**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**
**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑΣ**

**Τουτουδάκη Μαρία**

# Δείκτες χρόνιας έκθεσης σε φυτοφάρμακα

## Μελέτη εναπόθεσης οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων στις τρίχες

**Διδακτορική Διατριβή**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2007**

Αφιερώνεται στους γονείς μου

***Ευχαριστίες***

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους εκείνους που χωρίς τη συμβολή τους η ολοκλήρωση του έργου αυτού θα ήταν αδύνατη.

Καταρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Αριστείδη Τσατσάκη, που με την ανάθεση ενός πολύ ενδιαφέροντος και πρωτότυπου θέματος με έβαλε να κολυμπήσω σε βαθιά νερά. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την επταμελή επιτροπή και ιδιαίτερα τον κύριο Νικόλαο Χανιωτάκη για την εποικοδομητική κριτική τους, και όλους εκείνους τους ανθρώπους στο πανεπιστήμιο Κρήτης και στο εξωτερικό, που με τον ένα ή τον άλλο τρόπο με βοήθησαν να ξεπεράσω τις κακοτοπιές που συνάντησα και έβαλαν το λιθαράκι τους στην ολοκλήρωση της μελέτης.

Ξεχωριστά θα ήθελα να ευχαριστήσω έναν-έναν τους φίλους, που εκτός από την κριτική τους μου προσέφεραν ηθική συμπαράσταση και ανέχτηκαν τα νεύρα μου όταν η εργασία φαινόταν ότι δε θα τελείωνε ποτέ. Ευχαριστώ τον Θανάση Αλεγκάκη για την βοήθεια του στη συγγραφή και τη διαμόρφωση της διατριβής, τον Μανώλη Τζατζαράκη, συνάδελφο στο εργαστήριο Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον Adrian Covaci του εργαστηρίου Τοξικολογίας του Πανεπιστημίου της Αμβέρσας (University of Antwerp, Belgium) για τη συμβολή τους στα πειράματα, και την αρχαιολόγο Μαριάννα Κατηφόρη Θαλασσινή για τον ευπρεπισμό των ελληνικών μου.

Οι μεγαλύτερες ευχαριστίες όμως ανήκουν στους γονείς και τα αδέρφια μου για την συμπαράσταση τους σε ότι έχω κάνει μέχρι τώρα.

***Πίνακας Περιεχομένων***

ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... 13
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 16
1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ..... 16
1.1 Φυτοφάρμακα και υγεία..... 16
1.2 Οξείες και χρόνιες δηλητηριάσεις από καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα..... 17
1.3 Μεταβολισμός και μοριακός μηχανισμός τοξικότητας και αποτοξίνωσης του οργανισμού..... 18
1.4 Αξιολόγηση και διαχείριση επικινδυνότητας της έκθεσης σε εντομοκτόνα..... 20
1.5 Μέθοδοι καταγραφής και αξιολόγησης της έκθεσης του ανθρώπου και του περιβάλλοντος..... 21
1.5.1 Αξιολόγηση κινδύνου του περιβάλλοντος (Environmental Risk Assessment) ……...21
1.5.2 Αξιολόγηση κινδύνου για τον άνθρωπο (Human Risk Assessment)..... 23
2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΤΡΙΧΑΣ..... 26
2.1 Ανατομία και φυσιολογία της ανθρώπινης τρίχας..... 26
2.2 Κύκλος και ρυθμός ανάπτυξης της τρίχας..... 29
2.3 Μηχανισμοί εναπόθεσης ουσιών στην τρίχα..... 30
3 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΜΟΛΥΝΤΩΝ ΣΤΗ ΤΡΙΧΑ..... 33
3.1 Ανάλυση τριχών για φυτοφάρμακα..... 33
3.1.1 Μέθοδοι εκχύλισης των φυτοφαρμάκων από τις τρίχες και μελέτες ανάκτησης..... 33
3.1.2 Αναλυτικές τεχνικές..... 35
4 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΜΟΛΥΝΤΕΣ: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ..... 40
4.1 Οργανοφωσφορικά Εντομοκτόνα..... 40
4.1.1 Diazinon..... 40
4.1.2 Fenthion..... 42
4.1.3 Methyl Parathion..... 43
4.2 Καρβαμιδικά..... 44
4.2.1 Methomyl..... 45
4.3 Οργανοχλωριομένα..... 46
4.3.1 DDT..... 47
4.3.2 Lindane..... 49
4.3.3 Πολυχλωριομένα διαφαινύλια (PCBs)..... 50
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ..... 52
5 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ: ΤΟ DIAZINON ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ *IN VIVO* ΚΑΙ *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΕΣ..... 52
5.1 ΜΕΛΕΤΗ Ι: Ανίχνευση του εντομοκτόνου Diazinon σε τρίχες άσπρων κουνελιών Νέας Ζηλανδίας..... 53
5.1.1 Πειραματόζωα..... 53
5.1.2 Υλικά και Μέθοδοι..... 53
5.1.2.1 Μετρήσεις ακετυλοχολινεστεράσης πλάσματος..... 54
5.1.2.2 Εκχύλιση diazinon από τις τρίχες..... 54
5.1.2.3 Ανάλυση με GC-NPD..... 55
5.1.2.4 Ανάλυση με GC-MS..... 55
5.1.2.5 Πειράματα αξιολόγησης της μεθόδου εκχύλισης..... 56

5.1.3 Στατιστική επεργασία αποτελεσμάτων ..... 57
5.1.4 Αποτελέσματα και συζήτηση ..... 57
5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΙΙ: Ανίχνευση του εντομοκτόνου diazinon σε τρίχες άσπρων αρουραίων Sprague-Dawley. ..... 62
5.2.1 Πειραματόζωα ..... 62
5.2.2 Αντιδραστήρια ..... 63
5.2.3 Εκχύλιση του diazinon από τις τρίχες ..... 63
5.2.4 Ανάλυση με Negative Chemical Ionization GC-MS (NCI GC-MS) ..... 63
5.2.5 Αξιολόγηση της μεθόδου ..... 64
5.2.6 Συνολική παρουσίαση και συζήτηση των αποτελεσμάτων των μελετών για την ανίχνευση diazinon στις τρίχες πειραματόζωων. ..... 70
5.3 Μελέτη ΙΙΙ: Πειράματα in vitro με ανθρώπινες τρίχες φορτισμένες με diazinon 72
5.3.1 Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εμβάπτισης των τριχών σε διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης diazinon, στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του εντομοκτόνου στις τρίχες. ..... 72
5.3.2` Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του διαλύματος εμβάπτισης στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του diazinon στις τρίχες. ..... 73
5.3.3 Μελέτη της επίδρασης του χρώματος των τριχών στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση diazinon ..... 74
6 ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ: ΤΟ METHOMYL ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΕ ΤΡΙΧΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ ..... 76
6.1 ΜΕΛΕΤΗ IV: Ανίχνευση methomyl σε τρίχες κουνελιών Νέας Ζηλανδίας ..... 76
6.1.1 Πειραματόζωα ..... 76
6.1.2 Μέτρηση ακετυλοχολινεστεράσης ..... 77
6.1.3 Συλλογή δειγμάτων τριχών ..... 77
6.1.4 Εκχύλιση εντομοκτόνου ..... 77
6.1.5 Μέτρηση επιπέδων methomyl στις τρίχες με ανοσοχημική μέθοδο (ELISA) 78
6.1.6 Μέτρηση επιπέδων methomyl στις τρίχες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ..... 78
6.1.7 Μέτρηση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης ..... 79
6.1.8 Επίπεδα methomyl στις τρίχες ..... 79
7 ΕΠΙΜΟΝΟΙ ΟΡΓΑΝΟΧΩΡΙΟΜΕΝΟΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΜΟΛΥΝΤΕΣ ΣΕ ΤΡΙΧΕΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ ..... 83
Εισαγωγή ..... 83
7.1 ΜΕΛΕΤΗ V: Μελέτη χρόνιας έκθεσης ανθρώπων σε συγκεκριμένες επίμονες οργανοχλωριομένες ενώσεις ..... 83
7.1.1 Δειγματοληψία ..... 84
7.1.2 Μεθοδολογία ..... 84
7.1.3 Οργανολογία ..... 85
7.1.4 Αξιολόγηση μεθόδου ..... 86
7.1.5 Σύγκριση του προφίλ και των συγκεντρώσεων οργανοχλωριωμένων μολυντών σε τρεις Ευρωπαϊκές χώρες. ..... 88
7.1.6 Ελληνικά δείγματα ..... 90
7.2. Μελέτη τριχών από κατοίκους αστικών περιοχών του Λιβάνου και της Ελλάδας για την αξιολόγηση της επιβάρυνσης με περιβαλλοντικούς μολυντές μέσω της δίαιτας 97
7.2.1 Σκοπός της μελέτης ..... 97
7.2.2 Δείγματα τριχών ..... 97
7.2.3 Οργανολογία ..... 97
7.2.4 Αξιολόγηση μεθόδου ..... 98

7.2.5 Αποτελέσματα ..... 98
7.2.6 Συζήτηση ..... 101
ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ..... 103
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ..... 106

***Περίληψη***

Σκοπός της διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση της δυνατότητας της χρήσης των τριχών σαν δείκτη χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης σε φυτοφάρμακα, και πιο συγκεκριμένα σε οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα. Μελέτες αυτού του είδους δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα. Για την επίτευξη του παραπάνω στόχου πραγματοποιήθηκαν πειράματα *in vitro* και μελέτες σε πειραματόζωα.

