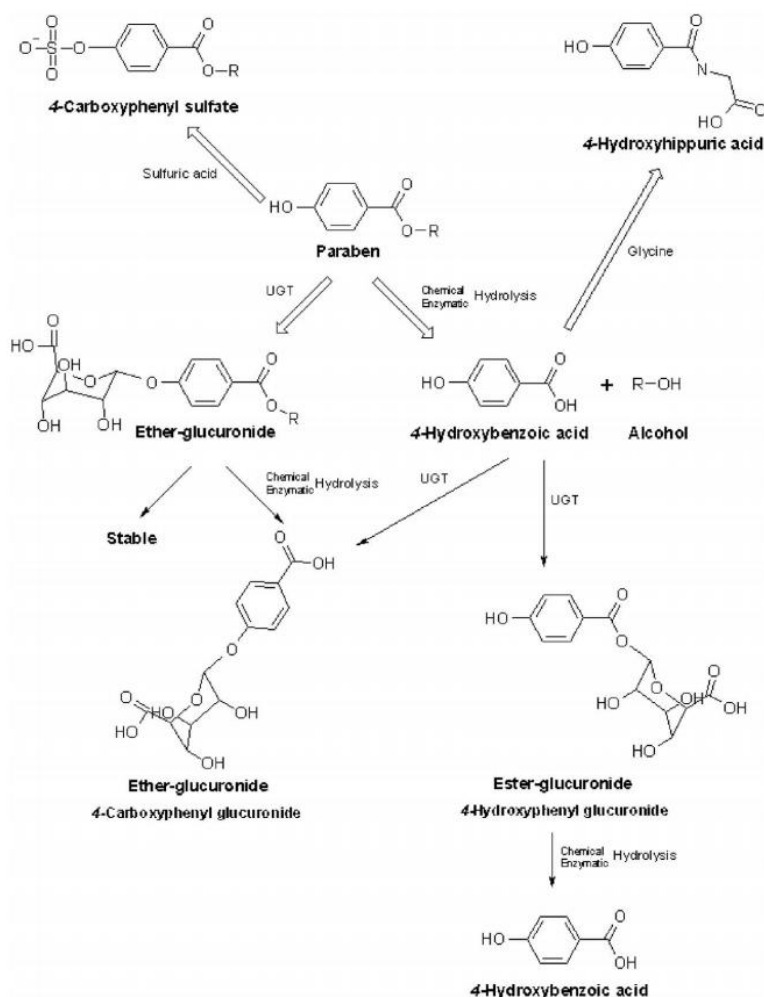
Γενικά, τα MPB, EPB, PPB, BPB, απορροφούνται πολύ καλά από το δέρμα και ο δεσμός τους με τον εστέρα διασπάται μέσω υδρόλυσης από ένζυμα που ονομάζονται εστεράσες, γεγονός που αποδεικνύεται από την ταχεία αποβολή τους και την υψηλή συγκέντρωσή τους στα ούρα.

Η απορρόφηση τους εξαρτάται από το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας και μειώνεται με την αύξηση του μήκους της. Από έρευνες που έχουν γίνει σε κουνέλια [49], έχει διαπιστωθεί ότι μετά από την δια του στόματος χορήγηση των MPB, EPB, PPB, BPB και μετά το πέρας 24 h, το 25-39% των PBs απεκκρίθηκε ως PHBA, το 25-29% ως σύζευγμα τους με γλυκίνη (p-Hydroxyhippuric acid, PHHA), το 5-8% ως γλουκουρονιδιομένος εστέρας, το 10-18% ως γλουκουρονιδιομένος αιθέρας και το 7-12% ως θειϊκό άλας.

Η παρουσία ανέπαφων PBs στα ούρα δείχνει ότι αυτές οι ενώσεις έχουν διαφύγει από το στάδιο του μεταβολισμού. Πιο αναλυτικά, οι ενώσεις αυτές καταφέρνουν να διαφύγουν από τις εστεράσες του δέρματος εάν η έκθεση είναι δερματική ή από το σύστημα μεταβολισμού του συκωτιού και του εντέρου, εάν η έκθεση είναι δια μέσου του στόματος.

Η σημαντικότητα αυτής της παρατήρησης έγκειται στο γεγονός ότι η κυριότερη έκθεση σε PBs, λαμβάνει χώρα μέσω του δέρματος, ενώ η έκθεση μέσω

της κατάποσης προϋποθέτει ακολούθως τον μεταβολισμό τους στο συκώτι και το έντερο, μειώνοντας έτσι την πιθανότητα της ύπαρξης ανέπαφων PBs στα ούρα.



**Εικόνα 10.** Μεταβολικές οδοί PBs στον άνθρωπο [50]

Τα PBs, που απορροφώνται από το δέρμα, μεταβολίζονται από τις καρβοξυλοεστεράσες και οι συζευγμένοι μεταβολίτες εκκρίνονται στα ούρα και τη χολή [44,51].

Έχει διαπιστωθεί ότι τα PBs με τις μεγαλύτερες αλκυλικές αλυσίδες φαίνεται να είναι λιγότερο τοξικά από αυτά με τις μικρότερες καθώς και από το PHBA, γεγονός που οφείλεται στον μεγαλύτερο χρόνο υδρόλυσης [52]. Επίσης, η διαφορά στην τοξικότητα των εστέρων με μεγάλη και μικρή αλυσίδα σχετίζεται με τις διαφορές στον μεταβολισμό. Η απέκκριση στα ούρα του ελεύθερου PHBA είναι χαμηλότερη όταν οι εστέρες είχαν μεγαλύτερες αλυσίδες. Επίσης η απέκκριση των συζευγμάτων



του PHBA με γλυκίνη ήταν μεγαλύτερη, όταν οι εστέρες είχαν μεγαλύτερες αλυσίδες [53,54,35]. Υπάρχουν δύο στάδια της αποτοξικοποίησης των PBs, κατά το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται γρήγορη απορρόφηση τους και απέκκριση τους ως PHBA στα ούρα ενώ κατά το δεύτερο πραγματοποιείται αποτοξικοποίηση μέσω του μεταβολισμού ως συζεύγματα με γλουκουρονικό οξύ,θειικό άλας και γλυκίνη [55]. Στην Εικόνα 10 φαίνονται και οι κύριοι μεταβολίτες των PBs, στον άνθρωπο.

### **1.3.5 Επιδράσεις των PBs στην Υγεία**

Τα PBs είναι λιπόφιλα και μπορούν να απορροφηθούν διαμέσου του δέρματος και να βρεθούν ανέπαφα στους ιστούς. Έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν την αύξηση *in vitro* των MCF-7 ανθρώπινων καρκινικών κυττάρων του μαστού και μπορούν να βρεθούν σε ποσότητες στους ιστούς έως 21 ng/g ιστού [56]. Επίσης μπορούν να επηρεάσουν και έμμεσα τα επίπεδα οιστρογόνων, μέσω της αναστολής της δράσης της σουλφοτρανσφοράς μέσα στο κυτοσόλιο των ανθρώπινων δερματικών κυττάρων. Έτσι αν αυτό το φαινόμενο πραγματοποιηθεί στους ιστούς του μαστού, τα PBs μπορούν να συνδεθούν με αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού [57].

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ομαδοποιήσει τα PBs στις «ουσίες πρώτης κατηγορίας», που είναι ουσίες οι οποίες έχουν κατηγορηθεί έστω και μια φορά για την διατάραξη του ενδοκρινικού συστήματος των ζωντανών οργανισμών [58]. Μελέτες τοξικότητας σε ζώα δείχνουν ότι το MPB είναι μερικώς μη τοξικό τόσο από την δια του στόματος όσο και από την παρεντερική οδό. Σε πληθυσμό με κανονικό δέρμα, είναι μερικώς μη ερεθιστικό.

Σε μελέτες με μακροχρόνια χορήγηση του MPB, το NOEL (No Observed Effect Level) διαπιστώθηκε στα 1050 mg/kg και το NOAEL στα ποντίκια, 5700 mg/kg [59]. Το MPB δεν είναι καρκινογόνο ή μεταλλαξιογόνο. Ο μηχανισμός της κυτταροτοξικής δράσης των PBs μπορεί να συνδέεται με μιτοχονδριακή βλάβη. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι προκαλούν δερματικές αντιδράσεις όταν έρθουν σε επαφή με το δέρμα και αλλεργικές αντιδράσεις μετά από κατάποση. Ευαισθησία στα PBs, έχει αναφερθεί και όταν εφαρμοστούν φαρμακευτικά σκευάσματα που τα περιέχουν, σε κατεστραμμένο δέρμα [59]. Επίσης, προκαλούν υπερτροφία στη μήτρα αρουραίων

[60]. Γενικά, όμως δεν είναι αποτελούν τους κυρίως υπεύθυνους παράγοντες για την πρόκληση διαταραχών στο ενδοκρινικό σύστημα [61]. Τα iso- και n- PPBs, έχουν οιστρογονικές και αντιανδρογονικές επιδράσεις *in vitro* και είναι λιγότερο ισχυρά από το BPB. Μελέτες για τις οιστρογονικές επιδράσεις τους έδειξαν πως η πρόσληψη 10-20 mg/kg bw/day (LOAEL) προκαλεί αύξηση του μεγέθους της μήτρας σε νεαρούς αρουραίους [62].

Το n-BPB έχει επιδράσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα των νεαρών αρουραίων καθώς μειώνει το ποσοστό σπέρματος στους απόγονους των αρουραίων όταν αυτοί έχουν εκτεθεί στο συγκεκριμένο BPB κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης ή του λακτισμού [63]. Επίσης οδηγεί στην υπερέκφραση των ανθρωπίνων κυττάρων HeLa<sup>6</sup> και των MCF-7 καρκινικών κυττάρων του μαστού [44]. Το iso-BPB, έχει οιστρογονικές επιδράσεις στα κύτταρα, σε *in vivo* μελέτες [64]. Επιδρά στην συναισθηματική συμπεριφορά (SCCS 2010) και έχει μεγαλύτερη οιστρογονική δραστικότητα από το iso-PPB.

### **1.3.6 Εναλλακτικές λύσεις**

Εναλλακτικά, ορισμένες βιταμίνες και λάδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στα καλλυντικά ως συντηρητικά. Το εκχύλισμα neem που προέρχεται από το δέντρο *Azadirachta indica* στην Ινδία είναι αντιβακτηριδιακό υλικό που όταν αναμειγνύεται με βότανα δημιουργεί ένα δραστικό υλικό. Το neorein, είναι ένα μείγμα από εκχυλίσματα φυτών που προστατεύει προϊόντα που έχουν ως βάση το νερό από βακτήρια και μύκητες. Το Phenoxyethanol, είναι μη τοξικό και προστατεύει από τα gram(+) και τα gram(-) βακτήρια, το οποίο πρέπει να χρησιμοποιείται μαζί με άλλα υλικά όπως σορβικό κάλιο (potassium sorbate) για να είναι δραστικό. Το σορβικό κάλιο, εκλαμβάνεται από σκόνη δάφνης, είναι αντιμικροβιακό και προστατεύει από ζύμες [65]. Επίσης φυσικά προϊόντα όπως thymol, cinnamaldehyde, allyl isothiocyanate [65,66]. Τέλος, το polyaminopropyl biguanide (πολυαμινοπροπυλικό διγουανίδιο), καταστρέφει gram(+) και gram(-) βακτήρια, δεν διαταράζει τις ορμόνες και δεν απελευθερώνει πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs). Το

---

<sup>6</sup> Ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα που αφαιρέθηκαν και ήταν τα πρώτα κύτταρα που όχι μόνο επιβίωσαν, αλλά αναπτύχθηκαν σε συνθήκες εργαστηρίου.

μειονέκτημα της χρήσης αντικαταστατών για τα PBs, είναι ότι αυτά τα υλικά θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε μεγάλες συγκεντρώσεις για να έχουν ικανοποιητικές επιδράσεις στα καλλυντικά, αυτό όμως μπορεί να προκαλέσει αλλεργίες [67].

#### **1.4 Αναλυτικές τεχνικές μέτρησης BPA και PBs σε βιολογικά δείγματα**

Οι τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα, όπως αυτό αναφέρεται στην βιβλιογραφία, για τη μέτρηση της BPA και των PBs, περιλαμβάνουν:

- Υγρή Χρωματογραφία συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) [11,71]
- Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ηλεκτροχημικό ανιχνευτή (HPLC-ECD) [68]
- Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή φθορισμού (HPLC-FLD) [69]
- ELISA (τεχνική που χρησιμοποιεί αντισώματα και την αλλαγή χρώματος για την ταυτοποίηση μιας ουσίας) [70]

Η κύρια τεχνική που εφαρμόζεται είναι η LC-MS/MS με πηγή ιοντισμού είτε ηλεκτροψεκασμό, είτε χημικό ιοντισμό ατμοσφαιρικής πίεσης. Αρχικά κατά την επεξεργασία των δειγμάτων ακολουθείται ενζυμική υδρόλυση με χρήση είτε του ενζύμου β-glucuronidase E.coli [11] για την μέτρηση των ελεύθερων και γλουκουρονιδιομένων μεταβολιτών είτε του ενζύμου β-glucuronidase H.Pomatia [11], για την μέτρηση των ελεύθερων, των γλουκουρονιδιομένων και των σουλφονιομένων μεταβολιτών των ενώσεων. Στη συνέχεια ως μέθοδος καθαρισμού ακολουθείται η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), είτε αυτόματη [11], είτε όχι [74]. Η ανάλυση γίνεται με δίδυμη φασματομετρία μάζας.

Επίσης για τον διαχωρισμό των δύο ισομερών των PBs έχουν χρησιμοποιηθεί UPLC [71,72] στήλες που οδηγούν σε επαρκή διαχωρισμό τους, γεγονός που αυξάνει το κόστος ανάλυσης. Τέλος στην βιβλιογραφία αναφέρεται πλήθος μελετών

[73,74,75,76] που έχουν ασχοληθεί με τον προσδιορισμό των BPA, PBs και των φθαλικών εστέρων στα ούρα αλλά σε καμία από αυτές ταυτόχρονα.

## **1.5 Σκοπός της μελέτης**

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των συνολικών (σε ελεύθερη και συζευγμένη μορφή) BPA και των PBs σε ανθρώπινα ούρα. Στο εργαστήριο μας έχει ήδη αναπτυχθεί μέθοδος ανίχνευσης φθαλικών μεταβολιτών. Αύτη η μέθοδος θα τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να ανιχνεύει ταυτόχρονα PBs, BPA και μεταβολίτες των φθαλικών εστέρων καθώς και να διαχωρίζει επαρκώς τα δύο ισομερή του PPB και του BPB. Τέλος, στόχος μας ήταν και η εφαρμογή της μεθόδου σε ικανοποιητικό αριθμό δειγμάτων τα οποία έχουν ήδη αναλυθεί για φθαλικούς μεταβολίτες ώστε να επιβεβαιωθεί η καταλληλότητα της.

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά που θέλουμε να προσδώσουμε στη μέθοδο είναι η ικανότητα ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας και η διατήρηση του κόστους ανάλυσης σε χαμηλά επίπεδα, χωρίς τη χρήση UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography) στηλών ή αυτοματοποιημένων συστημάτων εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).

## 2 Πειραματικό μέρος

### 2.3 Εκχύλιση στερεάς φάσης

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE) αποτελεί μια ευρύτατα χρησιμοποιούμενη τεχνική προετοιμασίας του προς ανάλυση δείγματος. Η SPE είναι αποτελεσματικότερη τεχνική από αυτήν της υγρής/υγρής εκχύλισης καθώς με αυτή πετυχαίνονται εύκολα ποσοτικοί διαχωρισμοί, είναι ταχύτερη στην εφαρμογή της και μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί. Χρησιμοποιείται κυρίως για την επεξεργασία υγρών δειγμάτων και την εκχυλιστική δέσμευση από αυτά ημιπτητικών ή μη πτητικών ενώσεων. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για στερεά δείγματα τα οποία προηγουμένως θα έχουν υποστεί εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη.

Κατά την διαδικασία της εκχύλισης, μπορεί να λάβουν χώρα οι παρακάτω διαδικασίες :

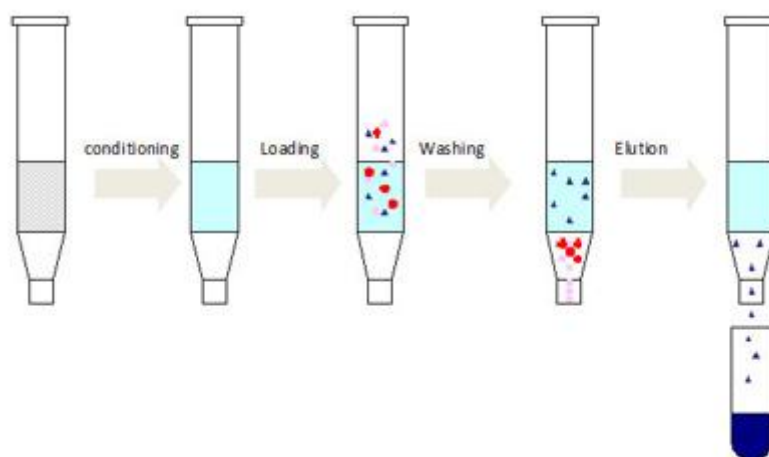
- **SPE "αντίστροφης φάσης"**: Μη πολικές ή ελάχιστα πολικές ενώσεις διαλυμένες σε πολικό διαλύτη (μήτρα δείγματος) κατακρατούνται από τη στατική φάση, η οποία περιέχει μη πολικές ομάδες. Εκλύονται από αυτήν με χρήση μη πολικών διαλυτών.
- **SPE "κανονικής φάσης"**: Πολικές ή μετρίως πολικές ενώσεις διαλυμένες σε μη πολικό διαλύτη (μήτρα δείγματος) κατακρατούνται από στατική φάση που περιέχει πολικές ομάδες. Εκλύονται από αυτήν με χρήση πολικών διαλυτών.
- **SPE "Ιονανταλλαγής"** : Ανταλλαγή ιόντων μεταξύ της στατικής φάσης και του διαλύτη έκλουσης.

Τα *πλεονεκτήματα* που παρουσιάζει η SPE έναντι άλλων τεχνικών εκχύλισης είναι:

- Μεγάλη επιλεκτικότητα
- Μπορεί να εφαρμοστεί σε πλήθος δειγμάτων
- Εμφανίζει μεγάλες ανακτήσεις και καλή επαναληψιμότητα
- Χρησιμοποιεί μικρούς όγκους διαλύτη

Τα βήματα που ακολουθούνται κατά την SPE (Εικόνα 11), είναι τα εξής:

- 1 Ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού με διέλευση κατάλληλου διαλύτη ή χρήση προενεργοποιημένων φυσιγγίων.
- 2 Διέλευση του δείγματος από τη στήλη κατά την οποία κατακρατείται είτε η επιθυμητή ουσία είτε οι προσμίξεις.
- 3 Έκπλυση των φυσιγγίων με διαλύτη για την απομάκρυνση τυχόντων προσμίξεων στο προσροφητικό υλικό.
- 4 Έκλυση των υπό μελέτη ουσιών με κατάλληλο διαλύτη, εάν αυτές είναι προσροφημένες στη στήλη.



**Εικόνα 11.** Απεικόνιση SPE [77]

#### **2.4 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης [78]**

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια τεχνική διαχωρισμού που χρησιμοποιείται στην ανάλυση οργανικών μορίων και ιόντων. Η HPLC βασίζεται στους μηχανισμούς προσρόφησης, κατανομής, ανταλλαγής ιόντων, αποκλεισμού μεγέθους και συγγένειας, ανάλογα με τον τύπο της στατικής φάσης που χρησιμοποιείται.