Παράλληλα μελετήθηκε η εναπόθεση στις τρίχες οργανοχλωριομένων φυτοφαρμάκων και πολυχλωριομένων διφαινυλίων (PCBs), ουσίες που προσλαμβάνονται είτε μέσω της διατροφής, είτε από το περιβάλλον. Τα οργανοχλωριομένα φυτοφάρμακα δεν χρησιμοποιούνται πια και τα PCBs είναι παραπροϊόντα βιομηχανικών δραστηριοτήτων.

Το πρώτο βασικό βήμα που έγινε ήταν η ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων για την μέτρηση των προαναφερθέντων ουσιών σε ένα δύσκολο βιολογικό δείγμα όπως οι τρίχες, οι οποίες περιέχουν λιπίδια, κερατίνες, μελανίνη και άλλες ουσίες.

Το εντομοκτόνο diazinon επιλέχθηκε ως η ένωση μοντέλο για τη μελέτη της εναπόθεσης των οργανοφωσφορικών στις τρίχες. Η προετοιμασία των δειγμάτων περιλάμβανε εκχύλιση του φυτοφαρμάκου από τις τρίχες με μεθανόλη στους 37 $^{0}$C όλη νύχτα, ακολουθούμενη από υγρή – υγρή εκχύλιση με αιθυλικό ακετυλεστέρα εξάτμιση του διαλύτη με άζωτο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με GC-MS ή GC-NPD. Η ανάλυση GC-MS έγινε σε full scan mode και SIM mode. Το δεύτερο φίλτρο προσέφερε μεγαλύτερη ευαισθησία και περισσότερη εκλεκτικότητα. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν δύο μέθοδοι ιονισμού. Ηλεκτρονιακός ιονισμός και αρνητικός χημικός ιονισμός με μεθάνιο. Ο χημικός ιονισμός προσέφερε ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία στην ανάλυση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο χημικός ιονισμός σπάει τις ουσίες σε λιγότερα ιόντα. Έτσι για το όριο ανίχνευσης για το diazinon ήταν δύο φορές πιο χαμηλό με τον χημικό ιονισμό από ότι με τον ηλεκτρονιακό.

Ακολούθως μελετήθηκε η εξωτερική εναπόθεση του φυτοφαρμάκου σε ανθρώπινες τρίχες χρησιμοποιώντας φορτισμένα δείγματα. Μελετήθηκαν τρεις παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη συγκέντρωση που ανιχνεύεται. Οι τρίχες (ίδιου χρώματος) εμβαπτίστηκαν σε υδατικά διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε ξέπλυμα των δειγμάτων με νερό, στέγνωμα, ομεγενοποίηση, εκχύλιση με μεθανόλη σε υδατόλουτρο με υπέρηχους, υγρή–υγρή εκχύλιση με αιθυλικό ακετυλεστέρα, εξάτμιση του διαλύτη, επαναδιάλυση σε 50 μl μεθανόλης και ανάλυση με EI GC-MS. Βρέθηκε ότι η συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου ήταν ανάλογη της συγκέντρωσης του διαλύματος και του χρόνου εμβάπτισης.

Το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας τρίχες διαφορετικών αποχρώσεων του καστανού οι οποίες εμβαπτίστηκαν σε ίδιας συγκέντρωσης διάλυμα για ίδιο χρονικό διάστημα. Τα αποτελέσματα μας έδειξαν ότι το χρώμα της τρίχας δεν επηρεάζει σημαντικά την συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου που προσδένεται σε αυτή από το περιβάλλον. Αντίθετα ίσως να παίζουν ρόλο άλλοι παράγοντες, όπως η λιπαρότητα ή η διάμετρος της τρίχας.

Το επόμενο βήμα ήταν η μελέτη της απορρόφησης του φυτοφαρμάκου από τις τρίχες *in vivo*. Χρησιμοποιήθηκαν κουνέλια και αρουραίοι. Τα κουνέλια είναι ευαίσθητα στο diazinon ενώ οι αρουραίοι είναι ανθεκτικοί. Αυτό φαίνεται πολύ καθαρά από την διαφορά στις $LD_{50}$. Μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό από τις δόσεις που χορηγήθηκαν ανιχνεύθηκε στις τρίχες. Η συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου που ανιχνεύθηκε ήταν διπλάσια στις τρίχες των αρουραίων από αυτή που ανιχνεύθηκε στις τρίχες των κουνελιών, παρόλο που στα κουνέλια είχαν χορηγηθεί μεγαλύτερες δόσεις. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός της παρουσίας μεγαλύτερης συγκέντρωσης των ενζύμων CYP 450 στα κουνέλια τα οποία μεταβολίζουν το diazinon σε diazoxon, ουσία πολύ πιο δραστική από τη μητρική.

Για την ανίχνευση του methomyl χρησιμοποιήθηκε αρχικά ELISA ενώ η ταυτοποίηση έγινε με HPLC. Παρόλο που για το methomyl πήραμε αποδεκτά αποτελέσματα με ELISA, υπήρχε το μειονέκτημα των κρίσιμων παρεμβολών του υποστρώματος. Ήταν μάλιστα τόσο μεγάλο το πρόβλημα που η μέθοδος εγκαταλείφθηκε για τα υπόλοιπα φυτοφάρμακα. Η ανάλυση με GC-MS δεν ήταν εφικτή λόγω της διάσπασης του εντομοκτόνου κάτω από τις συνθήκες της ανάλυσης.

Εκτός όμως από την επαγγελματική έκθεση υπάρχει και η έκθεση σε ουσίες μέσω της τροφής. Μελετήθηκε η έκθεση σε ουσίες όπως τα οργανοχλωριομένα φυτοφάρμακα, τα οποία έχουν πάψει να χρησιμοποιούνται εδώ και δεκαετίες και τα πολυχλωριομένα διφαινύλια (PCBs), τα οποία είναι παραπροϊόντα βιομηχανικής δραστηριότητας. Μάλιστα έγινε συγκριτική μελέτη σε πληθυσμό από την Ελλάδα, τη Ρουμανία και το Βέλγιο. Με την ολοκλήρωση της αξιολόγησης των μεθόδων, η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε αφού πρώτα οι τρίχες υδρολύθηκαν με υδροχλωρικό οξύ, εκχυλίστηκαν με υγρή-υγρή εκχύλιση με μίγμα εξανίου- διχλωρομεθανίου (4:1) και καθαρίστηκαν με solid phase extraction σε στήλη με όξινο πυρίτιο. Για την ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αέρια χρωματογραφία με electron capture detection (GC-ECD) και GC-MS για επιβεβαίωση.

Τα Ελληνικά δείγματα βρέθηκε να είναι τα πιο επιβαρυμένα σε οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα ενώ αντίθετα ανιχνεύθηκε μικρότερη ποσότητα PCBs. Τα Βελγικά δείγματα βρέθηκε να είναι πιο επιβαρυμένα με PCBs και να περιέχουν τα λιγότερα εντομοκτόνα, ενώ

στα δείγματα από τη Ρουμανία ανιχνεύτηκαν λιγότερα εντομοκτόνα από τα ελληνικά αλλά περισσότερα από τα Βελγικά.

Κατά τη μελέτη της εναπόθεσης του diazinon στις τρίχες, αναπτύχθηκαν τρεις αναλυτικές μέθοδοι βασισμένες σε αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με ανιχνευτή NPD και MS. Και οι τρεις μέθοδοι αποδείχτηκαν εκλεκτικές και ευαίσθητες για την ανίχνευση του diazinon στις τρίχες, σε επίπεδα εκατοντάδων pg/mg. Με τη χορήγηση του εντομοκτόνου diazinon λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας και λευκούς αρουραίους Sprague Dawley, επιβεβαιώθηκε ότι το diazinon εναποτίθεται στις τρίχες όταν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, και μάλιστα η συγκέντρωση που ανιχνεύεται στις τρίχες είναι ανάλογη με τη δόση χορήγησης. Συγκρίνοντας τις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις στα δύο είδη, είναι φανερό ότι το μεταβολικό τους προφίλ καθορίζει την ποσότητα του εντομοκτόνου που κυκλοφορεί στο αίμα και άρα την ποσότητα που ανιχνεύεται στις τρίχες.

Τα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι το diazinon δεσμεύεται στις τρίχες και στην περίπτωση που η έκθεση είναι εξωτερική. Μάλιστα, καθοριστικό ρόλο στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση στις τρίχες παίζουν η συγκέντρωση του εντομοκτόνου στο μέσο έκθεσης και ο χρόνος έκθεσης. Το χρώμα των τριχών και κατ' επέκταση η περιεκτικότητα τους σε μελανίνη φαίνεται να παίζει δευτερεύοντα ρόλο στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση. Πιο σημαντικό ρόλο παίζουν άλλα χαρακτηριστικά των τριχών, όπως η λιπαρότητα.

Κατά τη μελέτη εναπόθεσης του methomyl στις τρίχες πειραματόζωων και της μέτρησης των επιπέδων του με γνωστές μεθόδους, επιβεβαιώθηκε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση του στις τρίχες. Μάλιστα σε αυτήν τη μελέτη πραγματοποιήθηκε τμηματική ανάλυση τριχών η οποία απέδειξε ότι το methomyl δεσμεύεται σε συγκεκριμένα σημεία στην τρίχα, και η διάχυση του στο υπόλοιπο στέλεχος είναι περιορισμένη. Έτσι, ειδικά για τις ανθρώπινες τρίχες είναι δυνατό να έχουμε ένα ακριβές ιστορικό έκθεσης, αν παραδεχτούμε το γεγονός ότι η ανθρώπινη τρίχα μακραίνει περίπου ένα εκατοστό ανά μήνα.