**Προσρόφηση:** Χρησιμοποιείται στήλη που περιέχει υλικό με μεγάλες προσροφητικές ικανότητες, με το οποίο τα πολικά μόρια αλληλεπιδρούν ισχυρά και αργούν να εξέλθουν από τη στήλη.

**Κατανομή:** Το υλικό της στατικής φάσης έχει καλυφθεί από ένα υγρό που δεν αναμιγνύεται με την κινητή φάση, οπότε πραγματοποιείται μια κατανομή των ουσιών του μίγματος μεταξύ των δύο υγρών. Όταν η στατική φάση είναι πολική και η κινητή μη πολική τότε ονομάζεται κανονικής φάσεως ενώ όταν συμβαίνει το αντίθετο ονομάζεται αντίστροφης φάσεως.

**Ανταλλαγή Ιόντων:** Η στατική φάση φέρει ιονισμένες ομάδες που μπορούν να ανταλλάξουν αντίθετα φορτισμένα ιόντα με τα συστατικά του μίγματος.

**Αποκλεισμός Μεγέθους:** εδώ τα μόρια διαχωρίζονται με βάση το μοριακό τους μέγεθος με τη βοήθεια πόρων. Τα μικρά μόρια "περιπλανώνται" μεταξύ των πόρων και αργούν να εξέλθουν από τη στήλη, ενώ τα μεγάλα που δεν χωρούν μέσα στους πόρους εξέρχονται γρήγορα.

**Συγγένεια:** Εδώ ο διαχωρισμός γίνεται με βιοχημικές αλληλεπιδράσεις τύπου αντιγόνου-αντισώματος.

Η HPLC περιλαμβάνει μια στερεή στατική φάση που είναι πακεταρισμένη μέσα σε μια στήλη από ανοξείδωτο χάλυβα και μια υγρή κινητή φάση. Ο διαχωρισμός των ενώσεων ενός διαλύματος προκύπτει από τον διαφορετικό βαθμό κατανομής των ενώσεων μεταξύ των δύο φάσεων.

Γενικά, ο χρόνος κατακράτησης των ενώσεων στην στατική φάση, εξαρτάται από:

- τη χημική δομή του συστατικού
- τη χημική σύνθεση και το pH της στατικής φάσης
- την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης
- τη θερμοκρασία

Συνεπώς με το να αλλάζουμε αυτές τις παραμέτρους, μπορούμε να πετύχουμε καλύτερο διαχωρισμό.

Ο τύπος χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν **αντίστροφης φάσης** (Reversed Phase Liquid Chromatography), στην οποία η κινητή φάση είναι πολική ενώ η στατική φάση άπολη, διαθέτει δηλαδή υδρόφοβες ομάδες. Σε μια τέτοια χρωματογραφία, οι ενώσεις εξέρχονται από τη στήλη με ελαττωμένη σειρά πολικότητας, καθώς η άπολη στήλη κατακρατά περισσότερο τις άπολες ενώσεις.

#### **2.4.1 Οργανολογία [77]**

##### **Σύστημα παροχής κινητής φάσης**

Η κινητή φάση παρέχεται με τη βοήθεια αντλιών υψηλής πίεσης που παρέχουν είτε ισοκρατική, είτε βαθμιδωτή έκλουση. Στο ισοκρατικό πρόγραμμα έκλουσης, η σύσταση της κινητής φάσης παραμένει σταθερή καθ'όλη τη διάρκεια της χρωματογραφίας, ενώ στο βαθμιδωτό πρόγραμμα το οποίο και χρησιμοποιήσαμε η σύσταση της κινητής φάσης αλλάζει ανάλογα με το πρόγραμμα έκλουσης, πράγμα το οποίο βελτιώνει το χρόνο διαχωρισμού χωρίς μείωση της διαχωριστικής ικανότητας ( $R_s$ ). Επίσης το σύστημα διαθέτει δοχεία κινητής φάσης τα οποία περιέχουν τους διαλύτες, οι οποίοι πρέπει να είναι είτε διαφορετικής πολικότητας, είτε διαφορετικού pH, είτε διαφορετικής ιονικής ισχύος.

Οι διαλύτες θα πρέπει να είναι καθαροί και να απαερώνονται συχνά για την αποφυγή φυσαλίδων. Τέλος στο σύστημα υπάρχει και συσκευή απόσβεσης παλμών που δημιουργούνται από την αντλία και αυξάνουν το θόρυβο στο χρωματογράφημα.

Γενικά το pH της κινητής φάσης επηρεάζει το χρόνο έκλουσης των ιονισμένων αναλυτών. Αλλάζοντας το, μπορεί να αλλάξει ο βαθμός στον οποίο ιονίζονται οι αναλύτες, η υδροφοβικότητα τους, ο βαθμός με τον οποίο αλληλεπιδρούν με την στατική φάση και η κατακράτηση τους από τη στήλη. Συνεπώς το pH της κινητής φάσης πρέπει να ρυθμίζεται με βάση τις ιδιότητες του αναλύτη.

##### **Σύστημα Εισαγωγής Δείγματος**

Αποτελείται από περιστρεφόμενη βαλβίδα υψηλής πίεσης με βρόγχο δείγματος, η οποία είναι ένας ακίνητος χαλύβδινος κύλινδρος με έξι διαύλους. Στη



θέση φορτώσεως «load», η κινητή φάση προωθείται προς τη στήλη και ο βρόγχος δείγματος, πληρώνεται με σύριγγα. Στη θέση injection, η κινητή φάση παρασύρει ποσοτικά τον όγκο του δείγματος και τον προωθεί στη στήλη.

### Στήλη

Η στήλη διαχωρισμού είναι ένας ευθύγραμμος σωλήνας, κατασκευασμένος από χάλυβα που περιέχει τη στατική φάση. Η επιλογή μιας στήλης στηρίζεται στο εάν έχει υψηλή διαχωριστική ικανότητα, υψηλό ποσοστό άνθρακα που προσφέρει καλό διαχωρισμό, καλής ποιότητας silica, για να μην κάνουν «ουρά» οι ενώσεις, να είναι εκλεκτική και τέλος να έχει μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών.

### Ανιχνευτής

Με την βοήθεια του ανιχνευτή, μετράται η ποσότητα των ενώσεων που εξέρχονται από τη στήλη. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας καλός ανιχνευτής, είναι να αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μίγματος (γενικός ανιχνευτής) ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα αποκρίσεως (ειδικός ανιχνευτής), να έχει χαμηλά όρια ανίχνευσης, να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση, να παρέχει γραμμική απόκριση, να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας ροής του υγρού εκλούσεως καθώς και να έχει αμελητέο νεκρό όγκο, ώστε να μην συμμετέχει στη διεύρυνση ζώνης κάθε συστατικού και κατά συνέπεια της κορυφής του.

### Καταγραφέας

Αποτελείται από ένα Η/Υ εφοδιασμένο με κατάλληλο λογισμικό το οποίο συλλέγει και επεξεργάζεται τα αποτελέσματα.

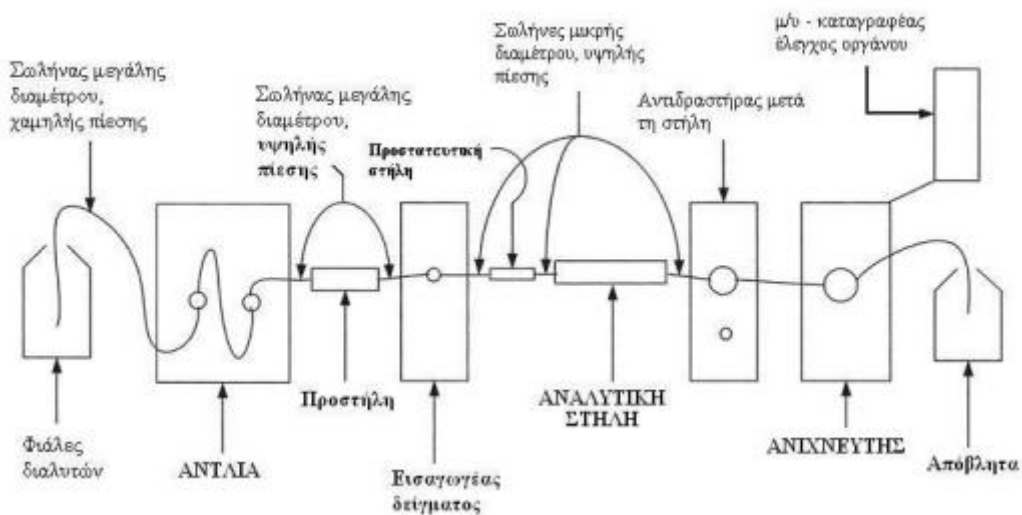
### Εφαρμογές

Η HPLC χρησιμοποιούμενη μαζί με τον κατάλληλο ανιχνευτή, μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο, με πολλές εφαρμογές.

- Στον προσδιορισμό συγκεντρώσεων φαρμάκων σε βιολογικά υγρά (ούρα, αίμα, σπέρμα, μητρικό γάλα, σάλιο)

- Για anti-doping control με προσδιορισμό αναβολικών σε αίμα και ούρα αθλητών
- Για προσδιορισμό συντηρητικών σε τρόφιμα και καλλυντικά
- Για τον διαχωρισμό και την απομόνωση ενώσεων μεγάλης καθαρότητας σε μεγάλες ποσότητες από μίγματα.
- Για τον προσδιορισμό τοξικών οργανικών και οργανομεταλλικών ενώσεων σε περιβαλλοντικά δείγματα.

Στην Εικόνα 12 φαίνεται ένα τυπικό σύστημα HPLC.



Εικόνα 12. Απεικόνιση συστήματος υγρής χρωματογραφίας

## 2.5 Φασματομετρία Μάζας [79]

Η φασματομετρία μάζας, (MS) όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 13 αποτελεί μια τεχνική όπου, φορτισμένα είδη (ιόντα), μπορούν να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν, ανάλογα με το κλάσμα της μάζας προς το φορτίο τους.

Η MS είναι μια από τις πιο ευαίσθητες μεθόδους, για την ανάλυση μορίων και έχει τη δυνατότητα να δίνει πληροφορίες για τη δομή του αναλύτη με υψηλή ευαισθησία. Η περίπτωση να γίνει σύζευξη της τεχνικής αυτής με άλλες τεχνικές όπως η χρωματογραφία, αυξάνει την “δύναμη” της τεχνικής, όταν έχουμε ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων.

Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται ένα **σύστημα Φασματομετρίας Μάζας** είναι :

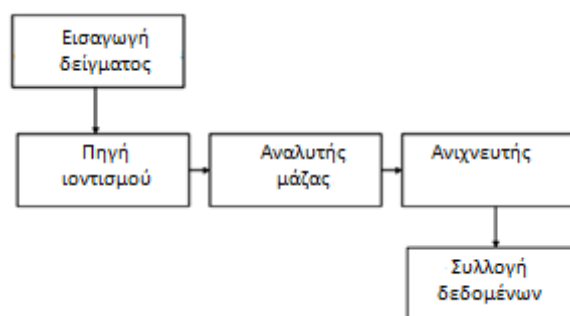
- το σύστημα κενού, που αποτελείται από δύο αντλίες, την μηχανική που δημιουργεί το προκενό ( $\sim 10^{-3}$  Torr) και την διάχυσης ή στροβιλομοριακή που δημιουργεί το υψηλό κενό ( $\sim 10^{-6}$ - $10^{-9}$  Torr).
- το σύστημα εισαγωγής δείγματος (sample introduction), όπου η έγχυση του δείγματος στην πηγή ιοντισμού γίνεται συνήθως με τριχοειδή σωλήνα που επιτρέπει την είσοδο μικρών ποσοτήτων δείγματος στο MS, χωρίς να επηρεάζεται το κενό.
- το σύστημα ιοντισμού (ion source). Ευρέως χρησιμοποιούμενοι είναι ο χημικός ιοντισμός και ο ηλεκτρονικός ιοντισμός (στην αέρια χρωματογραφία), και ο ηλεκτροψεκασμός καθώς και ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (στην υγρή χρωματογραφία).

Στον ιοντισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure ionization-API), η σύνθεση του δείγματος, οι διαλύτες, το ρυθμιστικό διάλυμα και τα συστατικά της μήτρας, επηρεάζουν τον ιοντισμό και κατά συνέπεια το αποτέλεσμα της ανάλυσης.

- τον αναλυτή μάζας (mass analyzer), που μπορεί να είναι τετράπολο, αναλυτής χρόνου πτήσης, παγίδα ιόντων ή αναλυτής διπλής εστίασης, οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συνδυασμούς. Οι αναλυτές μάζας, χωρίζουν τα ιόντα, βασιζόμενοι σε διαφορετικές φυσικές ιδιότητες. Η επιλογή του τύπου του οργάνου, εξαρτάται από τις απαιτήσεις της ανάλυσης. Σημαντικοί παράγοντες, είναι το εύρος μάζας, η ευαισθησία, η δυνατότητα για διαδοχική φασματομετρία μαζών (MS/MS) κ.α.
- ο ανιχνευτής ιόντων (ion detector), με τη χρήση του οποίου γίνεται φανερή η παρουσία των ενώσεων που εξέρχονται από τη στήλη και μετράται η

συγκέντρωση τους στην κινητή φάση. Ως ανιχνευτής, χρησιμοποιείται ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής.

- το σύστημα συλλογής δεδομένων (data handling system), το οποίο αποτελείται από υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό που επεξεργάζεται τα δεδομένα.



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση των βασικών μερών ενός Φασματομέτρου Μάζας

### **2.5.1 Πηγή Ηλεκτροψεκασμού (ESI)** [78]

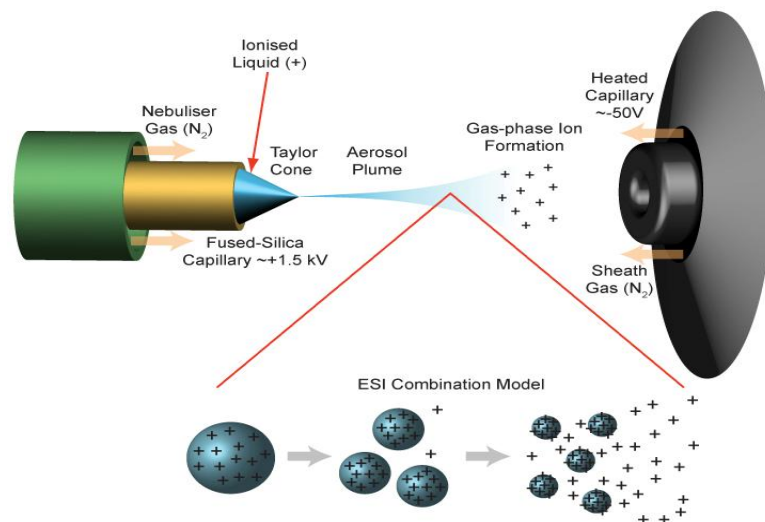
Η τεχνική του ESI, χρησιμοποιείται ευρέως για ανάλυση πολικών ενώσεων και καθιστά δυνατή την ανάλυση θερμικά ασταθών ενώσεων ή ενώσεων υψηλού μοριακού βάρους οι οποίες παρουσιάζουν προβλήματα στην ανάλυση τους με τη συνήθη τεχνική της Φασματομετρίας Μάζας.

#### Αρχές λειτουργίας

- Ένα υγρό μέσα στο οποίο έχουν διαλυθεί οι αναλύτες, περνάει μέσω τριχοειδούς σωλήνα, σε ατμοσφαιρική πίεση και διατηρείται σε υψηλό δυναμικό.
- Λόγω του δυναμικού, το ρεύμα του υγρού «σπάει» και δημιουργούνται σταγόνες με υψηλό φορτίο, οι οποίες διαλύονται καθώς περνούν δια μέσου της περιοχής ατμοσφαιρικής πίεσης της πηγής.
- Η διάλυση αυτή υποβοηθείται από το ρεύμα βοηθητικού αερίου Αζώτου, που περνάει συνεχώς από την περιοχή στην οποία δημιουργούνται οι σταγόνες.

- Το μέγεθος των σταγόνων μειώνεται συνεχώς λόγω της εξάτμισης του διαλύτη, οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας του φορτίου της επιφάνειας και σε μείωση της ακτίνας της σταγόνας.
- Η δύναμη του ηλεκτρικού πεδίου μέσα στη φορτισμένη σταγόνα, φτάνει σε ένα κρίσιμο σημείο όπου είναι κινητικά και ενεργειακά δυνατό για τα ιόντα της επιφάνειας να εκτοξευθούν στην αέρια φάση.
- Τέλος, τα ιόντα που έχουν δημιουργηθεί επιταχύνονται μέσα στο φασματόμετρο μάζας.

Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους ιοντισμού, εδώ τα ιόντα που παράγονται μπορεί να είναι πολυφορτισμένα. Στην Εικόνα 14 φαίνεται ο μηχανισμός ιοντισμού σε μια πηγή ESI.



Εικόνα 14. Μηχανισμός ιοντισμού με ESI [80]

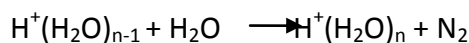
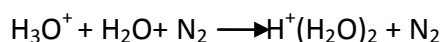
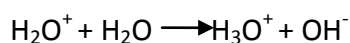
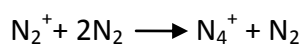
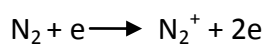
### 2.5.2 Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (APCI) [81]

Ο Χημικός Ιοντισμός Ατμοσφαιρικής Πίεσης (APCI) (Εικόνα 15), είναι μια τεχνική ιοντισμού στην αέρια φάση. Το δείγμα που πρόκειται να αναλυθεί εισάγεται στον εκνεφωτή και αποδιαλυτώνεται μέσα σε ένα θερμαινόμενο σωλήνα πριν τη δημιουργία ιόντων. Πιο συγκεκριμένα, το διάλυμα που εκλούεται από τη

στήλη εισέρχεται στον εκνεφωτή και μετατρέπεται σε σταγόνες οι οποίες οδηγούνται στον θερμαινόμενο σωλήνα μέσω ροής αερίου  $N_2$ . Στη συνέχεια ο αναλύτης και η κινητή φάση εξατμίζονται και τα σωματίδια που προκύπτουν έρχονται σε επαφή με τα ιόντα  $N^{2+}$  και  $N^{4+}$  που παράγονται από τη βελόνα εκκένωσης (corona discharge).

Έπειτα, λαμβάνει χώρα μια σειρά αντιδράσεων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό  $H_3O^+$  και  $(H_2O)_nH^+$  ως δευτερεύοντα προϊόντα, τα οποία στη συνέχεια συγκρούονται με τα μόρια του αναλύτη και οδηγούν στο σχηματισμό πρωτονιομένων ιόντων που αναλύονται.