Το κύριο συμπέρασμα της μελέτης των οργανοχλωριομένων ήταν ότι οι ουσίες που εξετάσαμε ανιχνεύονται σε όλα τα δείγματα μας. Η επιβάρυνση φάνηκε να είναι ανάλογη με τον τόπο κατοικίας των ανθρώπων που πήραν μέρος στη μελέτη. Τα Ελληνικά δείγματα κατοίκων αγροτικών περιοχών με επαγγελματική έκθεση σε φυτοφάρμακα, ήταν περισσότερο επιβαρυμένα με DDTs, και λιγότερο επιβαρυμένα με PCBs. Αντίστοιχα η επιβάρυνση με ισομερή του εξαχλωροκυκλοεξανίου ήταν παρόμοια και στις τρεις χώρες.

Συμπερασματικά κατά τη διάρκεια της διατριβής καταρχήν αναπτύχθηκαν αναλυτικές μέθοδοι ανίχνευσης μιας σειράς εντομοκτόνων σε δύσκολα βιολογικά δείγματα όπως οι τρίχες, εξετάστηκε κατά πόσο η διαφορά στο μεταβολισμό επιδρά στην ανιχνευόμενη

συγκέντρωση φυτοφαρμάκου όταν η απορρόφηση γίνεται συστηματικά και εξετάστηκε κατά πόσο επιδρά στην απορρόφηση η ποιότητα και το χρώμα της τρίχας όπως και η συγκέντρωση των διαλυμάτων και ο χρόνος έκθεσης στο φυτοφάρμακο diazinon.

Η μελέτη έχει επεκταθεί και σε άλλες οικογένειες φυτοφαρμάκων, με σκοπό να συσχετίσουμε τη συγκέντρωση στις τρίχες με τυχόν συμπτώματα των αγροτών τα οποία πιθανώς να σχετίζονται με τη χρόνια έκθεση σε φυτοφάρμακα.

***Abstract***

The main aim of the present study was the investigation of the possibility to use hair analysis as a tool for the assessment of chronic and low level exposure to pesticides, employing *in vitro* and *in vivo* experiments. The studied substances belong to the families of organophosphates, carbamates and organochlorines. A literature review revealed that no such studies have been conducted in the past.

The disposition of organochlorine pollutants and pesticides in hair was also studied. The organochlorine pesticides under investigation are no longer used and the PCBs are byproducts of industrial activities. Exposure of the organisms to the aforementioned substances occurs either through the diet or from the environment.

The first and crucial step was the development and validation of the analytical methods for the detection and quantification of the analytes of interest in a difficult matrix like hair.

The pesticide diazinon was the model compound for the study of organophosphates incorporation in hair. Sample preparation included methanolic extraction of the pesticide from the hair matrix, at 37 $^{0}$C overnight, followed by liquid-liquid extraction with ethyl acetate, evaporation of the solvent under nitrogen, resuspension of the residue in 50 μl of methanol and analysis by GC-MS or GC-NPD. GC-MS analysis was performed in full scan and SIM mode. Analysis in SIM mode offered much better selectivity and sensitivity. Two ionisation modes were also utilised; electronic ionisation and negative chemical ionisation with methane. Chemical ionisation mode offered much lower detection limits than the electronic ionisation mode.

The disposition of diazinon in hair from the environment was studied using fortified hair samples. Three parameters that would probably affect the detected concentration of diazinon in hair were studied; the concentration of diazinon in the exposure media, the time of exposure and the colour of the hair. Initially hair samples coming from the same person were immersed in aqueous solutions diazinon at different concentrations, for varying time periods. The samples were analysed by EI GC-MS following a decontamination rinse with water, drying, pulverization, methanolic extraction in an ultrasonic bath, liquid-liquid extraction with ethyl acetate, evaporation of the solvent and resuspension in 50 μl of methanol. It was found that the concentration of the pesticide detected in hair was proportional to the concentration of the exposure media and to the time of exposure.

The same experiment was repeated using hair of different shades brown, coming from different people. The hair samples were immersed in aqueous solution of the pesticide at the

same concentration and for the same time period. Our results indicated that in the case of external disposition of the pesticide in hair, the concentration of the pesticide is not related to the melanin content and hence the colour of the hair. On the other hand, other factors like the lipid content of the hair or the diameter of the hair fiber may play a more important role in the amount of pesticide detected.

The next step was the study of incorporation of diazinon in hair *in vivo*. Rats and rabbits were used as our experimental animals. It is obvious by the difference in the literature reported $LD_{50}$ values that rabbits are more susceptible to diazinon toxicity than rats. Only a very small fraction of the administered doses was detected in the hair of the animals. The concentration of the pesticide detected in the hair of the rats was much higher than that detected in the hair of the rabbits even though the rabbits received higher doses than the rats. This may be explained by the different metabolic profile of the two animal species.

Two methods were used for the detection of methomyl in the hair of experimental animals. The screening of the samples was performed by ELISA while the results were confirmed by HPLC. Even though ELISA gave acceptable results with methomyl there was significant background noise. Analysis with GC-MS was not possible due to the instability of the molecule

The exposure of the population to certain organochlorine compounds through the diet was also studied. The compounds studied were two organochlorine pesticides, DDT and lindane, and the following PCB congeners: PCB 28, 52, 99, 101, 118, 138, 149, 153, 156, 170, 180 and 187. A comparative study of the population exposure of three countries, Greece, Romania and Belgium was also conducted. The hair matrix was dissolved by incubation in HCl, and the samples were initially liquid-liquid extracted in a mixture of hexane: dichloromethane (4:1) and subsequently cleaned by SPE. Finally they were analysed by GC-ECD and GC-MS for confirmation.

The Greek samples were found to be the most contaminated ones by organochlorine pesticides while they carried the smallest PCBs burden. Belgian samples were more contaminated by PCBs but carried a smaller pesticide burden while the samples from Romania contained less pesticide than the Greek ones but more than the Belgian ones.

Three sensitive and selective analytical methods were developed and validated during the study of incorporation of diazinon in hair. They were based on GC-MS and GC-NPD detection and they were successful in detecting and quantitating diazinon in hair in the pg/mg level. It was confirmed by the *in vivo* studies in white rats and rabbits that diazinon may be detected in hair once it enters blood circulation, at concentrations proportional to the

administered dose. When the detected pesticide concentrations in hair were compared, it became evident that metabolic species differences influence the quantity of non metabolized pesticide circulating in the blood and hence the concentration detected in hair.

The *in vitro* studies indicated that diazinon is deposited in hair not only in the case of exposure through the blood stream, but also in the case of external exposure. The concentration of the exposure media as well as the time of exposure does play a role in the detected pesticide concentration. On other hand the colour of the hair is not such a crucial parameter as it happens when substances are incorporated in the hair shaft from the sweat and sebum that bathe the shaft during the hair growth.

The incorporation of methomyl in hair was studied using rabbits as experimental animals. It was confirmed that once it enters the blood stream it is detected in hair. Segmental hair analysis that was performed indicated that methomyl binds to specific sites and does not migrate along the hair shaft. This can be used in human exposure studies to obtain an accurate record of exposure, bearing in mind that human head hair grows approximately 1 cm/month..

The main conclusion reached by the study of the organochlorine compounds was that contamination of the samples with the aforementioned substances was universal and that organochlorine concentration detected in the samples was related to the origin of the examined population. The Greek and occupationally exposed samples carried more DDTs, and less PCBs. The HCHs burden was similar for all the samples.

In summary, during the present study sensitive and selective methods for the detection of minute quantities of pesticides in complex matrices were developed and validated, it was confirmed that the metabolic profile of an organism influences the concentration of pesticides detected in hair, and when external contamination of hair was studied, it was deduced that the concentration of pesticide in the exposure media as well as the time of exposure influences the concentration of the detected pesticides in hair. Segmental hair analysis that was performed in the case of methomyl and may be performed in human hair may give an accurate record of past exposure to pesticides.

As a future development, hair disposition of certain characteristic metabolites of pesticides should be studied. Also it would be interesting to examine hair disposition of other commonly used pesticides. This is a potentially valuable additional tool for the assessment of chronic exposure to pesticides.

# ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η συνεχής ανάγκη για περισσότερα και καλύτερα γεωργικά προϊόντα έχει οδηγήσει στην παραγωγή και χρήση πολλών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ιδανικά, η επιθυμητή βιολογική δράση των φυτοφαρμάκων θα έπρεπε να έχει υψηλή εξειδίκευση στους οργανισμούς-στόχους και να αφήνει απρόσβλητους τους υπόλοιπους οργανισμούς. Ωστόσο, τα περισσότερα φυτοφάρμακα δεν είναι απόλυτα επιλεκτικά αυξάνοντας τον κίνδυνο προσβολής του ανθρώπου, γεγονός που οδηγεί την επιστημονική έρευνα στην ανάγκη μελέτης των δυνητικών επιπτώσεων της χρήσης τους στην υγεία του ανθρώπου, των υπόλοιπων οργανισμών και το περιβάλλον (Maroni *et al*, 2000).

Για την προστασία της γεωργικής παραγωγής χρησιμοποιείται πληθώρα φυτοφαρμάκων που ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα. Είναι αποδεκτό στη σύγχρονη έρευνα ότι τα εντομοκτόνα είναι οι πλέον τοξικές ουσίες και έτσι η παρούσα μελέτη εστιάστηκε σε αυτά. Πιο συγκεκριμένα, εξετάστηκαν χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι των θεωρούμενων πιο βλαβερών ομάδων, δηλαδή των οργανοφωσφορικών, των καρβαμιδικών και των οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων.

Τα πρώτα χημικά εντομοκτόνα ήταν τα οργανοχλωριομένα, τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί η μεγάλη χημική τους σταθερότητα και ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής τους στο περιβάλλον ήταν η αιτία να απαγορευτεί η χρήση τους στην Ευρώπη ήδη από τη δεκαετία του 1970. Στη συνέχεια, αντικαταστάθηκαν από τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά, τα οποία όμως αποδείχτηκε ότι είχαν μεγάλη οξεία τοξικότητα.

Ας σημειωθεί ότι, στην κατηγορία των οργανοχλωριομένων ανήκουν και οι χλωριωμένοι πολυκυκλικοί υδρογονάνθρακες, όπως τα χλωριωμένα διφαινύλια, τα όποια απαντούν και ως περιβαλλοντικοί ρυπαντές. Χρησιμοποιούνται επίσης σε μετασχηματιστές και άλλα εξαρτήματα που έρχονται σε επαφή με υψηλές θερμοκρασίες, εκλύονται ως παραπροϊόντα ατελών καύσεων και η συγκέντρωση τους είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε περιοχές με έντονη βιομηχανική δραστηριότητα.

Για την καταγραφή της επιβάρυνσης του ανθρώπου από την χρήση των συγκεκριμένων εντομοκτόνων ουσιών επιλέχτηκε η διερεύνηση της εναπόθεσής τους στην τρίχα.

Η τοξικολογική ανάλυση μη συνηθισμένων βιολογικών δειγμάτων όπως τρίχες, σάλιο, ιδρώτας και σπέρμα, αρχίζει να αποκτά όλο και περισσότερη βαρύτητα και να βρίσκει εφαρμογές στην ιατρική, στην εγκληματολογία και σε περιβαλλοντικές επιστήμες. Τα δείγματα αυτά μπορούν να παρέχουν επιπλέον πληροφορίες και έχουν αρκετά πλεονεκτήματα συγκρινόμενα με τα συνηθισμένα βιολογικά δείγματα, όπως το αίμα και τα ούρα. Η ανάλυση τριχών ειδικότερα έχει το πλεονέκτημα ότι η λήψη του δείγματος δεν είναι επεμβατική, είναι εύκολη χωρίς να προκαλεί πόνο και σε περίπτωση που χρειαστεί πάντα είναι εφικτή η λήψη δεύτερου δείγματος που παρέχει τις ίδιες πληροφορίες με το πρώτο. Τα δείγματα τέλος, μπορούν να φυλαχτούν για πολύ καιρό σε θερμοκρασία δωματίου.

Το κύριο χαρακτηριστικό των τριχών είναι ότι οι ουσίες που απορροφούνται παραμένουν παγιδευμένες στο υπόστρωμα για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Αυτό έγινε φανερό όταν αναλύθηκαν τρίχες από μούμιες που η ηλικία τους υπολογίζεται στα 4000 χρόνια και ανιχνεύτηκαν μεταβολίτες της κοκαΐνης (Baez *et al* 2000).

Το γεγονός ότι η ανίχνευση ουσιών που παγιδεύονται στην τρίχα μπορεί να δώσει πληροφορίες για την έκθεση του οποιουδήποτε οργανισμού σε αυτές, ακόμα και για μεγάλα χρονικά διαστήματα, οδήγησαν στην αντιμετώπιση των τριχών σαν πιθανά αξιόπιστο δείκτη αξιολόγησης της χρόνιας έκθεσης σε επικίνδυνα φυτοφάρμακα.

Το κύριο αντικείμενο του πειραματικού τμήματος της έρευνας στην παρούσα διδακτορική διατριβή αποτέλεσε η ανίχνευση, η ανάλυση και η μελέτη εντομοκτόνων ουσιών και περιβαλλοντικών μολυντών στις τρίχες. Βασικός στόχος ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα και να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της χρήσης των τριχών σαν δείκτης χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης στις προαναφερθείσες ουσίες. Για την προσέγγιση του κεντρικού θέματος, τέθηκαν επιμέρους στόχοι και ερωτήματα, που αποτέλεσαν τα ενδιάμεσα στάδια της έρευνας:

1. Ανάπτυξη κατάλληλης αναλυτικής μεθόδου για την ανίχνευση των υπό εξέταση . ενώσεων στις τρίχες.
2. Εξακρίβωση με τη βοήθεια πειραματόζωων (*in vivo*) αν τα εντομοκτόνα μπορούν να ανιχνευτούν στις τρίχες .
3. Διερεύνηση παραμέτρων όπως η δόση και η διάρκεια της χορήγησης εντομοκτόνων, οι οποίες επιδρούν στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση στις τρίχες.
4. Διερεύνηση της δυνατότητας να πραγματοποιηθεί τμηματική ανάλυση τριχών για τον χρονικό προσδιορισμό της έκθεσης, κατά τη διάρκεια των *in vivo* μελετών στα πειραματόζωα.

5. Σύγκριση της επίδρασης του μεταβολικού προφίλ του κάθε είδους πειραματόζωου στις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις των υπό εξέταση ουσιών στις τρίχες.
6. Μελέτη *in vitro* των παραγόντων που επιδρούν στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση εντομοκτόνων που εναποτίθενται στις τρίχες από το περιβάλλον.
7. Ανάλυση ανθρώπινων τριχών για την ανίχνευση περιβαλλοντικών μολυντών και εντομοκτόνων που έχουν αποσυρθεί και προσλαμβάνονται βασικά μέσω της τροφής.

Τα παραπάνω ερωτήματα διερευνήθηκαν με τη διεξαγωγή τριών πειραμάτων που εκπονήθηκαν σε πειραματόζωα (κουνέλια και αρουραίους Sprague-Dawley) καθώς και κάποιων μελετών που εκπονήθηκαν σε ανθρώπινες τρίχες από κατοίκους βιομηχανικών και αγροτικών περιοχών.

# ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑ. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΕΠΙΚΙΝΔΥΝΟΤΗΤΑΣ

### 1.1 Φυτοφάρμακα και υγεία

Η έκθεση στα φυτοφάρμακα μπορεί να επηρεάσει ένα μεγάλο μέρος του ανθρώπινου πληθυσμού (Salameh *et al*, 2004). Η έκθεση σε φυτοφάρμακα αφορά πρώτιστα τους εργαζόμενους που εμπλέκονται στη βιομηχανική παρασκευή τους και την εφαρμογή τους στη γεωργία ή αλλού. Ταυτόχρονα, ένα μεγάλο μέρος του γενικού πληθυσμού που μπορεί να εκτεθεί σε αυτά μέσω οικιακής χρήσης, εγγύτητας σε αγροτικό περιβάλλον και κατανάλωσης επιμολυσμένων τροφίμων και νερού. Η έκθεση διαφέρει σημαντικά μεταξύ των εργαζομένων της βιομηχανίας και των άλλων χρηστών των φυτοφαρμάκων γιατί οι πρώτοι εκτίθενται σε μία ή περισσότερες ενώσεις για παρατεταμένο χρόνο, ενώ οι εφαρμοστές στη γεωργία συνήθως εκτίθενται σε πολυάριθμες ενώσεις για μικρές χρονικές περιόδους και τα επίπεδα έκθεσης μεταβάλλονται ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες, τη μέθοδο εφαρμογής και τις πρακτικές εργασίας (Maroni *et al*, 2000).

Δεδομένου ότι η οξεία έκθεση σε φυτοφάρμακα που οδηγεί σε δηλητηρίαση αφορά ένα μικρό μόνο ποσοστό του πληθυσμού, το ενδιαφέρον σε επίπεδο δημόσιας υγείας στρέφεται κυρίως γύρω από τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της χρόνιας έκθεσης, οι οποίες περιλαμβάνουν διαταραχές στην αναπαραγωγή, νευροτοξικότητα, καρκίνο, καθώς και πολλαπλές επιδράσεις πάνω στην ευπαθή ομάδα των παιδιών (Kamel & Hoppin, 2004).

Μερικές μελέτες χρόνιας επαγγελματικής έκθεσης σε φυτοφάρμακα κατηγοριοποίησαν ως εκτεθειμένα όλα τα μέλη μιας επαγγελματικής ομάδας, όπως τους αγρότες και τους αγροτοεργάτες. Ωστόσο οι αγρότες που προσλαμβάνουν άλλους για την εφαρμογή των φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειές τους, μπορεί να έχουν περιορισμένη έκθεση στα φυτοφάρμακα. Ακόμη και μεταξύ των ατόμων που εφαρμόζουν τα φυτοφάρμακα, η έκθεση μπορεί να ποικίλλει ευρέως. Παράδειγμα αποτελούν οι αγροτοεργάτες που έχουν ελλιπή ενημέρωση για τις πρακτικές ασφάλειας ή τον προστατευτικό εξοπλισμό και ενδεχομένως υφίστανται μεγαλύτερη έκθεση σε σχέση με καλά εκπαιδευμένους επαγγελματίες εφαρμοστές φυτοφαρμάκων (Kamel & Hoppin, 2004).

Γενικά, παράγοντες όπως η μέθοδος εφαρμογής του φυτοφαρμάκου, η χρήση προσωπικού προστατευτικού εξοπλισμού και η συμπεριφορά απέναντι στον κίνδυνο

μπορούν να επηρεάσουν το βαθμό της έκθεσης του ατόμου. Στις αναπτυσσόμενες χώρες οι εργάτες είναι περισσότερο εκτεθειμένοι λόγω της αυξημένης χρήσης των συστημάτων εφαρμογής φυτοφαρμάκων προκειμένου να αυξηθεί η παραγωγή (Kamel & Hoppin, 2004, Salameh *et al*, 2004, Spiewak, 2001). Επίσης, είναι σημαντική η εκτίμηση της παρελθοντικής και της τρέχουσας έκθεσης του ατόμου γιατί έτσι μπορούν να αιτιολογηθούν βλάβες που σχετίζονται με την υγεία ακόμη και σε άτομα που διατηρούν το ίδιο επάγγελμα, αλλά ο βαθμός έκθεσής τους αλλάζει λόγω εμφάνισης νέων προϊόντων και μεθόδων.