Οι αντιδράσεις που πραγματοποιούνται στη βελόνα εκκένωσης είναι:

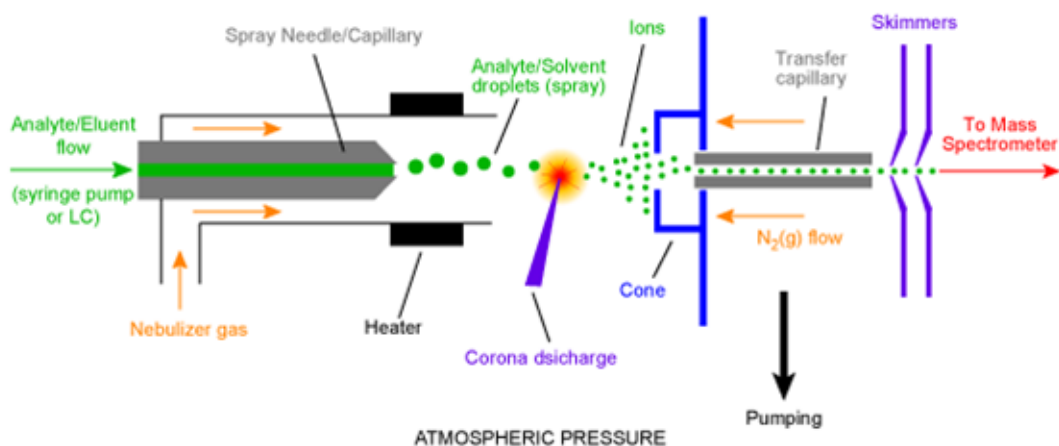


Η τεχνική αυτή βρίσκει εφαρμογές, στον ιοντισμό ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους και δεν είναι κατάλληλη για τον ιοντισμό θερμικά ασταθών ενώσεων. Επίσης παράγει μονοσθενή ιόντα και συνεπώς δεν είναι κατάλληλη για μακρομόρια.

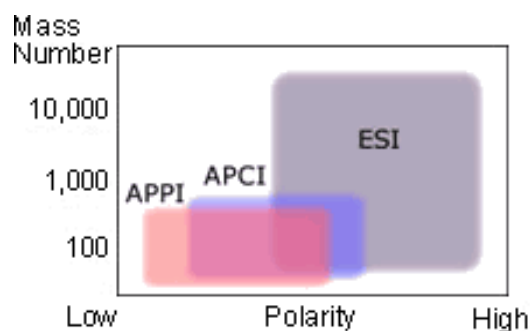
### Συνοπτικά

Ο APCI,

- Είναι τεχνική για θερμικά σταθερές ενώσεις ( $T \sim 600$  °C)
- Για μικρά μόρια
- Είναι τεχνική που δουλεύει καλύτερα σε μη πολικές ενώσεις
- Παράγονται κυρίως μοριακά ιόντα



**Εικόνα 15.** Σχηματική απεικόνιση συστήματος Χημικού Ιοντισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης [82]



**Εικόνα 16.** Σύγκριση πηγών ιοντισμού [83]

Στην Εικόνα 16, απεικονίζεται κατά προσέγγιση η καταλληλότερη τεχνική σε σχέση με τα Μοριακό Βάρος (Μ.Β) και την πολικότητα των αναλυτών. Όπως φαίνεται ο ESI αποτελεί καταλληλότερη τεχνική για υψηλής πολικότητας και σχετικά υψηλού Μ.Β ενώσεις ενώ ο APCI χρησιμοποιείται για μέτριας πολικότητας και σχετικά μικρού Μ.Β ενώσεις.

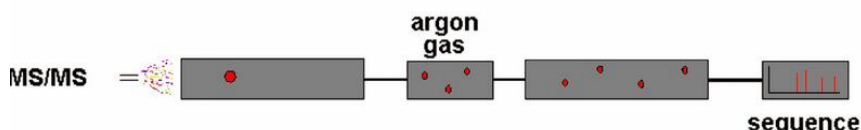
### 2.5.3 Αναλυτής Μάζας [84]

Ως αναλυτής μαζών χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα με τρία τετράπολα (Εικόνα 18). Το πρώτο και το τρίτο τετράπολο αποτελούν τους αναλυτές μαζών και το δεύτερο, αποτελεί κυψελίδα πρόσκρουσης (Εικόνα 17). Ο τετραπολικός αναλυτής αποτελείται από τέσσερις, παράλληλα τοποθετημένες μεταλλικές ράβδους, ίδιου

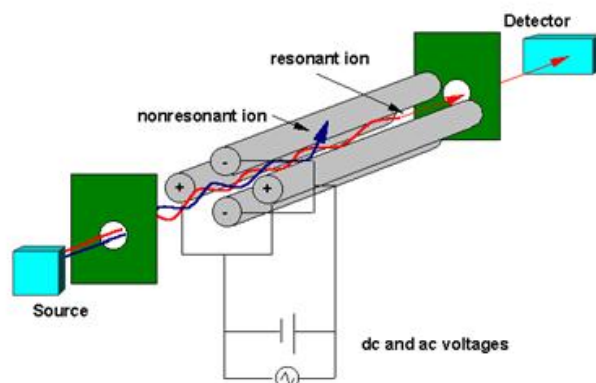
μήκους και ίδιας διαμέτρου. Κάθε ράβδος, είναι ηλεκτρικά συνδεδεμένη με την απέναντι ράβδο ενώ σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται δυναμικό. Η ακτίνα ιόντων εισάγεται στον κεντρικό άξονα του τετραπολικού αναλυτή και τα ιόντα κάτω από την επίδραση εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου αρχίζουν να ταλαντώνονται. Ο βαθμός ταλάντωσης εξαρτάται από τη μάζα και το φορτίο. Έτσι ανάλογα με το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο, ιόντα συγκεκριμένου λόγου  $m/z$  διέρχονται μέσω των ράβδων και εστιάζονται στον ανιχνευτή, ενώ τα υπόλοιπα ιόντα εκτρέπονται από το τετράπολο. Στη συνέχεια τα ιόντα που επιλέγονται με βάση το  $m/z$ , μετρώνται με τη χρήση ανιχνευτή.

Πιο συγκεκριμένα,

- το μητρικό ή πρόδρομο ιόν (parent or precursor ion), παράγεται στην πηγή ιοντισμού και επιλέγεται από το πρώτο τετράπολο (Q1)
- το ιόν οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο που αποτελεί την κυψελίδα πρόσκρουσης και εκεί με περίσσεια αδρανούς αερίου (αργού), παράγονται τα θυγατρικά ιόντα (product ions) (q2)
- στο τρίτο τετράπολο γίνεται ο διαχωρισμός και η ανίχνευση των θυγατρικών ιόντων (Q3)



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας [85]



Εικόνα 18. Σχηματική απεικόνιση τετραπόλου [86]



#### 2.5.4 Τεχνική Σάρωσης με Μελέτη Χαρακτηριστικών Αντιδράσεων (SRM)

Με την συγκεκριμένη τεχνική όπως αναπαρίσταται και στην Εικόνα 19, παρακολουθείται και ποσοτικοποιείται συγκεκριμένο θραύσμα ιόντος από μια πολύπλοκη μήτρα.

Προσδιορίζεται έτσι το πρόδρομο ιόν με βάση το λόγο της μάζας προς το φορτίο ( $m/z$ ) και παρακολουθούνται ένα ή περισσότερα θυγατρικά ιόντα. Η τεχνική SRM είναι πολύ πιο επιλεκτική σε σχέση με την SIM (Selected Ion Monitoring), στην οποία επιλέγεται να παρακολουθείται ένα ιόν ή μια ομάδα ιόντων μιας ένωσης, με αποτέλεσμα όμως άλλες παρεμποδιστικές ενώσεις που δίνουν ιόντα με τον ίδιο λόγο  $m/z$  κατά την θραυσματοποίηση, να οδηγούν σε θετικά σφάλματα και τελικά να προσδιορίζεται ποσότητα ιόντων (ένταση σήματος) μεγαλύτερη από αυτή που αντιστοιχεί στην προσδιοριζόμενη ουσία. Στην SRM όμως, κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει καθώς θα πρέπει η παρεμποδίζουσα ένωση να παράγει πρόδρομο ιόν με  $m/z$  ίδιο με αυτό της υπό ανάλυση ένωσης και επίσης το πρόδρομο αυτό ιόν να διασπαστεί σε θυγατρικά ιόντα, ένα από τα οποία θα πρέπει να έχει το ίδιο  $m/z$  με θυγατρικό ιόν της υπό ανάλυση ένωσης.

Η ευαισθησία του MS/MS θα εξαρτηθεί από το πόσο καλά συμπεριφέρεται η ένωση κατά τον αρχικό ιοντισμό. Παράμετροι που επηρεάζουν την ευαισθησία και βελτιστοποιούνται ώστε να πάρουμε το πιο άφθονο θραύσμα είναι, η **ενέργεια πρόσκρουσης (collision energy)** και το **αέριο πρόσκρουσης (collision gas)**. Η πολύ μεγάλη (CE), μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια σημαντικών κορυφών θραυσμάτων και η πολύ μικρή τη μη ικανοποιητική θραυσματοποίηση.



Εικόνα 19. Σχηματική απεικόνιση SRM

## 2.6 Υλικά και μέθοδοι

### 2.6.1 Αντιδραστήρια

Η BPA, η d16-BPA και τα PHBA, MPB, EPB, n-PPB, iso-PPB, n-BPB, iso-BPB, BzPB, HeptylPB προμηθεύτηκαν από το Laboratory Labor Dr. Ehrenstorfer-GmbH (Germany). Τα 4-methyl-UMB και το επισημασμένο  $^{13}\text{C}_4$ -4-methyl-UMB, προμηθεύτηκαν από την Cambridge Isotope Laboratories (USA). Τα επισημασμένα παραβένια  $^{13}\text{C}_6$ -MPB,  $^{13}\text{C}_6$ -EPB,  $^{13}\text{C}_6$ -nPPB,  $^{13}\text{C}_6$ -nBPB, το 4-methyl-UMB-glucuronide, το 4-methyl-UMB-sulphate, το υδροξείδιο του αμμωνίου 28% ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), οι διαλύτες ακετονιτρίλιο (ACN), οξικός αιθυλεστέρας ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ) και μεθανόλη ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), τύπου ChromaSoln for HPLC, το φορμικό οξύ (για HPLC-MS) και το ένζυμο H.Pomatia  $\beta$ -glucuronidase (Τύπου H-1,  $\geq 300,000$  units/g) προμηθεύτηκαν από την Sigma Aldrich (Germany). Το ένζυμο E.Coli  $\beta$ -glucuronidase, 140 μονάδες ενεργότητας/mL, προμηθεύτηκε από τη Roche. Το οξικό αμμώνιο ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ) και το δισόξινο φωσφορικό νάτριο ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) προμηθεύτηκαν από τη Fluka. Το Φωσφορικό οξύ 85% ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) προμηθεύτηκε από την Riedel de Haen. Η στήλη χρωματογραφίας ήταν Betasil Phenyl 3 $\mu\text{m}$ , 100 \* 2.1 mm της εταιρίας Thermo Finnigan (USA). Το απιοντισμένο νερό (nanopure) που χρησιμοποιήθηκε είχε ειδική αντίσταση 18.2  $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$  και ήταν PURELAB Ultra Ionic purification system, ELGA (USA).

### 2.6.2 Φυσίγγια (cartridges) για SPE

Τα φυσίγγια των 60 και 200 mg που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Nexus, Varian, (USA) και μπορούν να δράσουν είτε ως κανονικής, είτε ως αντίστροφης φάσης ανάλογα με το pH του διαλύτη που χρησιμοποιείται σε κάθε έκλουση. Ως πληρωτικό υλικό έχουν μίγμα συμπολυμερών, σφαιρικού σχήματος με διάμετρο 70 $\mu\text{m}$ .

### 2.6.3 Διαλύματα

Τα πρότυπα διαλύματα των PBs της BPA και των ιχνηθετημένων PBs παρασκευάστηκαν σε συγκέντρωση 250 µg/mL σε μεθανόλη, και φυλάχθηκαν σε γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια όγκου 4 mL, με καπάκια από Teflon στους -20 °C. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για τις βελτιστοποιήσεις των παραμέτρων του MS παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη/νερό 1:1, σε συγκέντρωση 1 µg/mL και αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό των δειγμάτων και των καμπύλων βαθμονόμησης παρασκευάστηκαν σε συγκεντρώσεις 2-8 µg/mL σε συνθετικά ούρα. Τα πρότυπα διαλύματα των 4-methyl-UMB-glucuronide και 4-methyl-UMB-sulphate παρασκευάστηκαν σε νερό σε συγκέντρωση 1000 µg/mL. Επίσης οι καμπύλες βαθμονόμησης, τα τυφλά δείγματα, και τα δείγματα των ανακτήσεων παρασκευάστηκαν σε συνθετικά ούρα τα οποία περιείχαν: 500 mL απιοντισμένο νερό, 3.8 g χλωριούχο κάλιο, 8.5 g χλωριούχο νάτριο, 24.5 g ουρία, 1.03 g κιτρικό οξύ, 0.34 g ασκορβικό οξύ, 1.18 g φωσφορικό κάλιο, 1.4 g κρεατινίνη, 0.64 g υδροξείδιο του νατρίου, 0.47 g διανθρακικό νάτριο και 0.28 mL θειικό οξύ [93]. Τέλος για την ανάλυση των PBs χρησιμοποιήθηκαν τα ιχνηθετημένα ανάλογα τους ως εσωτερικά πρότυπα και για την BPA χρησιμοποιήθηκε το  $^{13}\text{C}_6$ -BPB.

Τα ρυθμιστικά διαλύματα (buffers) ήταν τα ακόλουθα: Διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  /  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (buffer ενζύμου E.coli β-glucuronidase) το οποίο παρασκευάστηκε με προσθήκη 10 µL του ενζύμου β-glucuronidase E.Coli σε υδατικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  και ρύθμιση pH στο 6,5 μετά από προσθήκη  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , δ/μα  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (buffer ενζύμου β-glucuronidase H.Pomatia) το οποίο παρασκευάστηκε με προσθήκη 2mg/mL του ενζύμου σε υδατικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONa}$  συγκέντρωσης 1M και ρύθμιση του pH στο 5.0, δ/μα  $\text{NH}_4\text{OH}$  (βασικό buffer), με διάλυση  $\text{NH}_4\text{OH}$  28% σε 1:1 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  και δ/μα  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  /  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (όξινο buffer) με παρασκευή υδατικού διαλύματος  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  και ρύθμιση του pH στο 2,0 μετά από προσθήκη  $\text{H}_3\text{PO}_4$ .

Επίσης αξίζει να αναφερθεί ότι λόγω των διακυμάνσεων της πυκνότητας των ούρων, είναι απαραίτητο να μετρηθεί η κρεατινίνη των ούρων, ώστε να γίνει κανονικοποίηση των συγκεντρώσεων.

#### **2.6.4 Ενόργανη Ανάλυση**

Το σύστημα HPLC που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρίας (Thermo Finnigan, USA), αποτελούταν από μια αντλία (Surveyor LC pump), αυτόματο δειγματολήπτη (Surveyor Autosampler) καθώς και βρόγχο δείγματος χωρητικότητας 20μL. Η στήλη χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε με τον ESI ήταν μια **BetaSil Phenyl 3μm, 100 \*2.1 mm**, Thermo scientific (USA).

Ο Φασματογράφος Μάζας ήταν TSQ Quantum της εταιρίας Thermo Finnigan, (USA), ως πηγή ιοντισμού διέθετε είτε Ηλεκτροψεκασμό, είτε Χημικό Ιοντισμό Ατμοσφαιρικής Πίεσης και ως αναλυτή μάζας, ένα σύστημα τριών τετραπόλων. Ο ανιχνευτής του συστήματος, ήταν ηλεκτροπολλαπλασιαστής και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Xcalibur.

#### **2.6.5 Συνθήκες Φασματογράφου Μάζας**

Ως πηγή ιοντισμού επιλέχθηκε ο Ηλεκτροψεκασμός (ESI) και ήταν ρυθμισμένος στον αρνητικό ιοντισμό. Το αέριο εκνέφωσης (sheath gas) και το αέριο ξήρανσης (auxiliary gas) ήταν το N<sub>2</sub> και το αέριο πρόσκρουσης (collision gas) το Ar, ρυθμισμένο στα 2 mTorr. Η θερμοκρασία του τριχοειδή σωλήνα ορίστηκε στους 330 °C. Το lens 0 offset το sheath gas, το spray voltage και το auxiliary gas, βελτιστοποιήθηκαν ανά segment ενώ το source CID, το scan time και το tube lens offset ανά SRM. Αναλυτικά παρατίθενται τον Πίνακα 10 και 11. Τα ιόντα που επιλέχθηκαν να παρακολουθούνται με τη μέθοδο SRM, ήταν αυτά που παρουσίαζαν τη μεγαλύτερη αφθονία. Η επιλογή περισσότερων θυγατρικών ιόντων θα εξασφάλιζε με ασφάλεια ότι τα ιόντα που παρακολουθούνται είναι αυτά που ζητάμε, όμως κάτι τέτοιο θα μείωνε την ευαισθησία του οργάνου. Συνεπώς επιλέχθηκε να παρακολουθείται μόνο ένα θραύσμα για κάθε μητρικό ιόν.

**Πίνακας 10.** Ιόντα και Βέλτιστες Συνθήκες παρακολούθησης τους ανά SRM

| Ένωση                              | Μητρικό<br>ión | Θυγατρικά<br>iónτα | C.E<br>(eV) | Δυναμικό<br>Φακών<br>Εστίασης<br>(V) | Source<br>CID (eV) | Scan time<br>(s) |
|------------------------------------|----------------|--------------------|-------------|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| MPB                                | 151            | 92                 | 14          | -61                                  | 26                 | 1,00             |
| EPB                                | 165            | 92                 | 30          | -69                                  | 15                 | 1,00             |
| iso-PPB                            | 179            | 92                 | 40          | -75                                  | 15                 | 1,00             |
| n-PPB                              | 179            | 92                 | 40          | -75                                  | 15                 | 1,00             |
| iso-BPB                            | 193            | 92                 | 15          | -78                                  | 24                 | 0,30             |
| n-BPB                              | 193            | 92                 | 15          | -78                                  | 24                 | 0,30             |
| BPA                                | 227            | 212                | 14          | -40                                  | 1                  | 1,00             |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -EPB  | 171            | 98                 | 30          | -69                                  | 15                 | 0,30             |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -nPPB | 185            | 98                 | 40          | -75                                  | 15                 | 0,30             |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -nBPB | 199            | 98                 | 15          | -78                                  | 24                 | 0,20             |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -MPB  | 157            | 98                 | 14          | -61                                  | 26                 | 0,30             |

**Πίνακας 11.** Βελτιστοποιημένες παράμετροι MS, ανά Segment

| Segments | Sheath<br>gas | Auxiliary<br>gas | Spray voltage | Lens 0<br>Offset |
|----------|---------------|------------------|---------------|------------------|
| 1        | 18            | 20               | 4400          | 0,26             |
| 2        | 42            | 20               | 4400          | 0,43             |
| 3        | 55            | 20               | 4400          | 0,53             |
| 4        | 32            | 20               | 4400          | 0,40             |

## 2.6.6 Συνθήκες Υγρής Χρωματογραφίας

Το πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν βαθμιδωτό με χρήση δύο διαλυτών στην κινητή φάση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ακετονιτρίλιο (ACN) και νερό και η ταχύτητα ροής είχε ορισθεί στα 350  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Στον Πίνακα 12 αναπαρίσταται το βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης.

**Πίνακας 12.** Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης

| Χρόνος (min) | A CN<br>% | H <sub>2</sub> O<br>% | Ταχύτητα ροής<br>( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) |
|--------------|-----------|-----------------------|---|
| 0            | 4         | 96                    | 350   |
| 0,1          | 4         | 96                    | 350   |
| 1            | 15        | 85                    | 350   |
| 14           | 25        | 75                    | 350   |
| 24,5         | 40        | 65                    | 350   |
| 25           | 100       | 0                     | 350   |
| 26           | 100       | 0                     | 350   |
| 26,2         | 4         | 96                    | 350   |
| 28,5         | 4         | 96                    | 350   |

Το πρόγραμμα έκλουσης είχε διάρκεια 28,5 min. Πριν από κάθε κύκλο ανάλυσης οι γραμμές των διαλυτών απαερώνονταν με τη βοήθεια αντλίας για την αποφυγή φυσαλίδων.