## 1.2 Οξείες και χρόνιες δηλητηριάσεις από καρβαμιδικά και οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Ο κύριος στόχος των καρβαμιδικών και οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι το νευρικό σύστημα και ειδικότερα το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, που ελέγχει τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη στο κεντρικό νευρικό σύστημα, το παρασυμπαθητικό, τις νευρομυϊκές συνάψεις, τις συμπαθητικές συνάψεις, καθώς και τα συμπαθητικά νεύρα των επινεφριδίων και των ιδρωτοποιών αδένων (Ecobichon, 1991). Το ένζυμο φωσφορυλιώνεται σε μια σερίνη του ενεργού κέντρου, όπου προσδένεται το φωσφορικό τμήμα του εντομοκτόνου, και η φωσφορυλίωση αυτή είναι μη αντιστρεπτή (Stryer, 1988).

Τα κλινικά συμπτώματα που εμφανίζονται σε περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης από καρβαμιδικά μοιάζουν πολύ με αυτά που προξενούν τα οργανοφωσφορικά, αν και γενικά έχουν μικρότερη διάρκεια. Ανάλογα με τη βαρύτητα της δηλητηρίασης εμφανίζεται αδυναμία, πονοκέφαλος, βάρος στο στήθος, διαταραχές στην όραση, μύση, σιελόρροια, εφίδρωση, ναυτία, εμετός, διάρροια, κοιλιακές κράμπες, παράλυση και θάνατος (Lotti 2001).

Η αντιμετώπιση της δηλητηρίασης όμως είναι διαφορετική για τις δυο χημικές οικογένειες. Η δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά θεραπεύεται με ταυτόχρονη χορήγηση ατροπίνης και κάποιας οξίμης, όπως πραλιδοξίμη (Ellenhorn *et al*, 1988). Αντίθετα, δεν ενδείκνυται η χορήγηση οξιμών στην δηλητηρίαση από καρβαμιδικά (Sterri et.al, 1979, Taylor 1990).

Έχουν γίνει έρευνες προκειμένου να βρεθεί τρόπος γρήγορος, αξιόπιστος και κοινά αποδεκτός για την ταυτοποίηση της ουσίας που προκαλεί τη δηλητηρίαση. Γνωρίζοντας τους μοριακούς μηχανισμούς της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης είναι δυνατό να εκμεταλλεύονται οι διαφορές τους προκειμένου να εξάγονται ασφαλή συμπεράσματα. Σε μια μελέτη με το παραπάνω αντικείμενο, προτείνονται δυο τρόποι προκειμένου να αποφασιστεί

αν η ουσία που προξένησε μια δηλητηρίαση ανήκει στα καρβαμιδικά ή τα οργανοφωσφορικά. Ο ένας τρόπος είναι η επώαση του ενζύμου στους 37 $^{0}$C και η παρακολούθηση της κινητικής του. Αν το ένζυμο επαναδραστηριοποιηθεί μετά από περίπου 1 h η δηλητηρίαση προέρχεται από καρβαμιδικά, αν όχι, από οργανοφωσφορικά. Αν η επώαση με κάποια οξίμη δώσει βελτίωση στην κινητική του ενζύμου, τότε υπάρχει ισχυρή ένδειξη ότι η δηλητηρίαση προέρχεται από οργανοφωσφορικά (Rotenberg *et al* 1995).

Γενικά, τα συμπτώματα που προέρχονται από την οξεία έκθεση σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν μελετηθεί επαρκώς. Σκοτεινά σημεία όμως παραμένουν στο τι συμβαίνει σε περιπτώσεις χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης στις παραπάνω ενώσεις (Nasreddine, Parent-Massin, 2002). Πολλές μελέτες έχουν γίνει σε ζώα, αλλά και σε ανθρώπους με χρόνια επαγγελματική έκθεση (Das *et al*, 2001, Hatjian *et al* 2000, Ray and Richards 2001). Κατά γενική ομολογία η μέτρηση της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, αν και είναι ένας πολύ χρήσιμος δείκτης σε περιπτώσεις αξιολόγησης οξείας δηλητηρίασης, δεν είναι αρκετά ευαίσθητος. Χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα οργανοφωσφορικών είναι αφορμή για εμφάνιση μιας σειράς νευρολογικών (Jamal, 1997), ψυχολογικών και άλλων συμπτωμάτων, χωρίς απαραίτητα την προειδοποίηση μιας οξείας δηλητηρίασης (Stephens *et al* 1995, Costa, 2006). Είναι δυνατό αρκετές εβδομάδες μετά από έκθεση σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα να εμφανιστεί καθυστερημένη πολυνευροπάθεια (delayed onset polyneuropathy) (Ray, 1998).

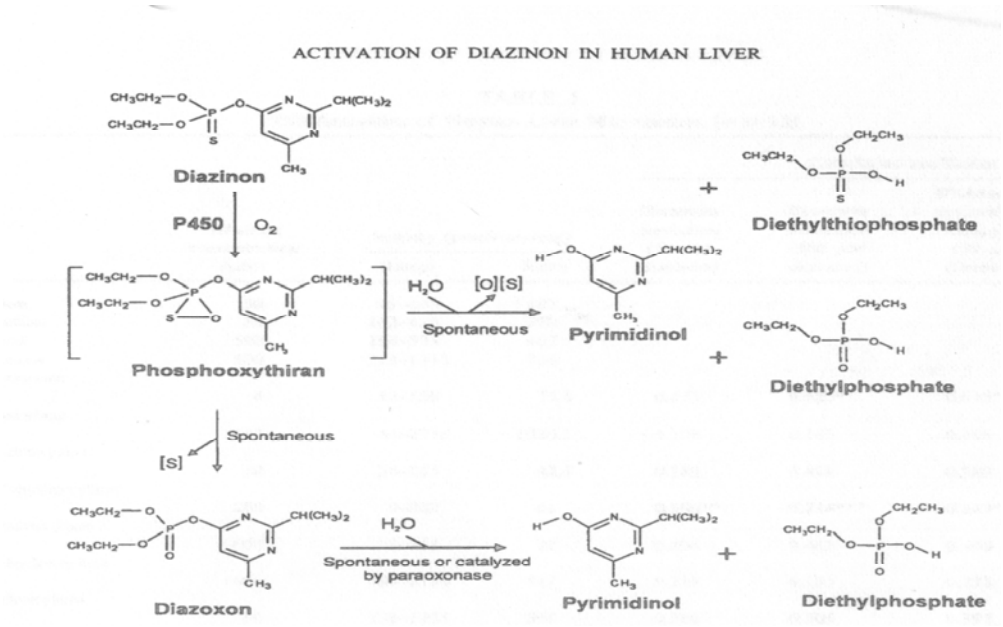
### 1.3 Μεταβολισμός και μοριακός μηχανισμός τοξικότητας και αποτοξίνωσης του οργανισμού

Σαν παράδειγμα μοριακού μηχανισμού τοξικότητας και αποτοξίνωσης του οργανισμού αναφέρεται το diazinon. Το diazinon μεταβολίζεται και αποβάλλεται αρκετά γρήγορα από τον οργανισμό των ανθρώπων και των ζώων. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της ουσίας στον οργανισμό έχει εκτιμηθεί στις 12 h. Περίπου το 70% της ουσίας μεταβολίζεται και αποβάλλεται μέσω των κοπράνων και των ούρων.

Οι θειοφωσφορικοί εστέρες όπως το diazinon, δεν είναι πολύ ισχυροί αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης. Με τη μεσολάβηση ενζύμων, όπως το κυτόχρωμα P450, μετατρέπονται στα πολύ πιο τοξικά οξόνια. Το diazinon για παράδειγμα μετατρέπεται σε diazoxon και τελικά σε μη τοξικά προϊόντα όπως πυριδινόλη, διεθυλφωσφορικό οξύ και θειοδιεθυλφωσφορικό οξύ, μέσω του ακόλουθου μεταβολικού μονοπατιού.

Η αποτοξίνωση γίνεται με την υδρόλυση του οξονίου. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από α-εστεράσες, με πιο σημαντική την παραοξονάση του πλάσματος και τις β-εστεράσες. Η

έλλειψη τέτοιων ενζύμων στα έντομα, τα καθιστά πιο ευάλωτα στα τοξικά προϊόντα που παράγονται από το CYP 450.




**Εικόνα 1.1:** Μεταβολισμός του diazinon στο ανθρώπινο ήπαρ

Το CYP450 είναι μια μεγάλη οικογένεια ισοενζύμων με διαφορετικές εξειδικεύσεις και ευάλωτα σε διαφορετικούς αναστολείς. Είναι μονοοξυγενάσες που στο μόριο τους περιέχουν αίμη. Εντοπίζονται πιο πολύ στο ήπαρ, όμως διάφοροι ιστοί περιέχουν διαφορετικές συγκεντρώσεις των διαφόρων ισοενζύμων. Διάφορες μελέτες που έχουν γίνει σε ανθρώπους και ζώα, εμπλέκουν τα CYP2C11, CYP2B6, CYP3A2/4, CYP2B1/2, CYP3C19, CYP2C19 και CYP2D6 στη μετατροπή του diazinon σε diazoxon, η οποία λαμβάνει χώρα στο ήπαρ. (Sams et 2000, Kappers *et al* 2001, Burrati *et al* 2003). Τα κυτοχρώματα P 450 είναι ένζυμα των οποίων η συγκέντρωση διαφέρει από είδος σε είδος, και εμφανίζουν πολλούς πολυμορφισμούς. Αυτό επηρεάζει όχι μόνο την τοξικότητα των ουσιών, αλλά και τη συγκέντρωση των μεταβολιτών που κυκλοφορούν στο αίμα και ενδεχομένως αποθηκεύονται και σε άλλους ιστούς (Jokanovic 2001).

Μια ακόμη σπουδαία οικογένεια ενζύμων, που προστατεύουν τον οργανισμό από διάφορες τοξικές εξωγενείς και ενδογενείς ουσίες, είναι οι παραοξονάσες. Το πιο σημαντικό μέλος στην προστασία από τα οργανοφωσφορικά είναι η παραοξονάση 1 (PON 1). Η παραοξανάση 1 εντοπίζεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα του αίματος και στο ήπαρ. Ο κύριος ρόλος της είναι να υδρολύει τοξικά οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και αρωματικούς εστέρες (La Du *et al*, 1999, Costa *et al*, 2005). Μελέτες σε ζώα και ανθρώπους

έχουν δείξει ότι το ένζυμο αυτό παρουσιάζει σημαντικούς πολυμορφισμούς (Costa *et al*, 1999), οι οποίοι επηρεάζουν την αποτελεσματικότητά του και κατά συνέπεια το βαθμό που μπορεί να αποδειχτεί ευάλωτος ένας οργανισμός σε συγκεκριμένες ουσίες (Mackness *et al*, 2003). Ένας άλλος τρόπος αποτοξίνωσης του οργανισμού από τα οργανοφωσφορικά είναι η σύζευξη με γλουταθειόνη (Motoyama and Dauterman 1980 και Wilson and Clark 1996).

Γενικά η διαφορά στο μεταβολικό προφίλ των οργανισμών (interspecies and intraspecies variation) είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει, όχι μόνο τη συμπεριφορά των οργανισμών απέναντι σε διάφορες τοξικές ουσίες, αλλά και τη συγκέντρωση ουσιών και μεταβολιτών τους στους διάφορους ιστούς.

## 1.4 Αξιολόγηση και διαχείριση επικινδυνότητας της έκθεσης σε εντομοκτόνα

Σε μια προσπάθεια διαχείρισης του κινδύνου της έκθεσης του ανθρώπου και του περιβάλλοντος σε χημικές ουσίες, οι χρησιμοποιούμενες ουσίες και πιο ειδικά τα φυτοφάρμακα, έχουν χωριστεί σε κατηγορίες ανάλογα με την οξεία τοξικότητά τους. Οι κατηγορίες είναι τέσσερις (IPCS 2002) και κάθε μια συνοδεύεται από τις κατάλληλες ετικέτες και οδηγίες που αποβλέπουν στην ελαχιστοποίηση των κινδύνων από τη χρήση τους. Πιο αναλυτικά οι τέσσερις κατηγορίες στις οποίες χωρίζονται τα φυτοφάρμακα είναι:

α) **Υπερβολικά επικίνδυνα (ομάδα Ia)** ενεργά συστατικά (technical grade) φυτοφαρμάκων με $LD_{50}$ από 5 mg/kg σωματικού βάρους έως 40 mg/kg σωματικού βάρους.

β) **Πολύ επικίνδυνα (ομάδα Ib)** ενεργά συστατικά (technical grade) φυτοφαρμάκων με $LD_{50}$ από 5-50 έως 400 mg/kg σωματικού βάρους

γ) **Μέτρια επικίνδυνα** ενεργά συστατικά (technical grade) φυτοφαρμάκων με $LD_{50}$ από 50-500 mg/kg σωματικού βάρους έως 4000 mg/kg σωματικού βάρους και

δ) **Λίγο επικίνδυνα (ομάδα III)** ενεργά συστατικά (technical grade) φυτοφαρμάκων με $LD_{50}$ πάνω από 500 mg/kg σωματικού βάρους έως πάνω από 4000 mg/kg σωματικού βάρους.

Για την αξιολόγηση κάθε ενεργού συστατικού έχει ληφθεί υπόψη η φυσική του κατάσταση και η οδός χορήγησης. Οι τιμές αφορούν τεστ οξείας τοξικότητας σε αρουραίους. Όταν υπάρχει ζώο πιο ευαίσθητο από τον αρουραίο, τότε λαμβάνεται υπόψη η χαμηλότερη τιμή της $LD_{50}$. Επίσης, υπάρχει μια λίστα με φυτοφάρμακα τα οποία έχουν απαγορευτεί ή η χρήση τους είναι εξαιρετικά περιορισμένη εξαιτίας των προβλημάτων που η πείρα έχει δείξει ότι προκαλούν.

Η σχετικά μεγάλη τοξικότητα των επιλεγμένων στην παρούσα μελέτη ουσιών, αλλά και η χημική σταθερότητα κάποιων από αυτών έχει οδηγήσει τους υπεύθυνους τοξικολόγους

να τις κατατάξουν σε κατηγορίες περιορισμένης χρήσης. Η χρήση του DDT έχει απαγορευτεί εντελώς στις ανεπτυγμένες χώρες (IPCS2002). Συνεχίζεται όμως σε χώρες όπου το πρόβλημα της ελονοσίας είναι έντονο (The Stockholm Convention, 2004). Μεγάλες ποσότητες οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται για την προστασία της γεωργικής παραγωγής παγκοσμίως (Echobicon 2001) και στην Ελλάδα. Όσον αφορά τα οργανοχλωριομένα, εξαιτίας της μεγάλης χημικής τους σταθερότητας έχουν αποσυρθεί ή αποσύρονται σταδιακά μέχρι το 2010 (European Council directive 96/59/EC, 1996). Υπολείμματα όμως εξακολουθούν να υπάρχουν στο περιβάλλον, μολύνοντας τα τρόφιμα που καταναλώνουμε. Μέσω της δίαιτας συγκεντρώνονται στους ανθρώπινους ιστούς, όπου και ανιχνεύονται.

Για την βελτιστοποίηση της στρατηγικής διαχείρισης των κινδύνων από τα φυτοφάρμακα είναι απαραίτητη η καταγραφή και αξιολόγηση της έκθεσης του ανθρώπου και του περιβάλλοντος στις ουσίες αυτές. Σημαντικό εργαλείο για το βήμα αυτό είναι η ανάπτυξη των κατάλληλων αναλυτικών τεχνικών για την ποσοτική αξιολόγηση της επιβάρυνσης οργανισμών ή τροφίμων.

## 1.5 Μέθοδοι καταγραφής και αξιολόγησης της έκθεσης του ανθρώπου και του περιβάλλοντος

Για την ανάπτυξη στρατηγικής διαχείρισης του ρίσκου είναι ανάγκη η ακριβής καταγραφή των δεδομένων του βαθμού και των επιπτώσεων της έκθεσης του ανθρώπου και του περιβάλλοντος, καθώς και των προβλέψεων για την μελλοντική έκθεση στις υπό μελέτη ουσίες. Ο βαθμός έκθεσης σε συνάρτηση με την επικινδυνότητα της κάθε ουσίας, στη συνέχεια, μπορεί να υπαγορεύσει τη στρατηγική που πρέπει να ακολουθηθεί για την ελαχιστοποίηση των κινδύνων από τη χρήση της (Van Leeuwven C.J. 2000).

### *1.5.1 Αξιολόγηση κινδύνου του περιβάλλοντος (Environmental Risk Assessment)*

Η μεγάλη διάδοση των εντομοκτόνων σε συνδυασμό με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και τη συμπεριφορά τους στο περιβάλλον, έχει ωθήσει τους επιστήμονες και τους υπεύθυνους για τη δημόσια υγεία, στην αναζήτηση μεθόδων αξιολόγησης της έκθεσης του περιβάλλοντος και του ανθρώπου. Όσον αφορά στο περιβάλλον είναι πολύ δύσκολο να γίνει συνολική εκτίμηση της έκθεσης του και το μόνο που είναι εφικτό, είναι να μετρηθεί η επιβάρυνση ξεχωριστών περιβαλλοντικών διαμερισμάτων (νερό, έδαφος, αέρας) ή

οργανισμών. Η πιο κοντινή στη συνολική πραγματικότητα εικόνα είναι τα πειράματα στους λεγόμενους μεσόκοσμους (mesocosms).

Πολλοί επιστήμονες μετρούν την επιβάρυνση με διάφορα εντομοκτόνα των επιφανειακών και υπόγειων νερών. Άλλοι καταγράφουν την επιβάρυνση φρούτων και λαχανικών που αποτελούν κρίκους της τροφικής αλυσίδας. Άλλοι κάνουν μελέτες προκειμένου να διαπιστώσουν την τοξικότητα σε υδρόβιους οργανισμούς όπως τα Daphnia Magna. Οι περισσότερες μέθοδοι ανάλυσης που αναφέρονται στη βιβλιογραφία και αφορούν σε περιβαλλοντικά δείγματα ανιχνεύουν μια σειρά εντομοκτόνων, από 10 έως και 35 τα οποία ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες.