**Πίνακας 13.** Παράμετροι Λειτουργίας αυτόματου δειγματολήπτη

| Παράμετρος (μονάδες)                                    | Τιμή                                      |
|---|---|
| Όγκος ένεσης ( $\mu\text{L}$ )                          | 20  |
| Απόσταση βελόνας από την βάση του vial (mm)             | 2,0                                       |
| Ταχύτητα εισαγωγής δείγματος ( $\mu\text{L}/\text{s}$ ) | 6,0                                       |
| Διαλύτης έκπλυσης                                       | CH <sub>3</sub> OH - H <sub>2</sub> O 1:1 |
| Ταχύτητα έκπλυσης ( $\mu\text{L}/\text{s}$ )            | 100,0                                     |
| Τύπος εισαγωγής δείγματος                               | Full loop                                 |

Η λήψη του δείγματος πραγματοποιήθηκε με αυτόματο δειγματολήπτη του οποίου οι ρυθμίσεις φαίνονται στον Πίνακα 13. Τέλος η το ξέπλυμα της σύριγγας γινόταν μέσω διαλύματος 1:1 μεθανόλη/νερό, ώστε να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις των δειγμάτων καθώς και το βούλωμα της σύριγγας.

### **2.6.7 Επεξεργασία δειγμάτων**

Η διαδικασία ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε βασίστηκε σε πρωτόκολλο που είχε αναπτυχθεί στο εργαστήριο [87] για την ανίχνευση μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα και τροποποιήθηκε κατάλληλα ώστε πλέον να ανιχνεύονται PBs και BPA με αυτή τη μέθοδο.

Μετά την συλλογή τους, τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  και αφέθηκαν να ξεπαγώσουν κατά τη διάρκεια της νύχτας στους  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Αρχικά έγινε ανάδευση και μεταφορά 1mL δείγματος σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρισης πολυπροπυλενίου (falcon tube) της εταιρίας Techno Plastic Products, όγκου 15mL και ακολούθησε προσθήκη 100 ng  $^{13}\text{C}_4$ -4-methyl-UMB, 20ng των ιχνηθετημένων PBs, και 200 ng 4-methyl-UMB-glucuronide 4-methyl-UMB-sulphate.

Για την **υδρόλυση** υπήρχαν τρεις επιλογές:

α) Για την επίτευξη ολοκληρωμένης ενζυμικής υδρόλυσης των γλουκουρονικών ομάδων από τους συζευγμένους μεταβολίτες γινόταν προσθήκη 260μL ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου β-glucuronidase E.Coli (η ενζυμική υδρόλυση ολοκληρώνεται στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για 90 min στο φούρνο).

β) Για την επίτευξη ολοκληρωμένης ενζυμικής υδρόλυσης των γλουκουρονικών και σουλφονικών ομάδων από τους συζευγμένους μεταβολίτες, γινόταν προσθήκη 500 μL του ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου β-glucuronidase H.Pomatia (η ενζυμική υδρόλυση του ολοκληρώνεται στους  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  για όλη τη νύχτα και η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη 70 μL φορμικού οξέος).

γ) με μη χρήση κανενός ενζύμου μόνο τα ελεύθερα PBs και η ελεύθερη BPA θα είχαν μετρηθεί.

Μετά την υδρόλυση γίνεται προσθήκη 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος υδροξειδίου του αμμωνίου ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) και μεταφορά του δείγματος σε φυσίγγιο SPE των 60 mg. Στη συνέχεια έγινε προσθήκη 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος όξινου

φωσφορικού νατρίου/φωσφορικού οξέος ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{H}_3\text{PO}_4$ ) στο έκλουσμα και μεταφορά του σε φυσιγγίο SPE των 200 mg. Ακολουθεί έκλουση και των δύο φυσιγγίων με 3 mL ακετονοτριλίου (ACN) και 3 mL οξικού αιθυλεστέρα ( $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), και μεταφορά του εκλούσματος σε falcon tube των 15 mL.

Έπειτα έγινε συμπύκνωση μέχρι ξηρού μέσω περιστροφικού συστήματος συμπύκνωσης υπό κενό (rotational vacuum concentrator, RVC 2-25 Martin Christ). Το όργανο ήταν ρυθμισμένο σε πίεση 45 mbar και σε θερμοκρασία 60°C. Τέλος έγινε επαναδιάλυση του δείγματος σε 0,4 mL απιοντισμένο νερό και ανάλυση του με HPLC-ESI-MS/MS.

### **2.6.8 Αναλυτικές Παράμετροι**

Προκειμένου να αξιολογηθεί η ακρίβεια της μεθόδου εξετάστηκαν και υπολογίστηκαν οι ακόλουθες παράμετροι. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (method Limit of Detection, *mLOD*), τα όρια ανίχνευσης του οργάνου (instrumental Limit of Detection, *iLOD*), οι ανακτήσεις (Recoveries), τα τυφλά δείγματα (blanks), τα όρια ποσοτικοποίησης του οργάνου και της μεθόδου (*iLOQ/mLOQ*), η γραμμικότητα (linearity) και η επαναληψιμότητα (repeatability). Επίσης σε κάθε κύκλο ανάλυσης μαζί με τα υπόλοιπα δείγματα αναλύονταν και δείγματα της καμπύλης βαθμονόμησης συγκεκριμένων συγκεντρώσεων.

Πιο συγκεκριμένα, για τον υπολογισμό των **ανακτήσεων** έγινε ανάλυση 1 mL συνθετικών ούρων που είχε εμβολιαστεί με 50-200 ng των υπό ανάλυση ενώσεων, ώστε να μην υπάρχει μεγάλη διαφορά σε σχέση με τη συγκέντρωση που αναμένεται να βρεθεί σε πραγματικό δείγμα ούρων. Έπειτα έγινε εξάτμιση μέχρι ξηρού και μετά το δείγμα εμβολιάστηκε ξανά με 200 ng των ιχνηθετημένων αναλυτών. Η ανάλυση έγινε πέντε φορές.

Για τον υπολογισμό του ***iLOD***, χρησιμοποιήθηκε ο λόγος Σήματος προς Θόρυβο να είναι ίσος με 3 (*S/N*, Signal/Noise), ενώ για τον υπολογισμό του ***iLOQ*** ο λόγος ορίστηκε σε *S/N*=10. Το ***mLOD/mLOQ***, υπολογίστηκε με βάση το *iLOD/iLOQ*, κανονικοποιημένο με την ανάκτηση της μεθόδου και το βαθμό συμπύκνωσης του δείγματος. Ως όριο ανίχνευσης θεωρείται η ελάχιστη ποσότητα αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί με καθορισμένη στάθμη εμπιστοσύνης. Το όριο ανίχνευσης της



μεθόδου (*mLOD*) αποτελεί την ελάχιστη ποσότητα που μπορεί να ανιχνευθεί σε ένα πραγματικό δείγμα. Το Όριο Ποσοτικοποίησης (*LOQ*) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της μετρούμενης παραμέτρου, που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί (να προσδιορισθεί ποσοτικά) με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.

Όλοι οι τύποι αναλυτικών μεθόδων απαιτούν βαθμονόμηση, μια διαδικασία που συνδέει το μετρούμενο αναλυτικό σήμα με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Κατά τη χρήση της τεχνική **καμπύλης βαθμονόμησης** εισάγονται στο όργανο αρκετά πρότυπα διαλύματα με γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη και καταγράφεται η ένδειξη του οργάνου. Έτσι, παρασκευάστηκε εσωτερική καμπύλη βαθμονόμησης 11 διαφορετικών συγκεντρώσεων που περιείχε συγκεκριμένη ποσότητα των ιχνηθετημένων ενώσεων και των υπό ανάλυση ενώσεων. Για την κατασκευή των καμπύλων, στον άξονα  $\gamma$  τοποθετήθηκε ο λόγος της επιφάνειας της υπό ανάλυση ένωσης, προς την επιφάνεια της αντίστοιχης ιχνηθετημένης ένωσης και στο άξονα  $x$  οι συγκεντρώσεις

Η **γραμμικότητα** της μεθόδου υπολογίστηκε με βάση τα  $R^2$  από τις καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη, τα **blanks** ήταν δείγματα 1 mL συνθετικών ούρων τα οποία αναλύθηκαν τρεις φορές και οι συγκεντρώσεις των υπό ανάλυση ενώσεων σε αυτά ήταν κάτω από τα όρια ανίχνευσης.

Η **επαναληψιμότητα** (precision) των αναλυτικών δεδομένων αποτελεί τον βαθμό αμοιβαίας συμφωνίας μεταξύ των δεδομένων τα οποία λαμβάνονται με τον ίδιο τρόπο. Η επαναληψιμότητα αποτελεί μέτρο του τυχαίου ή απροσδιορίστου σφάλματος της ανάλυσης. Στα κριτήρια αξιολόγησης της επαναληψιμότητας, περιλαμβάνεται η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση, ο συντελεστής μεταβλητότητας και η μεταβλητότητα ή διακύμανση. Έτσι για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας, 1 mL μίγματος ούρων το οποίο είχε προέλθει από μίξη ούρων δέκα δοτών και είχε εμβολιαστεί με 100 ng από το μίγμα των υπό ανάλυση ενώσεων, αναλύθηκε πέντε φορές.

### **2.6.9 Εφαρμογή σε πραγματικά δείγματα**

Στα πλαίσια προηγούμενου ΜΔΕ [88] που είχε πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο συλλέχτηκαν συνολικά 80 στιγμιαία δείγματα (spot samples)<sup>7</sup> για την ανάλυση φθαλικών εστέρων στα ούρα. Τα δείγματα χωρίστηκαν ανάλογα με το επάγγελμα του εθελοντή, πράγμα το οποίο συντέλεσε στην εκτίμηση της έκθεσης σε PBs και BPA ανάλογα με το επάγγελμα που ακολουθούσε το κάθε άτομο. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε 5 κατηγορίες:

- Κομμωτές
- Τραπεζικοί υπάλληλοι
- Διάφοροι επαγγελματίες
- Χημικοί και Βιολόγοι που εργάζονται σε ερευνητικά εργαστήρια του Πανεπιστημίου Κρήτης
- Καθηγητές και διοικητικό προσωπικό του Π.Κ.

---

<sup>7</sup> Με τον όρο στιγμιαίο δείγμα νοείται το δείγμα που συλλέγεται σε συγκεκριμένη ώρα και θέση και αντιπροσωπεύει τη συγκεκριμένη θέση της πηγής, τη στιγμή της δειγματοληψίας

### 3 Αποτελέσματα- Συζήτηση

#### 3.1 Βελτιστοποίηση του Φασματογράφου Μάζας

Ο ESI επιλέχθηκε ως πηγή ιοντισμού, καθώς αποτελεί την πιο κοινή τεχνική για τέτοιου είδους αναλύσεις, λόγω της καλής ευαισθησίας, των χαμηλών ταχυτήτων ροής που απαιτεί καθώς και λόγω του ικανοποιητικού ιοντισμού των αναλυτών. Παρόλο που για κάποιους αναλύτες η ευαισθησία ήταν καλύτερη με τον APCI, η ανάγκη για συνεχή συντήρηση του, όπως αλλαγή της κορώνας εκκένωσης και του σωλήνα δείγματος καθώς και η κατανάλωση μεγαλύτερων ποσοτήτων διαλυτών οδήγησε στην επιλογή του ESI.

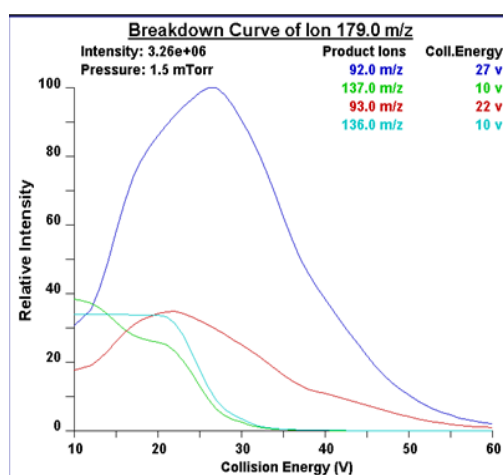
Στον φασματογράφο μάζας (MS), έγιναν βελτιστοποιήσεις των ακόλουθων παραμέτρων που ήταν το δυναμικό φακών εστίασης (tube lens offset) το οποίο βοηθάει στην αποτελεσματικότερη σύγκρουση μεταξύ των ατόμων αερίου Ar και των πρόδρομων ιόντων, η ενέργεια πρόσκρουσης (Collision Energy, CE) που αφορά την ενέργεια που εφαρμόζεται στο δεύτερο τετράπολο το οποίο λειτουργεί σαν κυψελίδα πρόσκρουσης, το δυναμικό στη βελόνα ESI (spray voltage), το Lens 0 offset καθώς και η ενέργεια διάσπασης στην πηγή (source CID: source Collision Induced Dissociation).

Στον Πίνακα 14 φαίνονται οι βελτιστοποιημένες τιμές της ενέργειας πρόσκρουσης, του δυναμικού εστίασης φακών, της ενέργειας διάσπασης στην πηγή, καθώς και τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα για κάθε αναλύτη στον APCI. Να σημειωθεί ότι οι βελτιστοποιήσεις των παραμέτρων για κάθε ένωση και με τις δύο πηγές ιοντισμού έγιναν με αυτόματη έγχυση (direct infusion) του αναλύτη στο MS με ροή 10μL/min. Οι βελτιστοποιήσεις επαναλήφθηκαν μετά την ανάπτυξη της μεθόδου στην HPLC για κάθε ένωση, στην ίδια ροή και σύσταση διαλυτών με το χρόνο έκλουσης της εκάστοτε ένωσης.

Στην Εικόνα 20 φαίνεται η καμπύλη κατανομής των τεσσάρων πιο άφθονων θραυσμάτων του PPB μετά από την τοποθέτηση των βέλτιστων παραμέτρων για το μητρικό ιόν του.

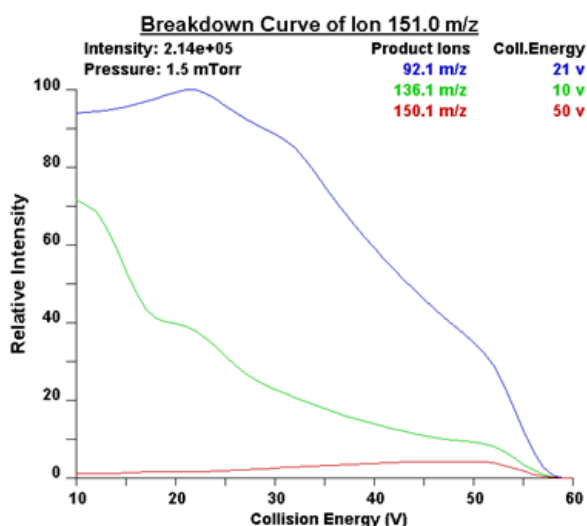
**Πίνακας 14.** Βελτιστοποιημένες παράμετροι ανά SRM στον APCI

| Ένωση                              | Μητρικό<br>ίόν | Θυγατρικό<br>ίόν | C.E<br>(Ev) | Δυναμικό Εστίασης<br>Φακών (V) | Source CID (eV) |
|------------------------------------|----------------|------------------|-------------|--------------------------------|-----------------|
| PHBA                               | 137            | 92               | 14          | -150                           | 10              |
| MPB                                | 151            | 92               | 22          | -105                           | 0               |
| EPB                                | 165            | 92               | 22          | -150                           | 0               |
| iso-PPB                            | 179            | 92               | 20          | -110                           | 25              |
| n-PPB                              | 179            | 92               | 20          | -110                           | 15              |
| iso-BPB                            | 193            | 92               | 18          | -135                           | 18              |
| n-BPB                              | 193            | 92               | 20          | -150                           | 18              |
| BzPB                               | 227            | 92               | 20          | -140                           | 18              |
| Heptyl-PB                          | 235            | 92               | 20          | -140                           | 28              |
| BPA                                | 227            | 212              | 36          | -140                           | 25              |
| d16-BPA                            | 241            | 223              | 22          | -120                           | 28              |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -MPB  | 157            | 98               | 22          | -105                           | 0               |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -EPB  | 171            | 98               | 22          | -150                           | 0               |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -nPPB | 185            | 98               | 20          | -110                           | 25              |
| <sup>13</sup> C <sub>6</sub> -nBPB | 199            | 98               | 20          | -150                           | 18              |



**Εικόνα 20.** Διάγραμμα συσχέτισης σχετικής έντασης των 4 πιο άφθονων θυγατρικών ιόντων του n-PPB σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης, στον APCI

Όπως στον APCI έτσι και στον ESI έγινε η βελτιστοποίηση των παραμέτρων του MS για κάθε ένωση. Στην Εικόνα 21 φαίνεται το διάγραμμα συσχέτισης της σχετικής έντασης των 4 πιο άφθονων θυγατρικών ιόντων του MPB.



**Εικόνα 21.** Διάγραμμα συσχέτισης σχετικής έντασης των 4 πιο άφθονων θυγατρικών ιόντων του MPB σε σχέση με την ενέργεια πρόσκρουσης, στον ESI

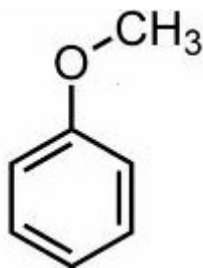
Η μέθοδος που εφαρμόστηκε με τον ESI διέθετε 9 γεγονότα σάρωσης (scan events) τα οποία χωρίστηκαν σε 4 segments ανάλογα με το χρόνο κατακράτησης της κάθε ένωσης.

### **3.2 Βελτιστοποίηση της Υγρής Χρωματογραφίας**

Στα πειράματα με τον APCI, υπήρχαν 4 διαθέσιμες στήλες κατάλληλες για μεγάλες ροές. Για την επιλογή των καταλληλότερων στηλών, έγινε μέτρηση των θεωρητικών πλακών της κάθε μιας από τις τέσσερις στήλες με τη βοήθεια συστήματος Υψηλής Πίεσης Υγρή Χρωματογραφία με ανιχνευτή Υπεριώδους (HPLC-UV) και τη χρήση του αντιδραστηρίου ανισόλη (Εικόνα 22).

Παρασκευάστηκαν διαλύματα των 100 ng/mL σε διαλύτη ACN και νερό σε αναλογία 1:1. Έγιναν έξι ενέσεις με κάθε στήλη. Χρησιμοποιώντας το χρόνο κατακράτησης ( $t_R$ ) και το εύρος ( $w$ ) για κάθε κορυφή ανισόλης υπολογίστηκαν οι

θεωρητικές πλάκες, με βάση τον τύπο  $N=16(t_R/w)^2$  για τις τρεις τελευταίες ενέσεις με κάθε στήλη.