**Πίνακας 1.1. Ανίχνευση εντομοκτόνων σε περιβαλλοντικά δείγματα.**

| **Υπόστρωμα** | **Εντομοκτόνα** | **Εκχύλιση** | **Ανάλυση** | **Αναφορά** |
|---|---|---|---|---|
| Φράουλες και κεράσια | Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (diazinon methyl parathion, fenthion) | Headspace SPME | GC-MS | Lambropoulou *et al* 2003 |
| Νερό | 16 εντομοκτόνα (diazinon, fenthion) | SPE | On line LC-MS-MS | Hernandez *et al* 2001 |
| Νερό | 22 παρασιτοκτόνα (lindane) | SPE | GC-MS | Quintana *et al* 2001 |
| Νερό | 8 οργανοφωσφορικά | SPME | GC-MS | Valor *et al* 1997 |
| Νερό | 8 οργανοφωσφορικά | SPE $C_{18}$ | GC-NPD GC-FID | Ballesteros *et al* 2004 |
| Νερό | 8 οργανοφωσφορικά | SPME | GC-FTD GC-MS | Lambropoulou *et al* 2001 |
| Νερό | 44 εντομοκτόνα διαφόρων κλάσεων | SPME | GC-MS | Goncalves *et al* 2004 |
| Νερό | 8 οργανοφωσφορικά | SPE | GC-MS | Molina *et al* 1996 |
| Νερό | Καρβαμιδικά, τριαζίνες και φαινυλουρίες | SPE | LC-MS | Noguiera *et al* 2004 |
| Νερό | Καρβαμιδικά | SPME | HPLC-UV | Gou *et al* 2000 |
| Κρασί | 17 διάφορα | SPE | GC-MS | Soleas *et al* |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | παρασιτοκρόνα | | | 2000 |
| Φρούτα και λαχανικά | 21 διαφορετικά παρασιτοκτόνα | Solid-liquid extraction | GC-MS-MS | Schachterle *et al* 1996 |
| Λαχανικά | Οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά | - | Φωτοθερμικός βιοανιχνευτής | Pogacnik *et al* 2003 |
| Φρούτα και λαχανικά | Πολικά οργανοφωσφορικά | Solid-liquid extraction | HPLC-MS | Mol *et al* 2003 |
| Λίπη και έλαια | 7 οργανοφωσφορικά | SPE | GC-MS | Gillepsie *et al* 1991 |
| Αγγούρι | 81 διαφορετικά παρασιτοκτόνα | Solid liquid extraction | GC-MS | Arrebola *et al* 2003 |
| Χώμα και μπαχαρικά | 5 οργανοφωσφορικά | | | Dagan 2000 |
| Νερό | Καρβαμιδικά | SPE | HPLC-UV | Slobodnik *et al* 1996 |

### *1.5.2 Αξιολόγηση κινδύνου για τον άνθρωπο (Human Risk Assessment)*

Όσον αφορά την αξιολόγηση της έκθεσης του ανθρώπου, προτείνονται διάφοροι τρόποι. Καταρχήν είναι βασικό να ορίζεται το είδος της έκθεσης. Αυτή μπορεί να είναι επαγγελματική και αφορά σε ανθρώπους που απασχολούνται στη χημική βιομηχανία ή σε αυτούς που ασχολούνται με την εφαρμογή των εντομοκτόνων. Μπορεί επίσης να υπάρχει έκθεση μέσω δίαιτας που αποτελείται από τρόφιμα επιβαρυμένα με εντομοκτόνα ή από παραμονή σε επιβαρυμένο περιβάλλον. Ο τύπος της έκθεσης παρέχει δεδομένα για τη διάρκεια, τη βαρύτητα των τυχόν αναπτυσσόμενων συμπτωμάτων και γενικότερα της σοβαρότητας μιας ενδεχόμενης βλάβης. Η αξιολόγηση είναι ιδιαίτερα πολύπλοκη στην περίπτωση χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης, όπου δεν υπάρχουν ξεκάθαρα συμπτώματα δηλητηρίασης.

Το κύριο μέλημα των επιστημόνων είναι η καθιέρωση ευαίσθητων εξειδικευμένων και αξιόπιστων βιοδεικτών έκθεσης. Ο πιο συνηθισμένος δείκτης έκθεσης στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα είναι η μέτρηση της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, είναι όμως γενικά παραδεκτό ότι δεν πρόκειται για ένα πραγματικά ευαίσθητο δείκτη, ειδικά σε περιπτώσεις χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης.

Μελέτη που έχει γίνει από μια ομάδα Ούγγρων επιστημόνων (Desi *et al*, 1998) δείχνει ότι οι επαγγελματικά εκτιθέμενοι στα φυτοφάρμακα παρουσιάζουν ανωμαλίες στον αριθμό των χρωμοσωμάτων που προέρχονται από λεμφοκύτταρα του περιφερειακού αίματος.

Κάποιοι επιστήμονες προκειμένου να αξιολογήσουν την έκθεση μετρούν την ποσότητα του αμετάβλητου χημικού που κυκλοφορεί στο αίμα, ενώ κάποιοι άλλοι αναπτύσσουν μεθόδους για τη μέτρηση μεταβολιτών στα ούρα. Σε περιπτώσεις όπως των οργανοχλωριομένων έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ανίχνευση τους στο λιπώδη ιστό, στο μητρικό γάλα, στο αίμα και στις τρίχες. Παραμένει όμως σε εκκρεμότητα το κατά πόσο τα ανιχνευόμενα επίπεδα ουσιών σε αυτά τα υποστρώματα αντικατοπτρίζουν τη συνολική έκθεση του οργανισμού.

**Πίνακας 1.2. Ανίχνευση εντομοκτόνων και μεταβολιτών σε βιολογικά δείγματα**

| **Εντομοκτόνο** | **Μεταβολίτες** | **Υπόστρωμα** | **Εκχύλιση** | **Ανάλυση** | **Αναφορά** |
|---|---|---|---|---|---|
| Διάφορα OPs | DEP, DETP, IMPY, DMP, DMTP | Ούρα | | | Duggan *et al*, 2002 |
| Διάφορα OPs | 6 dialkyl phosphates | Ούρα | | GC-MS-MS | Bravo *et al*, 2002 |
| 29 παρασιτοκτόνα | - | Ορρός | SPE | GC-HRMS | Barr *et al*, 2002 |
| PCBs και οργανοχλωριομένα | - | Ορρός | LLE, και SPE | GC-HRMS | Barr *et al*, 2003 |
| | DMP, DEP, DMTP, DETP, DMDTP, DEDTP, | Ούρα | SPE | GC-MS | Kupfermann *et al*, 2004 |
| Διάφορα παρασιτοκτόνα | - | Αίμα | SPE | GC-MS | Tan *et al* 2003 |
| Diazinon | DETP, DEP | Αίμα και ούρα | Αζεοτροπική απόσταξη | GC-FPD | Garfitt *et al*, 2002 |
| Azinphos methyl και | DMP, DMTP, DMDTP | Ούρα και επιφάνεια | Αζεοτροπική απόσταξη και | GC-FPD | Lu *et al*, 2000 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| phosmet | | χεριών | εκχύλιση με ethyl acetate | | |
| Οργανοχλωριο μένα και PCBs | _ | Ορρός | SPE | GC-MS | Dmitrovic *et al*, 2002 |

Παραπάνω παρουσιάζονται ενδεικτικά κάποιοι τρόποι προσέγγισης του προβλήματος αξιολόγησης της έκθεσης και κάποιες από τις πολλές αναλυτικές τεχνικές που αναπτύσσονται σαν εργαλείο για την επίλυση του.

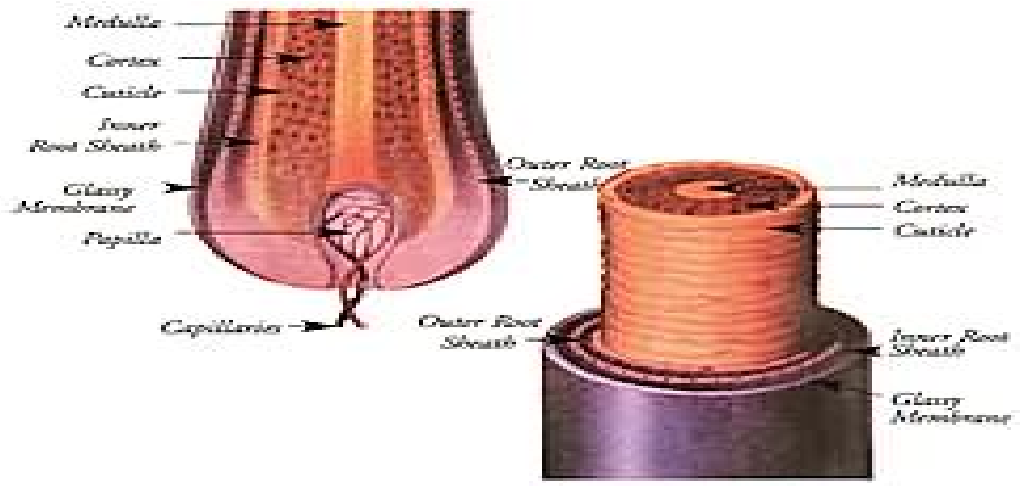
Όπως έχει ήδη αναφερθεί η παρούσα μελέτη καλείται να διερευνήσει την πιθανότητα της καταγραφής της χρόνιας έκθεσης του ανθρώπου χρησιμοποιώντας την τρίχα σαν εναλλακτικό υπόστρωμα ανίχνευσης των επιλεγμένων εντομοκτόνων

# 2 ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΤΗΣ ΑΝΘΡΩΠΙΝΗΣ ΤΡΙΧΑΣ

## 2.1 Ανατομία και φυσιολογία της ανθρώπινης τρίχας

Σε ένα μη ειδικευμένο παρατηρητή η τρίχα μπορεί να φανεί σαν μια ομοιογενής δομή, η οποία διαφέρει ανάμεσα στους ανθρώπους μόνο στην ποσότητα και στο χρώμα. Στην πραγματικότητα όμως η τρίχα αποτελεί ένα πολύπλοκο τμήμα της ανθρώπινης ανατομίας, του οποίου η φυσιολογία και λειτουργία είναι μόνο μερικώς κατανοητά. Είναι απαραίτητο όμως να γνωρίζουμε στοιχειωδώς την ανατομία και φυσιολογία της ανθρώπινης τρίχας, προκειμένου να κατανοήσουμε και να αξιολογήσουμε σωστά τους παράγοντες που επηρεάζουν τα αποτελέσματα της ανάλυσης τριχών.