Εικόνα 22. Δομή ανισόλης [89]

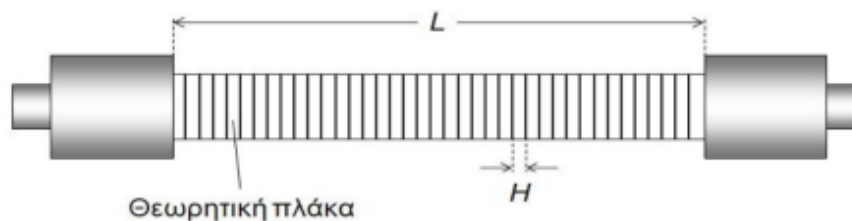
Οι στήλες που δοκιμάστηκαν ήταν οι ακόλουθες:

- Στήλη #1: Hewlett Packard HP-ODS Hypersil 5 $\mu$ m, 250\*4.6mm
- Στήλη #2: Thermo Scientific ODS Hypersil 5 $\mu$ m, 250\*4.6mm
- Στήλη #3 : MZ-Hypersil ODS 5 $\mu$ m, 250\*4.6mm
- Στήλη #4 : MZ-Analytical Kromasil 5 $\mu$ m, 250\*4mm

Ο αριθμός θεωρητικών πλακών για κάθε στήλη, ήταν:

- N(#1)=19.829
- N(#2)=12.764
- N(#3)=27.604
- N(#4)=25.410

Στην Εικόνα 23, φαίνεται σχηματικά μια στήλη χρωματογραφίας και οι θεωρητικές πλάκες.



Εικόνα 23. Θεωρητικές παράμετροι της Χρωματογραφικής στήλης (H: ύψος θεωρητικής πλάκας, L:μήκος στήλης) [90]

Η επιλογή δύο στηλών σε σειρά, έγινε και για την επίτευξη του διαχωρισμού των δύο ισομερών των **PPB** και **BPB** που δεν ήταν εφικτή με μια στήλη. Έτσι επιλέχθηκαν οι στήλες MZ-Hypersil ODS 5μm, 250\*4.6mm και MZ-Analytical Kromasil 5μm, 250\*4mm.

Για τον ESI, ανάμεσα στις στήλες MZ-Analytical PerfectSil 3μm, 120 Phenyl 100 \*2.1 mm και Thermo BetaSil Phenyl 3μm, 100 \*2.1 mm, επιλέχτηκε η δεύτερη καθώς παρουσίαζε καλύτερο διαχωρισμό των ενώσεων και καλύτερο σχήμα κορυφών. Στον Πίνακα 15 φαίνονται οι διαφορές των στηλών χρωματογραφίας για τις δύο πηγές ιοντισμού.

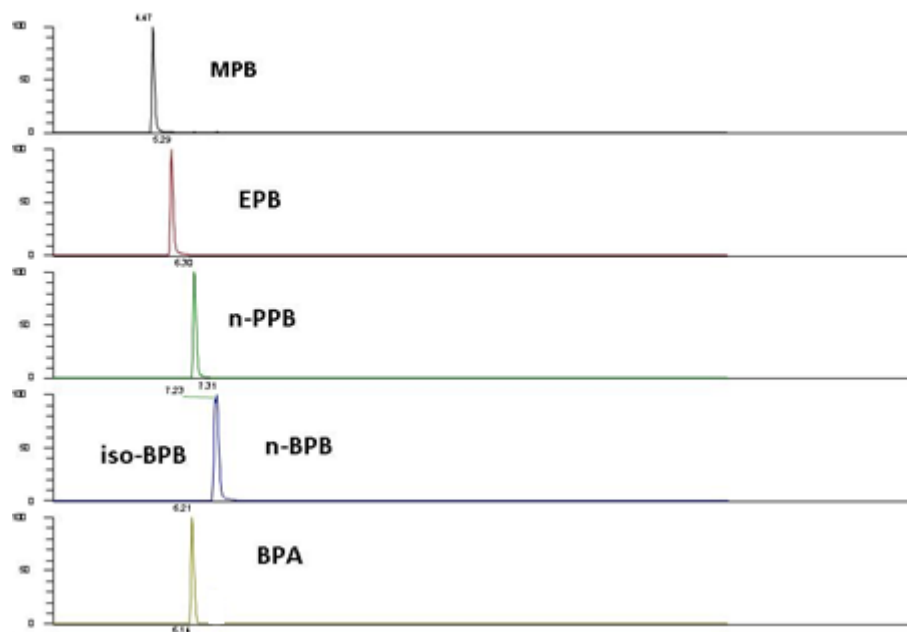
**Πίνακας 15.** Χαρακτηριστικά στηλών

| Στατική Φάση           | Μέγεθος σωματιδίων (μm) | Εσωτερική διάμετρος (mm) | Μήκος (mm) | Μέγεθος πόρων (Å) | Επιφάνεια (m <sup>2</sup> /g) | Ποσοστό άνθρακα % | Καθαρότητα silica | Πολικότητα | Υδροφοβικότητα | Δραστικότητα Σιλανόλης |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|------------|----------------|------------------------|
| Hypersil ODS [91]      | 5                       | 4,6                      | 250        | 120               | 170                           | 10                | Υψηλή             | Υψηλή      | Χαμηλή         | Υψηλή                  |
| Kromasil [90]          | 5                       | 4                        | 250        | 100               | 340                           | 19                | Υψηλή             | Χαμηλή     | Υψηλή          | Χαμηλή                 |
| PerfectSil Phenyl [92] | 3                       | 2,1                      | 100        | 120               | 300                           | 9,5               | 99.9%             | -          | -              | -                      |
| BetaSil Phenyl [93]    | 3                       | 2,1                      | 100        | 100               | -                             | 11                | Υψηλή             | -          | -              | -                      |

Κατά την χρήση του APCI, σαν κινητή φάση χρησιμοποιήθηκαν η MeOH και το H<sub>2</sub>O. Ο βέλτιστος διαχωρισμός επιτεύχθηκε με ροή 750 μL/min ενώ ακολουθήθηκε βαθμιδωτή έκλυση. Στον Πίνακα 16 αναπαρίσταται το πρόγραμμα έκλυσης και στην Εικόνα 24 το χρωματογράφημα από τις αρχικές προσπάθειες διαχωρισμού των ισομερών του BPB. Το iso-PPB και τα ιχνηθετημένα PBs απουσιάζουν γιατί δεν είχαν παραληφθεί ακόμα.

**Πίνακας 16.** Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης, με μια στήλη διαχωρισμού στον APCI

| Χρόνος (min) | A% (MeOH) | B% (H <sub>2</sub> O) | Ταχύτητα Ροής (μL/min) |
|--------------|-----------|-----------------------|------------------------|
| 0            | 50        | 50                    | 750                    |
| 2,1          | 65        | 35                    | 750                    |
| 10           | 100       | 0                     | 750                    |
| 17           | 100       | 0                     | 750                    |
| 27           | 100       | 0                     | 750                    |
| 27,1         | 50        | 50                    | 750                    |
| 30           | 50        | 50                    | 750                    |



**Εικόνα 24.** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος, με μια στήλη διαχωρισμού, στον APCI

Στον Πίνακα 17, φαίνονται οι βέλτιστες συνθήκες που επελέγησαν για τον καλύτερο διαχωρισμό των ενώσεων που μελετήθηκαν και στην Εικόνα 25, αναπαρίστανται το χρωματογράφημα από πρότυπο διάλυμα, που προέκυψε με το

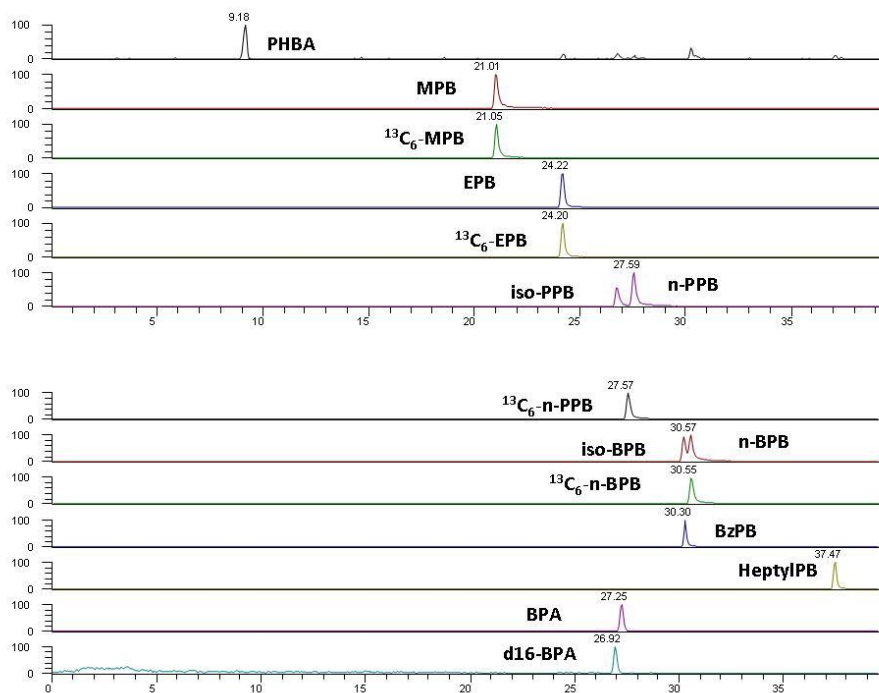


συγκεκριμένο βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης μετά την χρήση των δύο στηλών διαχωρισμού.

**Πίνακας 17.** Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης με τη χρήση δύο στηλών διαχωρισμού στον APCI

| Χρόνος (min) | A% (MeOH) | B% (H <sub>2</sub> O) | Ταχύτητα ροής (μl/min) |
|--------------|-----------|-----------------------|------------------------|
| 0            | 50        | 50                    | 750                    |
| 10           | 50        | 50                    | 750                    |
| 15           | 70        | 30                    | 750                    |
| 30           | 92,5      | 7,5                   | 750                    |
| 30,2         | 100       | 0                     | 750                    |
| 37           | 100       | 0                     | 750                    |
| 37,1         | 75        | 25                    | 750                    |
| 37,2         | 50        | 50                    | 750                    |
| 39,5         | 50        | 50                    | 750                    |

Με τον ESI, αρχικά δοκιμάστηκε ως κινητή φάση, ACN με 0,1% CH<sub>3</sub>COOH και H<sub>2</sub>O με 0,1% CH<sub>3</sub>COOH. Η δοκιμή του CH<sub>3</sub>COOH στην κινητή φάση στηρίχθηκε στο γεγονός ότι βοηθούσε στην αποτελεσματικότερη συγκράτηση των φθαλικών εστέρων στη στήλη και κατ' επέκταση στον καλύτερο διαχωρισμό τους. Η παρουσία προβλημάτων στον αρνητικό ιοντισμό καταστέλλει το σήμα και αυτό ήταν πιο εμφανές στην BPA. Έτσι χρησιμοποιήθηκε η ίδια κινητή φάση, αλλά χωρίς την προσθήκη CH<sub>3</sub>COOH, με αποτέλεσμα να βελτιωθούν τα όρια ανίχνευσης της BPA και η απόκριση των υπολοίπων ενώσεων. Στον Πίνακα 18 φαίνονται οι διαφορές των *i*LOD και στις δύο περιπτώσεις.



**Εικόνα 25.** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος με χρήση 2 στηλών διαχωρισμού, στον APCI

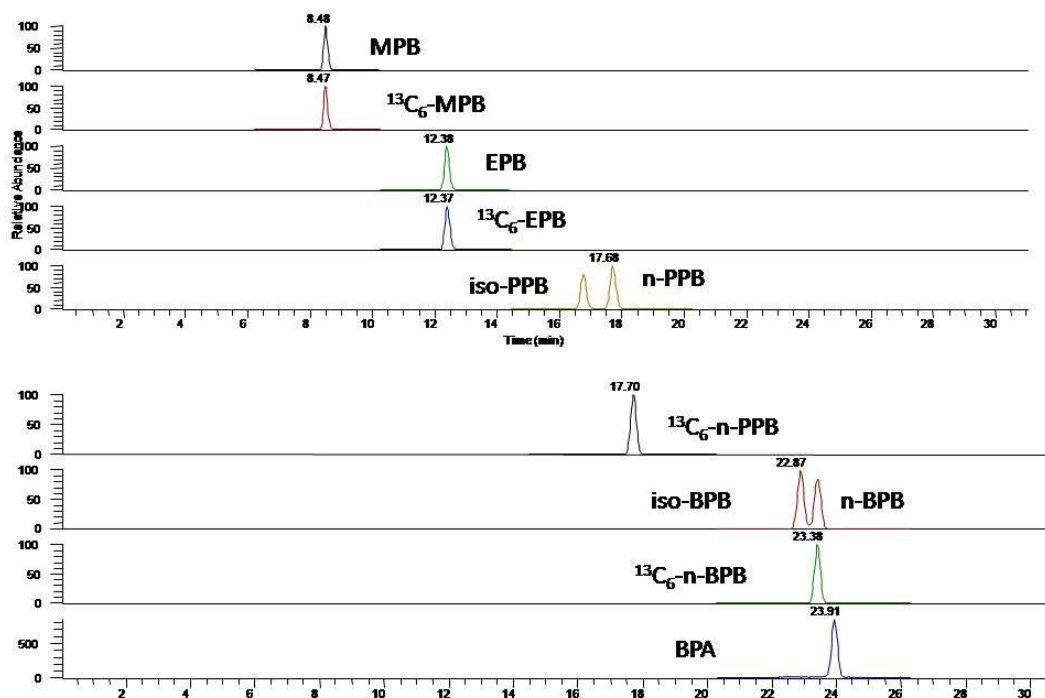
Στην Εικόνα 25, φαίνονται και οι ενώσεις PHBA, BzPB, HeptylPB και d16-BPA που όμως απορρίφθηκαν με τον ESI.

**Πίνακας 18.** Όρια ανίχνευσης οργάνου με και χωρίς την προσθήκη οξικού οξέος

| Ένωση   | iLOD με CH <sub>3</sub> COOH 0.1%<br>(ng/mL) | iLOD χωρίς CH <sub>3</sub> COOH<br>(ng/mL) |
|---------|--|--|
| MPB     | 0,28   | 0,14                                       |
| EPB     | 0,13   | 0,12                                       |
| iso-PPB | 0,41   | 0,23                                       |
| n-PPB   | 0,33   | 0,19                                       |
| iso-BPB | 0,15   | 0,07                                       |
| n-BPB   | 0,15   | 0,08                                       |
| BPA     | 4,43   | 0,16                                       |

Ο βέλτιστος διαχωρισμός στον ESI επιτεύχθηκε με ροή 350  $\mu$ L/min και με κινητές φάσεις ακετονιτρίλιο και νερό. Ακολουθήθηκε βαθμιδωτό πρόγραμμα

έκλουσης όπως φαίνεται σε προηγούμενο κεφάλαιο στον Πίνακα 12 και το χρωματογράφημα που καταγράφηκε, φαίνεται στην Εικόνα 26.



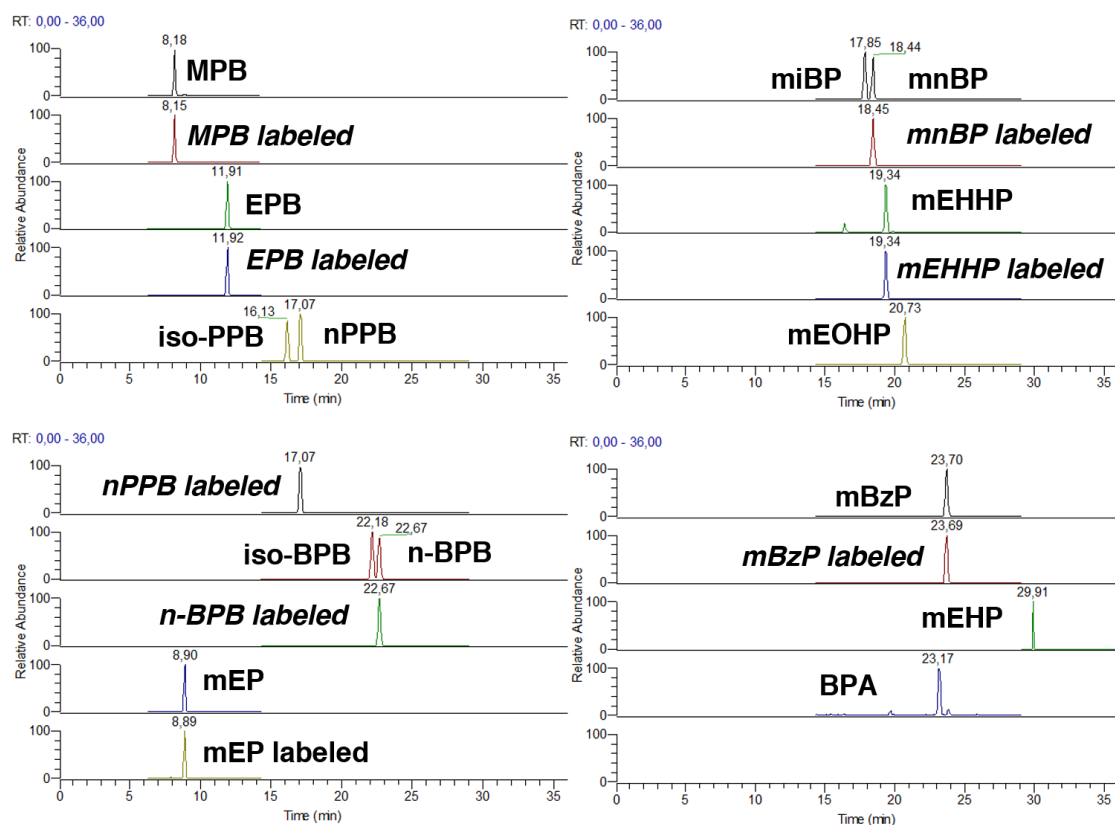
**Εικόνα 26.** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος με τη στήλη Thermo BetaSil Phenyl 3 $\mu\text{m}$ , 100 \* 2.1 mm, στον ESI

Καθώς η μέθοδος που τροποποιήθηκε βασίστηκε σε ήδη υπάρχουσα τεχνική για την ανίχνευση φθαλικών εστέρων στα ούρα, στην Εικόνα 27 φαίνεται το χρωματογράφημα που λήφθηκε με ταυτόχρονη ανάλυση φθαλικών εστέρων, BPA και PBs με προσθήκη οξικού οξέος στην κινητή φάση και με τη στήλη *Thermo BetaSil Phenyl 3 $\mu\text{m}$ , 100\*2.1 mm* σε πραγματικό δείγμα ούρων και στον Πίνακα 19 το πρόγραμμα έκλουσης που ακολουθήθηκε.

Στην βιβλιογραφία δεν υπάρχει μέχρι τώρα καμία μέθοδος ταυτόχρονης ανίχνευσης BPA, PBs και μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων. Επιπλέον για τον διαχωρισμό των ισομερών των δύο PBs, έχουν δημοσιευθεί δύο μελέτες που χρησιμοποιούν στήλες UPLC [70,71] και μόνο μια μελέτη που χρησιμοποιεί συμβατική στήλη RPLC [55] η οποία διαχωρίζει μόνο τα ισομερή του BPB με ανεπαρκή όμως χρωματογραφική απόδοση.

**Πίνακας 19.** Βαθμιδωτό Πρόγραμμα έκλουσης Φθαλικών εστέρων, BPA και PBs

| Χρόνος (min) | (0.1 % CH <sub>3</sub> COOH σε ACN) % | (0.1 % CH <sub>3</sub> COOH σε H <sub>2</sub> O) % | Ταχύτητα Ροής (μL/min) |
|--------------|---------------------------------------|--|------------------------|
| 0            | 4                                     | 96   | 350                    |
| 0,1          | 4                                     | 96   | 350                    |
| 1,0          | 15                                    | 85   | 350                    |
| 14,0         | 25                                    | 75   | 350                    |
| 27,0         | 35                                    | 65   | 350                    |
| 28,0         | 100                                   | 0  | 350                    |
| 32,0         | 100                                   | 0  | 350                    |
| 33,0         | 4                                     | 96   | 350                    |
| 36,0         | 4                                     | 96   | 350                    |



**Εικόνα 27.** Χρωματογράφημα πραγματικού δείγματος με τη στήλη Thermo BetaSil Phenyl 3μm, 100 \*2.1 mm, στον ESI

### 3.3 Χαρακτηριστικά της Μεθόδου

Στον Πίνακα 20 φαίνονται οι ανακτήσεις των ενώσεων καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Ενώ στον Πίνακα 20.1 η γραμμικότητα της μεθόδου και οι συγκεντρώσεις στα τυφλά δείγματα.

**Πίνακας 20.** Χαρακτηριστικά της μεθόδου

| Ένωση   | iLOD<br>(ng/mL) | mLOD<br>(ng/mL) | iLOQ<br>(ng/mL) | mLOQ<br>(ng/mL) | Ανάκτηση<br>(n=3, ± SD) |
|---------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| MPB     | 0,14            | 0,06            | 0,45            | 0,20            | 91±3,4                  |
| EPB     | 0,12            | 0,05            | 0,39            | 0,17            | 88±6,7                  |
| iso-PPB | 0,23            | 0,13            | 0,77            | 0,45            | 69±8,0                  |
| n-PPB   | 0,19            | 0,09            | 0,63            | 0,29            | 86±6,9                  |
| iso-BPB | 0,07            | 0,04            | 0,23            | 0,12            | 77±5,7                  |
| n-BPB   | 0,08            | 0,04            | 0,25            | 0,12            | 83±5,6                  |
| BPA     | 0,16            | 0,07            | 0,53            | 0,24            | 88±5,6                  |

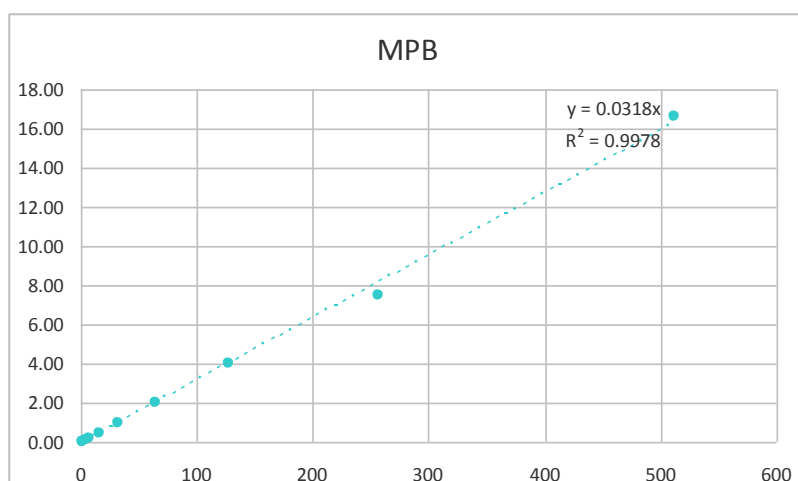
SD: Standard Deviation, Τυπική Απόκλιση

**Πίνακας 20.1.** Χαρακτηριστικά της μεθόδου

| Ένωση   | Εύρος Γραμμικότητας<br>(ng/mL) | Γραμμικότητα R <sup>2</sup> | Τυφλά δείγματα |
|---------|--------------------------------|-----------------------------|----------------|
| MPB     | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |
| EPB     | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |
| iso-PPB | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |
| n-PPB   | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |
| iso-BPB | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |
| n-BPB   | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |
| BPA     | 0,5-512                        | >0,99                       | Δ.Α            |

Παρατηρείται ότι ο παράγοντας γραμμικής απόκρισης ( $R^2$ ) είναι πολύ καλός για το εύρος γραμμικότητας 0,5-512. Επίσης οι ανακτήσεις ήταν >69%, με μεγαλύτερη αυτή για το MPB και μικρότερη αυτή για το iso-PPB.

Στην Εικόνα 28 φαίνεται μια τυπική καμπύλη βαθμονόμησης του MPB, χωρίς την προσθήκη οξικού οξέος στην κινητή φάση.



**Εικόνα 28.** Καμπύλη βαθμονόμησης MPB, χωρίς οξικό οξύ

Όσον αφορά την επαναληψιμότητα, η τυπική απόκλιση επί τις εκατό ήταν <5,3% για όλες τις ενώσεις εκτός από την BPA που ήταν 15,3%. Οι επιδράσεις της μήτρας (matrix effect), έχουν μελετηθεί τόσο για τον ESI όσο και για τον APCI [94,95,96]. Προκειμένου να αποφευχθεί το matrix effect, στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικά πρότυπα για τις περισσότερες ενώσεις, εκτός της BPA, καθώς το ιχνηθετημένο ανάλογο της δεν είχε καλή απόκριση στο MS.

### **3.4 Συγκεντρώσεις σε πραγματικά δείγματα**

Συγκεντρωτικά το MPB ανιχνεύθηκε στο 100% όλων των δειγμάτων, το EPB στο 94%, το iso-PPB στο 1% ,το n-PPB στο 60%, το iso-BPB στο 13% το n-BPB στο 15%, και τέλος η BPA ανιχνεύθηκε στο 23% των δειγμάτων. Οι πιο άφθονες ενώσεις σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν ήταν τα MPB, n-PPB και EPB με διάμεσες τιμές 3,1 μg/g, 0,1 μg/g και 0,2 μg/g (κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη) αντίστοιχα. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για όλα τα δείγματα, φαίνονται στον

Πίνακα 21, ενώ τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη στον Πίνακα 22.

**Πίνακας 21.** Επίπεδα συγκεντρώσεων σε πραγματικά δείγματα

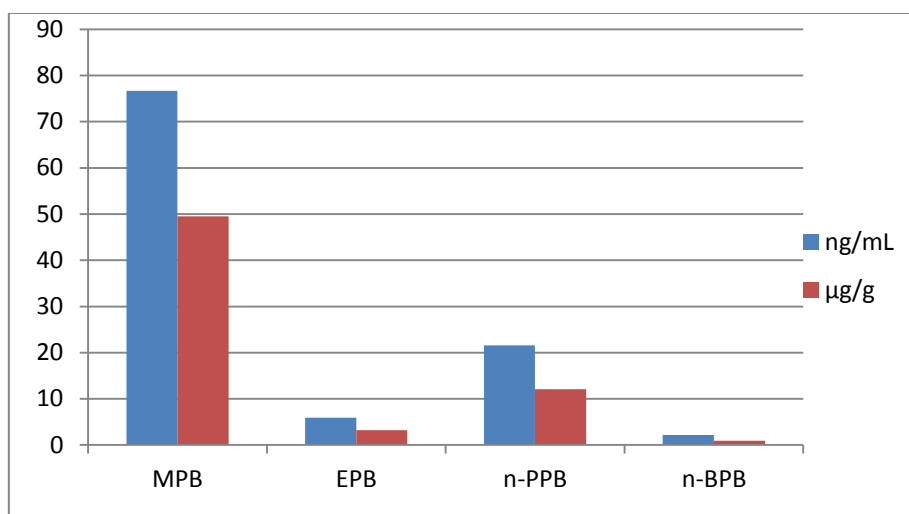
| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) | Μέσος<br>Όρος<br>(ng/mL) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|---------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------------|----------------------|
| MPB     | 0,8                 | 5,5                 | 3868,6             | 76,7                     | 100                  |
| EPB     | <b>Δ.Α</b>          | 0,4                 | 205,4              | 5,9                      | 94                   |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>          | 0,2                | <b>Δ.Α</b>               | 1                    |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>          | 0,2                 | 806,6              | 21,6                     | 60                   |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>          | 0,9                | <b>Δ.Α</b>               | 13                   |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>          | 163,0              | 2,2                      | 15                   |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>          | 4,4                | 0,2                      | 23                   |

**Πίνακας 22.** Επίπεδα συγκεντρώσεων, κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη σε πραγματικά δείγματα

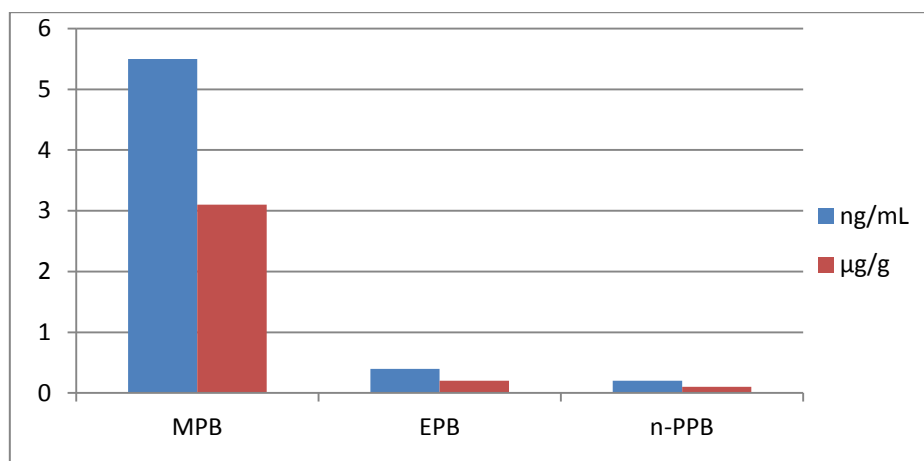
| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Μέσος Όρος<br>(μg/g) |
|---------|--------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| MPB     | 0,3                | 3,1                | 2668,0            | 49,5                 |
| EPB     | <b>Δ.Α</b>         | 0,2                | 79,9              | 3,2                  |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>         | 0,1               | <b>Δ.Α</b>           |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>         | 0,1                | 556,3             | 12,1                 |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>         | 0,3               | <b>Δ.Α</b>           |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>         | 63,4              | 0,9                  |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>         | 2,5               | 0,1                  |

Στο Σχήμα 1 παρίστανται οι μέσες τιμές κανονικοποιημένες και μη ως προς την κρεατινίνη και λείπουν τα iso-PPB, iso-BPB και η BPA, τα οποία δεν ανιχνεύθηκαν. Παρατηρείται ότι οι μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των MPB και n-PPB είναι μεγαλύτερες για το σύνολο των δειγμάτων, γεγονός το οποίο συμφωνεί και με τις βιβλιογραφικές αναφορές [97,99] καθώς οι ενώσεις αυτές είναι οι

περισσότερο χρησιμοποιούμενες στην βιομηχανία καλλυντικών προϊόντων. Στο Σχήμα 2, παρίστανται οι διάμεσες τιμές κανονικοποιημένες και μη ως προς την κρεατινίνη και λείπουν το n-PPB, τα iso/n-BPB και η BPA, τα οποία δεν ανιχνεύθηκαν. Όπως φαίνεται στο διάγραμμα του Σχήματος 2, η συγκέντρωση του EPB είναι μεγαλύτερη από του n-PPB γεγονός που αντιτίθεται στο διάγραμμα του Σχήματος 1 και οφείλεται στην ύπαρξη ακραίων τιμών για το n-PPB. Η συγκέντρωση του MPB συνεχίζει να είναι υψηλή και στο Σχήμα 2.



**Σχήμα 1.** Επίπεδα συγκεντρώσεων (μέσες τιμές) χωρίς (ng/mL) και με (µg/g) κανονικοποίηση ως προς την κρεατινίνη



**Σχήμα 2.** Επίπεδα συγκεντρώσεων (διάμεσες τιμές) ενώσεων χωρίς (ng/mL) και με (µg/g) κανονικοποίηση ως προς την κρεατινίνη

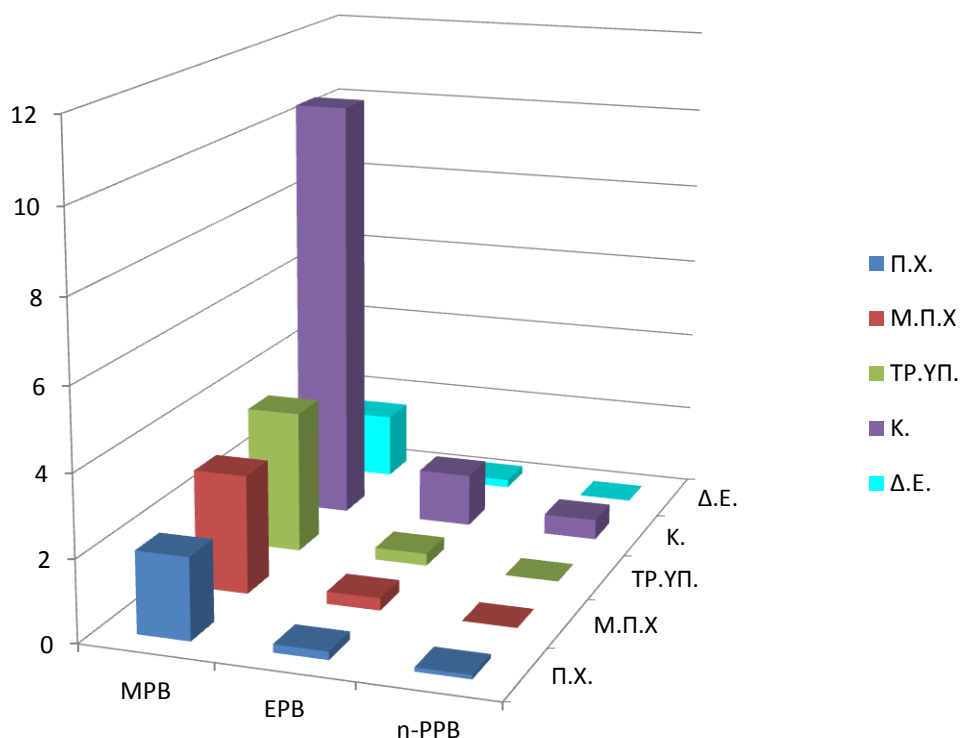
Για να αποφευχθούν οι επιδράσεις των ακραίων τιμών, η σύγκριση των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε να γίνει με την χρήση των διάμεσων τιμών, καθώς



χρησιμοποιούνται σε πλήθος παρόμοιων μελετών [96,97,99]. Τα αποτελέσματα αναπαρίστανται στον Πίνακα 23 και το αντίστοιχο διάγραμμα στο Σχήμα 3.

**Πίνακας 23.** Επίπεδα συγκεντρώσεων (Διάμεσες τιμές) των ενώσεων για κάθε ομάδα εθελοντών κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη (μg/g)

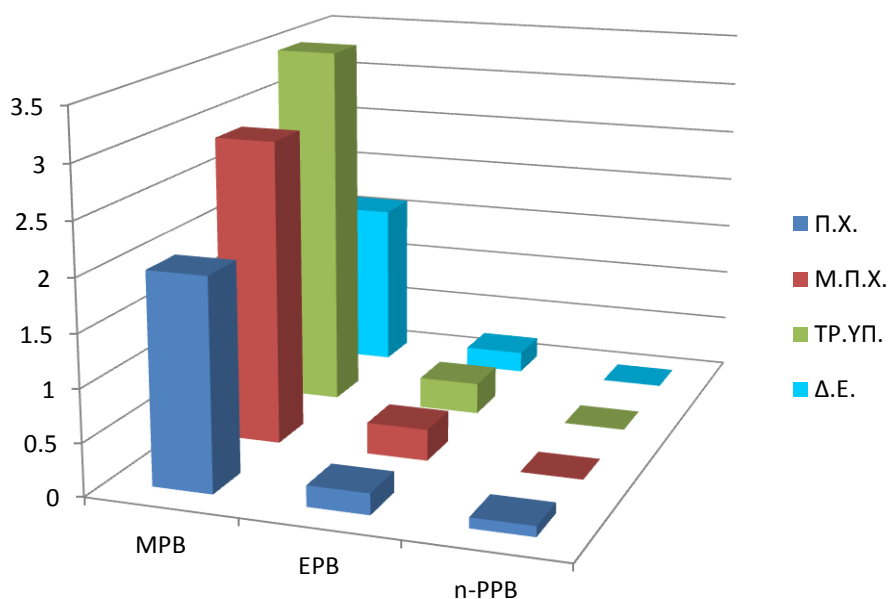
|  | MPB  | EPB | iso-PPB | n-PPB | iso-BPB | n-BPB | BPA |
|--|------|-----|---------|-------|---------|-------|-----|
| Πειραματικοί Χημικοί/Βιολόγοι (Π.Χ)                        | 2,0  | 0,2 | Δ.Α     | 0,1   | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α |
| Μη πειραματικοί χημικοί/Εργαζόμενοι Τμ.<br>Χημείας (Μ.Π.Χ) | 2,9  | 0,3 | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α |
| Τραπεζικοί Υπάλληλοι (ΤΡ.ΥΠ)                               | 3,5  | 0,3 | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α |
| Κομμωτές (Κ)   | 10,5 | 1,3 | Δ.Α     | 0,5   | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α |
| Διάφοροι Επαγγελματίες (Δ.Ε)                               | 1,6  | 0,2 | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α     | Δ.Α   | Δ.Α |



**Σχήμα 3.** Διάμεσες τιμές των ενώσεων ,κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη, για κάθε ομάδα εθελοντών (μg/g)

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3, μεγαλύτερη έκθεση στα MPB, EPB, n-PPB (παρουσιάζονται μόνο αυτά στο διάγραμμα γιατί οι διάμεσες τιμές των υπολοίπων

ενώσεων ήταν μηδενικές) έχουν οι Κομμωτές, πράγμα που συνάδει με το γεγονός ότι χρησιμοποιούν περισσότερα καλλυντικά προϊόντα όπως βαφές και κρέμες μαλλιών, τα οποία περιέχουν μεγάλα ποσοστά των κυριότερων PBs, ακολουθούν οι Τραπεζικοί Υπάλληλοι, οι Μη Πειραματικοί/Εργαζόμενοι του Τμ. Χημείας, οι Πειραματικοί Χημικοί/Βιολόγοι που παρουσιάζουν παρόμοια έκθεση και τέλος οι Διάφοροι Επαγγελματίες. Για μια πιο ξεκάθαρη εικόνα, η έκθεση στις υπόλοιπες ομάδες εκτός των Κομμωτών φαίνεται στο Σχήμα 4.



**Σχήμα 4.** Διάμεσες τιμές των ενώσεων για κάθε ομάδα εθελοντών, χωρίς τους Κομμωτές, κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη (µg/g)

Τέλος, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας με αυτά άλλων μελετών, διαπιστώνεται ότι ακολουθείται παρόμοια τάση για όλες τις ενώσεις. Η διαφορά στις συγκεντρώσεις έγκειται στο γεγονός ότι στις άλλες μελέτες [97,98,99,75] υπολογίζονται οι ολικές συγκεντρώσεις (ελεύθεροι, γλουκουρονιδιομένοι και σουλφονιομένοι μεταβολίτες) ενώ στην παρούσα οι ελεύθεροι και γλουκουρονιδιομένοι. Επίσης οι εθελοντές δεν είναι μόνο άντρες αλλά και γυναίκες γεγονός που ίσως να επηρεάζει τα αποτελέσματα. Στον Πίνακα 24 φαίνονται συγκριτικά τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας και άλλων μελετών παρόμοιας και μεγαλύτερης έκτασης.

**Πίνακας 24.** Σύγκριση με άλλες μελέτες

| Ένωση<br>(ng/mL) | Παρούσα<br>εργασία<br>(n=80)<br>Διάμεσος | (n=100)<br>Διάμεσος<br>[98] | (n=2548)<br>Διάμεσος<br>[99] | (n=30)<br>Διάμεσος<br>[100] | (n=50)<br>Διάμεσος<br>[75] |
|------------------|--|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| MPB              | 5,5                                      | 43,9                        | 63,5                         | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                 |
| EPB              | 0,4                                      | 1                           | <b>&lt;LOD*</b>              | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                 |
| Iso-PPB          | <b>Δ.Α</b>                               | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                   | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                 |
| n-PPB            | 0,2                                      | 9,1                         | 8,7                          | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                 |
| Iso-BPB          | <b>Δ.Α</b>                               | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                   | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                 |
| n-BPB            | <b>Δ.Α</b>                               | 0,5                         | <b>&lt;LOD*</b>              | <b>N.R</b>                  | <b>N.R</b>                 |
| BPA              | <b>Δ.Α</b>                               | <b>N.R</b>                  | 2,7                          | 2,12                        | 1,9                        |

*N.R:Not Reported, Δεν αναλύθηκε*

*LOD=1 ng/mL*

## 4 Συμπεράσματα

- Αναπτύχθηκε μια ευαίσθητη και επιλεκτική μέθοδος για την ανάλυση των PBs και της BPA, σε δείγματα ούρων με χρήση HPLC-ESI-MS/MS.
- Ανάμεσα στις δύο πηγές ιοντισμού (APCI/ESI) που εξετάστηκαν, επιλέχτηκε ο ESI λόγω της σταθερότητας και της επαναληψιμότητας του.
- Προσδιορίστηκαν οι βέλτιστες τιμές, στις οποίες θα πρέπει να ρυθμίζονται οι διάφορες λειτουργικές παράμετροι του οργάνου.
- Η μέθοδος που τροποποιήθηκε, εφαρμόστηκε για πρώτη φορά επιτυχώς για την ταυτόχρονη ανάλυση PBs, BPA και των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων.
- Επιτεύχθηκε για πρώτη φορά ο διαχωρισμός των δομικών ισομερών των BPB και PPB, με μια συμβατική στήλη διαχωρισμού (Betasil Phenyl 3μm, 100mm\*2.1)
- Η μέθοδος μπορεί να βρει εφαρμογή σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων ώστε να είναι κατάλληλη για επιδημιολογικές μελέτες.
- Τα δείγματα ούρων που αναλύθηκαν είχαν παρόμοιες κατανομές EPB, PPB, BPB και BPA, πράγμα που σημαίνει ότι η έκθεση σε αυτές τις ενώσεις είναι παρόμοια για όλες τις ομάδες εθελοντών.
- Η έκθεση στο MPB ήταν μεγαλύτερη σε όλες τις ομάδες εθελοντών, εξαρτάται από την χρήση προϊόντων καθημερινής φροντίδας για κάθε εθελοντή και έτσι ήταν μεγάλη με μικρές διακυμάνσεις σε όλες τις ομάδες εθελοντών.

- Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε 80 δείγματα από άντρες διαφόρων επαγγελμάτων, με τους Κομμωτές να εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα MPB, EPB και n-PPB.

## 5. Παράρτημα

### 5.1. Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων

**Πίνακας 25.** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων (συνέχεια στη σελ.87)

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| P01    | 1,5            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P02    | 11,0           | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 2,7              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 4,4            |
| P03    | 0,9            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | 0,2                | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P04    | 1,5            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P05    | 30,1           | 26,9           | <b>Δ.Α</b>         | 0,2              | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | 0,2            |
| P06    | 2,2            | 1,3            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>     |
| P07    | 5,9            | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | 1,5              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P08    | 35,0           | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P09    | 2,1            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P10    | 7,5            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 0,8              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P11    | 2,1            | 6,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 0,2                | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P12    | 4,3            | 11,3           | <b>Δ.Α</b>         | 0,5              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P13    | 2,2            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P14    | 0,8            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 82,9             | 0,2                | 0,1              | <b>Δ.Α</b>     |
| P15    | 1,3            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 0,8            |
| P16    | 31,7           | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | 5,4              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 1,0            |
| P17    | 2,6            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 0,3              | 0,1                | <b>Δ.Α</b>       | 0,1            |
| P18    | 10,1           | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 5,3              | 0,1                | <b>Δ.Α</b>       | 0,7            |
| P19    | 4,1            | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | 0,5              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P20    | 3,7            | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | 0,3              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P21    | 3868,0         | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 806,6            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 0,8            |
| P22    | 5,4            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | 0,4              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |

**Πίνακας 25:** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων  
(συνέχεια από τη σελ. 86)

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| P23    | 37,5           | 1,5            | <b>Δ.Α</b>         | 8,1              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P24    | 2,1            | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P25    | 1,5            | 0,8            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P26    | 2,7            | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P27    | 2,6            | 1,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| P28    | 14,4           | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |

**Πίνακας 26.** Στατιστικά στοιχεία για την ομάδα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Μέσος Όρος<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| MPB     | 0,8                 | 146,3                 | 3,2                 | 3868,6             |
| EPB     | <b>Δ.Α</b>          | 1,9                   | 0,3                 | 26,9               |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>          | 32,7                  | 0,2                 | 806,6              |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | 0,2                |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | 0,1                |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>          | 0,3                   | <b>Δ.Α</b>          | 4,4                |

**Πίνακας 27.** Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη στα δείγματα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων (συνέχεια στη σελ.88)

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | iso-PPB<br>(μg/g) | n-PPB<br>(μg/g) | iso-BPB<br>(μg/g) | n-BPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| P01    | 1,92       | 0,8           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| P02    | 1,78       | 6,2           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>        | 1,5             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | 2,5           |

**Πίνακας 27:** Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη στα δείγματα των Πειραματικών Χημικών και Βιολόγων (συνέχεια από τη σελ.87)

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | Iso-PPB<br>(μg/g) | n-PPB<br>(μg/g) | iso-BPB<br>(μg/g) | n-BPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| P03    | 1,04       | 0,9           | 0,1           | Δ.Α               | 0,1             | 0,1               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P04    | 2,45       | 0,6           | 0,1           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P05    | 1,03       | 29,3          | 26,3          | Δ.Α               | 0,2             | Δ.Α               | 0,1             | 0,2           |
| P06    | 1,68       | 1,3           | 0,8           | Δ.Α               | 0,1             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P07    | 3,04       | 1,9           | 0,1           | Δ.Α               | 0,5             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P08    | 2,12       | 16,5          | 0,1           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P09    | 2,15       | 1,0           | 0,1           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P10    | 0,84       | 8,9           | 0,3           | Δ.Α               | 1,0             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P11    | 2,05       | 1,0           | 3,0           | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,1               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P12    | 1,00       | 4,3           | 11,3          | Δ.Α               | 0,5             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P13    | 2,03       | 1,1           | 0,1           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P14    | 2,70       | 0,3           | 0,1           | Δ.Α               | 30,7            | 0,1               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P15    | 3,04       | 0,4           | Δ.Α           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,3           |
| P16    | 0,47       | 67,4          | 0,1           | Δ.Α               | 11,4            | Δ.Α               | Δ.Α             | 2,1           |
| P17    | 1,26       | 2,1           | 0,2           | Δ.Α               | 0,2             | 0,1               | Δ.Α             | 0,1           |
| P18    | 0,62       | 16,5          | 0,3           | Δ.Α               | 8,7             | 0,2               | Δ.Α             | 1,1           |
| P19    | 1,69       | 2,4           | 0,3           | Δ.Α               | 0,3             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P20    | 2,46       | 1,5           | 0,2           | Δ.Α               | 0,1             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P21    | 1,45       | 2668,0        | 0,1           | Δ.Α               | 556,3           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P22    | 1,36       | 4,0           | 0,1           | Δ.Α               | 0,3             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P23    | 1,88       | 20,0          | 0,8           | Δ.Α               | 4,3             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P24    | 2,81       | 0,8           | Δ.Α           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P25    | 0,83       | 1,7           | 0,9           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P26    | 1,20       | 2,3           | Δ.Α           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P27    | 1,56       | 1,7           | 0,7           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| P28    | 178        | 8,1           | 0,2           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |



**Πίνακας 28.** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Πειραματικούς Χημικούς και Βιολόγους

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος<br>Όρος<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|---------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| MPB     | 0,3                | 102,5                   | 2,0                | 2668,0            | 100                  |
| EPB     | <b>Δ.Α</b>         | 1,7                     | 0,2                | 26,3              | 89,3                 |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>           |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>         | 22,0                    | 0,1                | 556,3             | 57,1                 |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | 0,2               | 18                   |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | 0,1               | 4                    |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>         | 0,2                     | <b>Δ.Α</b>         | 2,5               | 21,4                 |

## **5.2. Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Μη Πειραματικών/Εργαζόμενων Τμ. Χημείας**

**Πίνακας 29.** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Μη Πειραματικών/Εργαζομένων του Τμ. Χημείας (συνέχεια στη σελ. 90)

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| NP01   | 6,7            | 4,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP02   | 10,3           | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP03   | 21,5           | 4,5            | <b>Δ.Α</b>         | 5,3              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP04   | 3,4            | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | 0,3              | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>     |
| NP05   | 13,6           | 2,6            | <b>Δ.Α</b>         | 4,0              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP06   | 1,1            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 0,6            |
| NP07   | 3,4            | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP08   | 1,7            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP09   | 7,2            | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | 1,2              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 1,1            |
| NP10   | 1,6            | 0,6            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 0,6            |

**Πίνακας 29:** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Μη Πειραματικών/Εργαζομένων του Τμ. Χημείας (συνέχεια από τη σελ. 89)

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| NP11   | 1,9            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | 0,4            |
| NP12   | 175,2          | 52,0           | <b>Δ.Α</b>         | 22,8             | 0,1                | 4,4              | 0,9            |
| NP13   | 2,1            | 0,7            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 1,5            |
| NP14   | 25,8           | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 23,7             | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP15   | 3,3            | 3,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP16   | 1,5            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| NP17   | 5,6            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 0,7              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 0,4            |
| NP18   | 33,6           | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | 0,1                | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |

**Πίνακας 30.** Στατιστικά στοιχεία για τους Μη Πειραματικούς/Εργαζομένους του Τμ. Χημείας

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Μέσος Όρος<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| MPB     | 1,1                 | 17,8                  | 4,5                 | 175,2              |
| EPB     | 0,1                 | 4,0                   | 0,5                 | 52,0               |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>          | 3,2                   | <b>Δ.Α</b>          | 23,7               |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | 0,1                |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>          | 0,3                   | <b>Δ.Α</b>          | 4,4                |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>          | 0,3                   | <b>Δ.Α</b>          | 1,5                |

**Πίνακας 31.** Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη για τους Μη Πειραματικούς/Εργαζομένους του Τμ. Χημείας (συνέχεια στη σελ.91)

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | iso-PPB<br>(μg/g) | n-PPB<br>(μg/g) | iso-BPB<br>(μg/g) | n-BPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| NP01   | 2,07       | 3,3           | 2,0           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| NP02   | 2,05       | 5,0           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |

**Πίνακας 31:** Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη για τους Μη Πειραματικούς/Εργαζομένους του Τμ. Χημείας (συνέχεια από τη σελ.90)

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | iso-PPB<br>(μg/g) | n-PPB<br>(μg/g) | iso-BPB<br>(μg/g) | n-BPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| NP03   | 3,78       | 5,7           | 1,2           | Δ.Α               | 1,4             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP04   | 2,64       | 1,3           | 0,2           | Δ.Α               | 0,1             | Δ.Α               | 0,1             | Δ.Α           |
| NP05   | 1,99       | 6,8           | 1,3           | Δ.Α               | 2,0             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP06   | 1,63       | 0,7           | 0,1           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,3           |
| NP07   | 2,37       | 1,4           | 0,2           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP08   | 1,45       | 1,2           | 0,2           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP09   | 2,50       | 2,9           | 0,2           | Δ.Α               | 0,5             | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,4           |
| NP10   | 0,77       | 2,0           | 0,8           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,7           |
| NP11   | 1,37       | 1,4           | 0,1           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | 0,1             | 0,3           |
| NP12   | 1,77       | 99,0          | 29,4          | Δ.Α               | 12,9            | Δ.Α               | 2,5             | 0,5           |
| NP13   | 2,64       | 0,8           | 0,3           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,6           |
| NP14   | 1,62       | 15,9          | 0,2           | Δ.Α               | 14,6            | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP15   | 2,16       | 1,5           | 1,5           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP16   | 0,53       | 2,9           | 0,4           | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α               | Δ.Α             | Δ.Α           |
| NP17   | 0,93       | 6,1           | 0,4           | Δ.Α               | 0,8             | Δ.Α               | Δ.Α             | 0,4           |
| NP18   | 1,24       | 27,2          | 0,4           | Δ.Α               | 0,1             | 0,1               | Δ.Α             | Δ.Α           |

**Πίνακας 32.** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Μη πειραματικούς/ Εργαζόμενους του Τμ. Χημείας (συνέχεια στη σελ. 92)

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος<br>Όρος (μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|---------|--------------------|----------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| MPB     | 0,7                | 10,3                 | 2,9                | 99,0              | 100                  |
| EPB     | 0,1                | 2,2                  | 0,3                | 29,4              | 100                  |
| iso-PPB | Δ.Α                | Δ.Α                  | Δ.Α                | Δ.Α               | Δ.Α                  |
| n-PPB   | Δ.Α                | 1,8                  | Δ.Α                | 14,6              | 44,4                 |
| iso-BPB | Δ.Α                | Δ.Α                  | Δ.Α                | 0,1               | 6                    |

**Πίνακας 32:** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Μη πειραματικούς/ Εργαζόμενους του Τμ. Χημείας (συνέχεια από σελ. 91)

| Ένωση | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος<br>Όρος<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|-------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| n-BPB | <b>Δ.Α</b>         | 0,1                     | <b>Δ.Α</b>         | 2,5               | 17                   |
| BPA   | <b>Δ.Α</b>         | 0,2                     | <b>Δ.Α</b>         | 0,7               | 39                   |

### 5.3. Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Τραπεζικών Υπαλλήλων

**Πίνακας 33.** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Τραπεζικών Υπαλλήλων

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| T01    | 2,7            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T02    | 2,5            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T03    | 13,8           | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | 0,9              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T04    | 7,3            | 1,3            | <b>Δ.Α</b>         | 11,7             | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T05    | 4,3            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 0,1              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T06    | 16,5           | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T07    | 166,1          | 15,4           | <b>Δ.Α</b>         | 13,5             | 0,4                | 3,3              | <b>Δ.Α</b>     |
| T08    | 234,8          | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| T09    | 1,6            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |

**Πίνακας 34.** Στατιστικά στοιχεία για τους τραπεζικούς υπαλλήλους (συνέχεια στη σελ. 93)

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Μέσος<br>Όρος<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) |
|---------|---------------------|--------------------------|---------------------|--------------------|
| MPB     | 1,6                 | 50,0                     | 7,3                 | 234,8              |
| EPB     | 0,1                 | 2,1                      | 0,3                 | 15,4               |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>               | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |

**Πίνακας 34:** Στατιστικά στοιχεία για τους τραπεζικούς υπαλλήλους (συνέχεια από σελ. 92)

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Μέσος Όρος<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>          | 2,9                   | <b>Δ.Α</b>          | 13,5               |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | 0,4                |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>          | 0,4                   | <b>Δ.Α</b>          | 3,3                |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |

**Πίνακας 35.** Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη για τους Τραπεζικούς Υπαλλήλους

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | iso-PPB<br>(μg/g) | n-PPB<br>(μg/g) | iso-BPB<br>(μg/g) | n-BPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| T01    | 2,26       | 1,2           | 0,1           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T02    | 2,02       | 1,3           | 0,1           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T03    | 1,06       | 13,1          | 0,4           | <b>Δ.Α</b>        | 0,8             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T04    | 2,22       | 3,3           | 0,6           | <b>Δ.Α</b>        | 5,3             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T05    | 1,25       | 3,5           | 0,3           | <b>Δ.Α</b>        | 0,1             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T06    | 1,39       | 11,9          | 0,1           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T07    | 1,65       | 101,0         | 9,4           | <b>Δ.Α</b>        | 8,2             | 0,3               | 2,0             | <b>Δ.Α</b>    |
| T08    | 1,68       | 139,7         | 0,3           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| T09    | 0,71       | 2,3           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |

**Πίνακας 36.** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Τραπεζικούς Υπαλλήλους (συνέχεια στη σελ. 94)

| Ένωση | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος Όρος<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|-------|--------------------|----------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| MPB   | 1,2                | 30,8                 | 3,5                | 139,7             | 100                  |
| EPB   | 0,1                | 1,3                  | 0,3                | 9,4               | 100                  |

**Πίνακας 36:** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Τραπεζικούς Υπαλλήλους (συνέχεια από σελ. 93)

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος<br>Όρος<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|---------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>           |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>         | 1,6                     | <b>Δ.Α</b>         | 8,2               | 38,5                 |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | 0,3               | 7,7                  |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>         | 0,2                     | <b>Δ.Α</b>         | 2,0               | 23                   |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>           |

#### **5.4. Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Κομμωτών**

**Πίνακας 37.** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Κομμωτών

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| K01    | 59,2           | 46,6           | <b>Δ.Α</b>         | 23,5             | <b>Δ.Α</b>         | 0,3              | <b>Δ.Α</b>     |
| K02    | 5,5            | 1,4            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K03    | 79,1           | 23,1           | <b>Δ.Α</b>         | 17,0             | <b>Δ.Α</b>         | 0,4              | <b>Δ.Α</b>     |
| K04    | 27,9           | 2,2            | <b>Δ.Α</b>         | 0,6              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K05    | 27,6           | 2,6            | <b>Δ.Α</b>         | 0,9              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K06    | 5,8            | 0,3            | <b>Δ.Α</b>         | 1,1              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K07    | 9,4            | 0,9            | <b>Δ.Α</b>         | 0,3              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K08    | 160,8          | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | 21,0             | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K09    | 14,7           | 6,1            | <b>Δ.Α</b>         | 0,2              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K10    | 100,5          | 1,7            | <b>Δ.Α</b>         | 7,0              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K11    | 21,6           | 3,7            | <b>Δ.Α</b>         | 0,4              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| K12    | 6,9            | 6,2            | 0,2                | 0,5              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |

**Πίνακας 38.** Στατιστικά στοιχεία για τους Κομμωτές

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Μέσος Όρος<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| MPB     | 5,5                 | 43,2                  | 24,6                | 160,8              |
| EPB     | 0,2                 | 7,9                   | 2,4                 | 46,6               |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | 0,2                |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>          | 6,1                   | 0,8                 | 23,5               |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>          | 0,1                   | <b>Δ.Α</b>          | 0,4                |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |

**Πίνακας 39.** Συγκεντρώσεις, κανονικοποιημένες ως προς την κρεατινίνη στα δείγματα των Κομμωτών

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | isoPPB<br>(μg/g) | nPPB<br>(μg/g) | isoBPB<br>(μg/g) | nBPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|------------------|----------------|------------------|----------------|---------------|
| K01    | 2,24       | 26,5          | 20,9          | <b>Δ.Α</b>       | 10,5           | <b>Δ.Α</b>       | 0,1            | <b>Δ.Α</b>    |
| K02    | 2,54       | 2,2           | 0,5           | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K03    | 0,65       | 121,7         | 35,6          | <b>Δ.Α</b>       | 26,2           | <b>Δ.Α</b>       | 0,6            | <b>Δ.Α</b>    |
| K04    | 2,63       | 10,6          | 0,8           | <b>Δ.Α</b>       | 0,2            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K05    | 0,99       | 27,9          | 2,7           | <b>Δ.Α</b>       | 0,9            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K06    | 1,41       | 4,1           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>       | 0,8            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K07    | 1,40       | 6,7           | 0,6           | <b>Δ.Α</b>       | 0,2            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K08    | 2,26       | 71,3          | 0,1           | <b>Δ.Α</b>       | 9,3            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K09    | 2,51       | 5,8           | 2,4           | <b>Δ.Α</b>       | 0,1            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K10    | 2,55       | 39,5          | 0,7           | <b>Δ.Α</b>       | 2,8            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K11    | 2,08       | 10,4          | 1,8           | <b>Δ.Α</b>       | 0,2            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |
| K12    | 2,64       | 2,6           | 2,4           | 0,1              | 0,2            | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     | <b>Δ.Α</b>    |

**Πίνακας 40.** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Κομμωτές

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος<br>Όρος<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|---------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| MPB     | 2,2                | 27,4                    | 10,5               | 121,7             | 100                  |
| EPB     | 0,1                | 5,7                     | 1,3                | 35,6              | 100                  |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | 0,1               | 8,3                  |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>         | 4,3                     | 0,5                | 26,2              | 92                   |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>           |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>         | 0,1                     | <b>Δ.Α</b>         | 0,6               | 16,7                 |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>           |

### **5.5. Συγκεντρώσεις στην ομάδα των Εθελοντών διαφόρων Επαγγελματιών**

**Πίνακας 41.** Συγκεντρώσεις στα δείγματα των Διαφόρων Επαγγελματιών

| Δείγμα | MPB<br>(ng/mL) | EPB<br>(ng/mL) | iso-PPB<br>(ng/mL) | n-PPB<br>(ng/mL) | iso-BPB<br>(ng/mL) | n-BPB<br>(ng/mL) | BPA<br>(ng/mL) |
|--------|----------------|----------------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|----------------|
| E01    | 9,7            | Δ.Α            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E02    | 2,0            | Δ.Α            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E03    | 1,3            | Δ.Α            | <b>Δ.Α</b>         | Δ.Α              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E04    | 1,6            | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | 0,2              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E05    | 43,2           | 13,2           | <b>Δ.Α</b>         | 5,7              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E06    | 1,5            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | 1,8            |
| E07    | 2,4            | 0,1            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E08    | 549,8          | 205,4          | <b>Δ.Α</b>         | 623,0            | <b>Δ.Α</b>         | 163,0            | <b>Δ.Α</b>     |
| E09    | 1,2            | 0,4            | <b>Δ.Α</b>         | 0,3              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E10    | 2,5            | 0,2            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>     |
| E11    | 133,5          | 8,6            | <b>Δ.Α</b>         | 23,8             | 0,9                | 0,6              | 1,5            |
| E12    | 1,8            | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | 0,2              | 0,6            |
| E13    | 1,4            | 0,5            | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>       | <b>0,4</b>     |



**Πίνακας 42.** Στατιστικά στοιχεία για τους Διαφόρους Επαγγελματίες

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(ng/mL) | Μέσος Όρος<br>(ng/mL) | Διάμεσος<br>(ng/mL) | Μέγιστο<br>(ng/mL) |
|---------|---------------------|-----------------------|---------------------|--------------------|
| MPB     | 1,2                 | 57,8                  | 2,4                 | 549,8              |
| EPB     | <b>Δ.Α</b>          | 17,6                  | 0,4                 | 205,4              |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>            | <b>Δ.Α</b>          | <b>Δ.Α</b>         |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>          | 50,2                  | <b>Δ.Α</b>          | 623,0              |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>          | 0,1                   | <b>Δ.Α</b>          | 0,9                |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>          | 12,6                  | <b>Δ.Α</b>          | 163,0              |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>          | 0,3                   | <b>Δ.Α</b>          | 1,8                |

**Πίνακας 43.** Συγκεντρώσεις κανονικοποιημένες, ως προς την κρεατινίνη για τα δείγματα των Διαφόρων Επαγγελματιών

| Δείγμα | Κρεατινίνη | MPB<br>(μg/g) | EPB<br>(μg/g) | iso-PPB<br>(μg/g) | n-PPB<br>(μg/g) | iso-BPB<br>(μg/g) | n-BPB<br>(μg/g) | BPA<br>(μg/g) |
|--------|------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|---------------|
| E01    | 2,59       | 3,7           | <b>Δ.Α</b>    | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E02    | 1,23       | 1,6           | <b>Δ.Α</b>    | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E03    | 1,47       | 0,9           | <b>Δ.Α</b>    | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E04    | 0,76       | 2,1           | 0,5           | <b>Δ.Α</b>        | 0,2             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E05    | 1,50       | 28,8          | 8,8           | <b>Δ.Α</b>        | 3,8             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E06    | 2,20       | 0,7           | <b>Δ.Α</b>    | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | 0,8           |
| E07    | 0,50       | 4,8           | 0,1           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E08    | 2,57       | 213,9         | 79,9          | <b>Δ.Α</b>        | 242,4           | <b>Δ.Α</b>        | 63,4            | <b>Δ.Α</b>    |
| E09    | 2,05       | 0,6           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>        | 0,1             | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E10    | 2,55       | 1,0           | 0,1           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>    |
| E11    | 3,31       | 40,3          | 2,6           | <b>Δ.Α</b>        | 7,2             | 0,3               | 0,2             | 0,5           |
| E12    | 1,78       | 1,0           | 0,3           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | 0,3           |
| E13    | 2,12       | 0,6           | 0,2           | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>      | 0,2           |

**Πίνακας 44.** Στατιστικά στοιχεία κανονικοποιημένα ως προς την κρεατινίνη για τους Διαφόρους Επαγγελματίες

| Ένωση   | Ελάχιστο<br>(μg/g) | Μέσος<br>Όρος<br>(μg/g) | Διάμεσος<br>(μg/g) | Μέγιστο<br>(μg/g) | Ανιχνευσιμότητα<br>% |
|---------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| MPB     | 0,6                | 23,1                    | 1,6                | 213,9             | 100                  |
| EPB     | <b>Δ.Α</b>         | 7,1                     | 0,2                | 79,9              | 69,2                 |
| iso-PPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>        | <b>Δ.Α</b>           |
| n-PPB   | <b>Δ.Α</b>         | 19,5                    | <b>Δ.Α</b>         | 242,4             | 38,5                 |
| iso-BPB | <b>Δ.Α</b>         | <b>Δ.Α</b>              | <b>Δ.Α</b>         | 0,3               | 7,7                  |
| n-BPB   | <b>Δ.Α</b>         | 4,9                     | <b>Δ.Α</b>         | 63,4              | 23                   |
| BPA     | <b>Δ.Α</b>         | 0,1                     | <b>Δ.Α</b>         | 0,8               | 31                   |

## 6. Βιβλιογραφία

---

- [1] Neal JM. How the Endocrine System Works. John Wiley & Sons, New York, 2001
- [2] Hinson J, Raven P, Chew SL. London, 2007.
- [3] Parker S. Hormones. Heinemann/Raintree, Chicago, 2009
- [4] Vandenberg, L.N, *Endocr Rev*, 2012. 33(3).
- [5] L.N. Vandenberg, M.V. Maffini, C. Sonnenschein, B.S. Rubin, A.M. Soto, *Endocr Rev*, 30 (2009) 75-95.
- [6] I. Rykowska, W. Wasiak, *Acta Chromatographica*, NO. 16, 2006
- [7] T. Yamamoto, A. Yasuhara, *Chemosphere*, 46 (2002) 1215-1223.
- [8] H. Takemura, J. Ma, K. Sayama, Y. Terao, B.T. Zhu, K. Shimoi, *Toxicology*, 207 (2005) 215-221.
- [9] J.H. Kang, F. Kondo, Y. Katayama, *Toxicology*, 226 (2006) 79-89.
- [10] A.V. Krishnan, P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, D. Feldman, *Endocrinology*, 132 (1993) 2279-2286.
- [11] X. Ye, A.M. Bishop, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Anal Chim Acta*, 622 (2008) 150-156.
- [12] Electronic reference  
[http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa\\_action\\_plan.pdf](http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa_action_plan.pdf)
- [13] W.V. Welshons, S.C. Nagel, F.S. vom Saal, *Endocrinology*, 147 (2006) S56-69.
- [14] I. Jimenez-Diaz, A. Zafra-Gomez, O. Ballesteros, N. Navea, A. Navalon, M.F. Fernandez, N. Olea, J.L. Vilchez, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 878 (2010) 3363-3369.
- [15] S.H. Cho, M.H. Choi, O.S. Kwon, W.Y. Lee, B.C. Chung, *J Appl Toxicol*, 29 (2009) 110-117.
- [16] R.E. Chapin, J. Adams, K. Boekelheide, L.E. Gray, Jr., S.W. Hayward, P.S. Lees, B.S. McIntyre, K.M. Portier, T.M. Schnorr, S.G. Selevan, J.G. Vandenberg, S.R. Woskie, *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 83 (2008) 157-395.
- [17] C.A. Richter, L.S. Birnbaum, F. Farabollini, R.R. Newbold, B.S. Rubin, C.E. Talsness, J.G. Vandenberg, D.R. Walser-Kuntz, F.S.V. vom Saal, *Reproductive Toxicology*, 24 (2007) 199-224.
- [18] S. Flint, T. Markle, S. Thompson, E. Wallace, *J Environ Manage*, 104 (2012) 19-34.

- 
- [19] Y.H. Kim, C.S. Kim, S. Park, S.Y. Han, M.Y. Pyo, M. Yang, *Biochem Biophys Res Commun*, 312 (2003) 441-448.
- [20] K.A. Ehlert, C.W.E. Beumer, M.C.E. Groot, *Food Addit Contam A*, 25 (2008) 904-910.
- [21] C. Brede, P. Fjeldal, I. Skjevraak, H. Herikstad, *Food Addit Contam*, 20 (2003) 684-689.
- [22] J.H. Kang, K. Kito, F. Kondo, *J Food Prot*, 66 (2003) 1444-1447.
- [23] U. Bolz, H. Hagenmaier, W. Korner, *Environ Pollut*, 115 (2001) 291-301.
- [24] Electronic reference  
[http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre\\_23.html#small-c23-fig23.2](http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/Chapitre_23.html#small-c23-fig23.2)
- [25] R.W. Snyder, S.C. Maness, K.W. Gaido, F. Welsch, S.C. Sumner, T.R. Fennell, *Toxicol Appl Pharmacol*, 168 (2000) 225-234.
- [26] H. Yokota, H. Iwano, M. Endo, T. Kobayashi, H. Inoue, S. Ikushiro, A. Yuasa, *Biochem J*, 340 ( Pt 2) (1999) 405-409.
- [27] R. Elsby, J.L. Maggs, J. Ashby, B.K. Park, *J Pharmacol Exp Ther*, 297 (2001) 103-113.
- [28] W. Volkel, T. Colnot, G.A. Csanady, J.G. Filser, W. Dekant, *Chem Res Toxicol*, 15 (2002) 1281-1287.
- [29] C. Liao, K. Kannan, *Environ Sci Technol*, 46 (2012) 5003-5009.
- [30] Electronic reference  
[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/No\\_05\\_Bisphenol\\_A\\_Nov09\\_en.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_en.pdf)
- [31] N.K. Wilson, J.C. Chuang, C. Lyu, R. Menton, M.K. Morgan, *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 13 (2003) 187-202.
- [32] N.K. Wilson, J.C. Chuang, M.K. Morgan, R.A. Lordo, L.S. Sheldon, *Environ Res*, 103 (2007) 9-20.
- [33] Kwok Onn Wong, Lay Woon Leo, & Huay Leng Seah, *Environ Res*, March 2005; 22(3): 280-288
- [34] T. Colborn, F.S.V. Saal, A.M. Soto, *Environmental Health Perspectives*, 101 (1993) 378-384.

- 
- [35] M.G. Soni, I.G. Carabin, G.A. Burdock, *Food and Chemical Toxicology*, 43 (2005) 985-1015.
- [36] Survey of parabens Part of the LOUS-review Environmental Project No. 1474, 2013
- [37] Electronic reference  
<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7233>
- [38] Electronic reference <http://www.sharon-labs.com/images/items/30.pdf>
- [39] Elder, *Journal of the American College of Toxicology* 3, 147-209
- [40] R. Golden, J. Gandy, G. Vollmer, *Critical Reviews in Toxicology*, 35 (2005) 435-458.
- [41] Washington State Department of Health for the Children's Safe Product Act
- [42] World Health Organization 2007
- [43] Electronic reference  
<http://www.fda.gov/cosmetics/productandingredientsafety/selectedcosmeticingredients/ucm128042.htm>
- [44] P.D. Darbre, P.W. Harvey, *Journal of Applied Toxicology*, 28 (2008) 561-578.
- [45] D.S. Orth, *Int J Dermatol*, 19 (1980) 504-505.
- [46] Lei Wang, Chunyang Liao, Fang Liu, Qian Wu, Ying Guo, Hyo-Bang Moon, Haruhiko Nakata, and Kurunthachalam Kannan *Environ. Sci. Technol.*, 2012, 46 (21), pp 11584–11593
- [47] Electronic reference <http://myph.org/spatial-mapping/hazardous-substances/hazardous-substances-data-bank-hsdb>
- [48] Electronic reference: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>
- [49] Tsukamoto H, Terade S. 1964. *Chem Pharm Bull* 12:765-769.
- [50] S. Abbas, H. Greige-Gerges, N. Karam, M.H. Piet, P. Netter, J. Magdalou, *Drug Metab Pharmacokinet*, 25 (2010) 568-577.
- [51] Pedersen S, Marra F, Nicoli S. *Int J Cosmet Sci*. 2007 Oct;29(5):361–7.
- [52] Matthews C, Davidson J, Bauer E, Morrison JL, Richardson AP. *J Am Pharm Assoc Sci Ed* 1956;45:260-7.

- 
- [53] J. Boberg, C. Taxvig, S. Christiansen, U. Hass, *Reproductive Toxicology*, 30 (2010) 301-312.
- [54] M.G. Soni, G.A. Burdock, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, *Food Chem Toxicol*, 39 (2001) 513-532.
- [55] Derache, R. & Gourdon, J. (1963) *Food Cosmet. Toxicol.*, 1, 189
- [56] P.D. Darbre, A. Aljarrah, W.R. Miller, N.G. Coldham, M.J. Sauer, G.S. Pope, *Journal of Applied Toxicology*, 24 (2004) 5-13.
- [57] W.J. Crinnion, *Altern Med Rev*, 15 (2010) 190-196.
- [58] Electronic reference :  
[http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/substances\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/endocrine/strategy/substances_en.htm)
- [59] Soni MG, *Food Chem Toxicol* 40 (10): 1335-73 (2002)
- [60] C. Lemini, R. Jaimez, M.E. Avila, Y. Franco, F. Larrea, A.E. Lemus *Toxicology and Industrial Health*, 19 (2003) 69-79
- [61] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2005
- [62] Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2010
- [63] Kang, K.S, *The Journal of Veterinary Medical Science*. 64 (3) 227–235 (2002)
- [64] Koda T, Umezu T, Kamata R, Morohoshi K, Ohta T, Morita M. *Environ Res* 005;98:40–5
- [65] Schirmer BC, Langsrud SJ *Food Sci*. 2010 Mar;75(2):M98-M102.
- [66] Kunicka-Styczynska A, Sikora M, Kalemba D. *J Appl Microbiol*. 2009 Dec;107(6):1903-11.
- [67] M.G. Kirchhof, G.C. de Gannes, *Skin Therapy Lett*, 18 (2013) 5-7.
- [68] Kazuyuki Ouchi, Shaw Watanabe *Journal of Chromatography B*, Volume 780, Issue 2, 25 November 2002, Pages 365–370
- [69] Akiko Matsumoto, Naoki Kunugita, Kyoko Kitagawa, Toyohi Isse, Tsunehiro Oyama, Gary L. Foureman, Masatoshi Morita, and Toshihiro Kawamoto *Environmental Health Perspectives* ,2003
- [70] Terasaki M, Kamata R, Shiraishi F, Makino M. *Environ Toxicol Chem*. 2009 Jan;28(1):204-8. doi: 10.1897/08-225.1.

- 
- [71] L. Dewalque, C. Pirard, N. Dubois, C. Charlier, J Chromatogr B, 949 (2014) 37-47.
- [72] Electronic reference:  
[http://shop.perkinelmer.com/content/applicationnotes/BKT\\_FlexarSQ300Applications.pdf](http://shop.perkinelmer.com/content/applicationnotes/BKT_FlexarSQ300Applications.pdf)
- [73] R. Preuss, H.M. Koch, J. Angerer, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 816 (2005) 269-280.
- [74] M.J. Silva, E. Samandar, J.L. Preau, Jr., J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, J
- [75] L. Dewalque, C. Pirard, N. Dubois, C. Charlier, J Chromatogr B, 949 (2014) 37-47.
- [76] M. Chen, L. Tao, E.M. Collins, C. Austin, C.S. Lu, J Chromatogr B, 904 (2012) 73-80.
- [77] Electronic reference <http://www.polyintell.com/technology/solid-phase-extraction/>
- [78] Electronic reference <http://www.chromacademy.com>
- [79] Σημειώσεις μεταπτυχιακού μαθήματος Αναλυτική Χημεία Περιβάλλοντος Ι, Στεφάνου Ε.
- [80] Electronic reference  
<http://www.lamondlab.com/MSResource/LCMS/MassSpectrometry/electrosprayionisation.php>
- [81] Μ.Δ.Ε Λέτσου
- [82] Electronic reference <http://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/introduction>
- [83] Electronic reference <http://www.shimadzu.com/an/lcms/lcmsittof/ittof-8.html>
- [84] Skoog, Instrumental analysis
- [85] Electronic reference  
<http://www.astbury.leeds.ac.uk/facil/MStut/mstutorial.htm>
- [86] Electronic reference <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/ms/quadrupo.htm>
- [87] Μ.Δ.Ε Μυριδάκης Α.
- [88] Μ.Δ.Ε Γκαϊτατζη Χ.
- [89] Electronic reference <http://elchem.kaist.ac.kr/vt/chem-ed/ms/quadrupo.htm>
- [90] Electronic reference [emmanouela.yolasite.com](http://emmanouela.yolasite.com)

- 
- [91] Electronic reference <http://www.mac-mod.com/pdf/technical-report/036ColumnComparisonGuide.pdf>
- [92] Electronic reference [http://www.bioszeparacio.hu/\\_user/browser/File/MZ-Analysentechnik/highlights\\_e.pdf](http://www.bioszeparacio.hu/_user/browser/File/MZ-Analysentechnik/highlights_e.pdf)
- [93] Electronic reference [http://www.bioszeparacio.hu/\\_user/downloads/Thermo%20Electron/TG01-03.pdf](http://www.bioszeparacio.hu/_user/downloads/Thermo%20Electron/TG01-03.pdf)
- [94] B.C. Blount, K.E. Milgram, M.J. Silva, N.A. Malek, J.A. Reidy, L.L. Needham, J.W. Brock, *Anal Chem*, 72 (2000) 4127-4134.
- [95] M.J. Chen, P.F. Zhu, B. Xu, R.C. Zhao, S.L. Qiao, X.J. Chen, R. Tang, D. Wu, L. Song, S.L. Wang, Y.K. Xia, X.R. Wang, *J Anal Toxicol*, 36 (2012) 608-615.
- [96] .M. Koch, L.M. Gonzalez-Reche, J. Angerer, *J Chromatogr B*, 784 (2003) 169-182
- [97] Xiaoyun Ye, Amber M. Bishop, John A. Reidy, Larry L. Needham, and Antonia M. Calafat *Environmental Health Perspectives* Volume 114, Number 12, December 2006
- [98] A.M. Calafat, Z. Kuklennyik, J.A. Reidy, S.P. Caudill, J. Ekong, L.L. Needham, *Environ Health Perspect*, 113 (2005) 391-395.
- [99] Antonia M. Calafat, CDC Environmental Health, Procedure Manual
- [100] Xiaoyun Ye, Zsuzsanna Kuklennyik, Larry L. Needham, Antonia M. Calafat, *Anal Bioanal Chem* (2005) 383: 638-644