Η τρίχα αποτελείται από κυλινδρικές δομές ή στελέχη (Εικόνα 2.1). Τα στελέχη δημιουργούνται από συμπιεσμένα κύτταρα που αναπτύσσονται από μικρά όργανα που μοιάζουν με σάκους και αποκαλούνται θυλάκια (Εικόνα 2.2). Στον άνθρωπο η διάμετρος του κάθε στελέχους κυμαίνεται από 15-120 μm, ανάλογα με τον τύπο της τρίχας και την περιοχή του σώματος που εντοπίζεται το κάθε θυλάκιο. Η τρίχα περιέχει μια οικογένεια πρωτεϊνών πλούσια σε θείο, τις κερατίνες. Μέσα στο στέλεχος η κερατίνη δημιουργεί μακριά ινίδια τα οποία δένονται μεταξύ τους με δισουλφιδικούς δεσμούς, καθώς και με δεσμούς άλλων τύπων που αναπτύσσονται ανάμεσα στις κερατίνες και σε άλλες πρωτεΐνες, δημιουργώντας μια πολύ σταθερή και ανθεκτική δομή.




**Εικόνα 2.1:** Δομή του στελέχους της τρίχας

Κάθε στέλεχος αποτελείται από τρεις διαφορετικούς τύπους κυττάρων. Ένα εξωτερικό φλοιό (cuticle) που περικλείει ένα κεντρικό cortex το οποίο με τη σειρά του περικλείει μια κεντρική medulla.

Ο φλοιός της ανθρώπινης τρίχας αποτελείται από μακριά κύτταρα τα οποία βρίσκονται το ένα πάνω στο άλλο. Κάθε τέτοιο κύτταρο έχει διαστάσεις 0.5-1.0μm περίπου στο πάχος και 45μm περίπου στο μήκος. Ο ρόλος του είναι να κρατά το στέλεχος στερεωμένο στο θυλάκιο και να προστατεύει τα εσωτερικά ινίδια. Ο φλοιός όμως μπορεί να καταστραφεί από χημικά, το φως, τη θερμότητα, αλλά και από μηχανικά αίτια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την απώλεια της συνέχειας της προστατευτικής μεμβράνης και την καταστροφή του στελέχους στο πιο απομακρυσμένο άκρο της τρίχας.

Το cortex απαρτίζει τον κύριο όγκο του στελέχους και αποτελείται από μακριά κερατινοποιημένα κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν ίνες μήκους περίπου 100μm. Οι ίνες αυτές κρατούνται μαζί με ένα συγκολλητικό στρώμα που είναι γνωστό σαν σύμπλεγμα κυτταρικής μεμβράνης (Cell Membrane Complex). Ανάμεσα στα κύτταρα του cortex υπάρχουν μικρά διαστήματα αέρος. Στο ζωντανό μέρος της ρίζας της τρίχας αυτά τα διαστήματα είναι γεμάτα με υγρό, όσο όμως αναπτύσσεται η τρίχα και προχωρεί η διαδικασία της κερατινοποίησης, στεγνώνουν.

Χρωμοφόρα σωματίδια είναι επίσης διάσπαρτα στο cortex. Ο τύπος των χρωστικών και η διάταξη τους δίνει το χρώμα στην τρίχα. Η μελανίνη, η κύρια χρωστική των μαλλιών των ματιών και του δέρματος συντίθεται σε ειδικά οργανίδια, τα μελανοσώματα, τα οποία εντοπίζονται στο θυλάκιο της τρίχας σε σωμάτια γνωστά σαν μελανοκύτταρα. Η μελανίνη συντίθεται από το αμινοξύ τυροσίνη με τη δράση του ενζύμου τυροσινάση. Το χρώμα των ανθρώπινων τριχών από άσπρο στο μαύρο, παράγεται από διαφορετικές ποσότητες, κατανομή και τύπο χρωστικών.

Τα κύτταρα της medulla αυξάνουν σε αριθμό όσο αυξάνει η διάμετρος της τρίχας. Στην ανθρώπινη τρίχα τα κύτταρα αυτά αποτελούν μόνο ένα μικρό ποσοστό της συνολικής μάζας της τρίχας, και σε περιπτώσεις ιδιαίτερα λεπτών τριχών μπορεί και να απουσιάζουν εντελώς.

**Χημική σύσταση των τριχών**

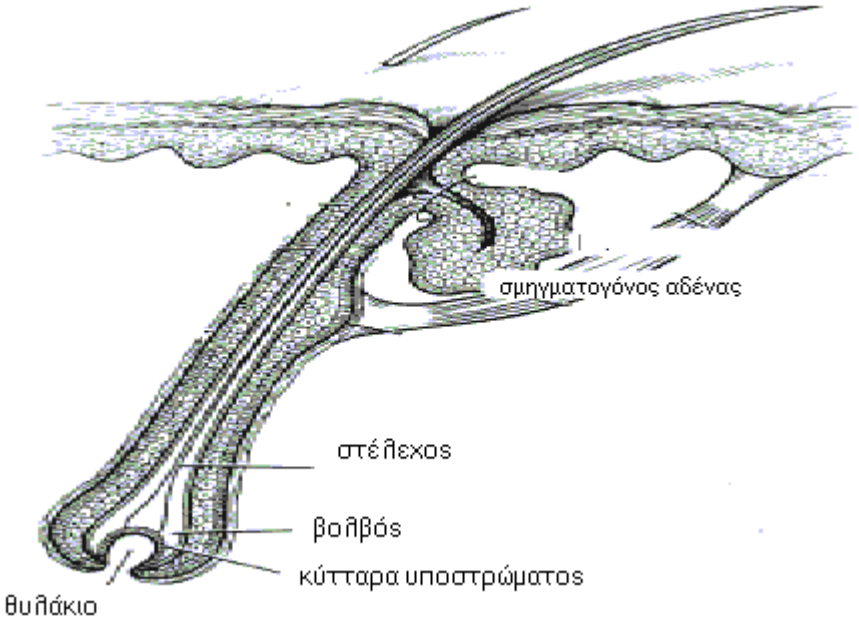
Ουσιαστικά η τρίχα είναι ένα διασταυρούμενο, μερικώς κρυσταλλικό πολυμερές που περιέχει μεγάλο αριθμό λειτουργικών χημικών ομάδων (όξινοι, βασικοί και πεπτιδικοί δεσμοί) οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να δεσμεύουν μικρά μόρια. Η ανθρώπινη τρίχα αποτελείται περίπου από 65-95% πρωτεΐνες, λαμβάνοντας υπ’ όψιν το ποσοστό υγρασίας, 15-

35% νερό και 1-9% λιπίδια. Τα λιπίδια των τριχών προέρχονται από το σμήγμα και τις εκκρίσεις των αποκρινών αδένων και αποτελούνται από ελεύθερα λιπαρά οξέα, μόνο, δι- και τριγλυκερίδια, κηρούς υδατάνθρακες και αλκοόλες. Η ανθρώπινη τρίχα περιέχει αμινοξέα με πλευρικές αλυσίδες υδατανθράκων, θρεονίνη, ασπαρτικό και γλουταμικό οξύ, λυσίνη, κυστίνη, και τυροσίνη.

**Το θυλάκιο της τρίχας**

Τα θυλάκια των τριχών εντοπίζονται στο επιθήλιο της επιδερμίδας, σε βάθος 3-4 mm κάτω από την επιφάνεια του δέρματος. Τα θυλάκια βρίσκονται σε στενή επαφή με δυο τύπους αδένων, τον σμηγματογόνο και τον αποκρινή. Στις περιοχές της μασχάλης και του εφηβαίου τα θυλάκια βρίσκονται σε επαφή και με άλλο ένα είδος ιδρωτοποιού αδένα, τον αποκρινή αδένα. Ο αποκρινής και ο σμηγματογόνος αδένας εκκρίνουν μέσα στο θυλάκιο. Αντίθετα ο εξωκρινής βρίσκεται κοντά στο θυλάκιο αλλά δεν εκκρίνει σε αυτό.

Το θυλάκιο μπορεί να διαχωριστεί λειτουργικά σε τρεις ζώνες, κατά μήκος του άξονα του στελέχους της τρίχας. Η πρώτη ζώνη, μέσα και γύρω από το βολβό είναι το σημείο της βιολογικής σύνθεσης των κυττάρων των τριχών. Η επόμενη ζώνη αμέσως πάνω από το βολβό είναι αυτή της κερατινοποίησης, στην οποία η τρίχα κερατινοποιείται και σκληραίνει. Η τελική ζώνη είναι αυτή της μόνιμης τρίχας. Εδώ το στέλεχος αποτελείται από σκληρά, άνυδρα κύτταρα, τα οποία σχηματίζουν ινίδια που συγκρατούνται μεταξύ τους από εξωκυττάριο συνδετικό υλικό.




**Εικόνα:2.2:** Το θυλάκιο της τρίχας

Η ανάπτυξη της τρίχας ξεκινά στη βάση του θυλακίου. Καθώς τα κύτταρα διαιρούνται και μεγαλώνουν σε όγκο και μήκος ανεβαίνουν πάνω στην κερατογενή ζώνη. Εδώ τα κύτταρα συνθέτουν μελανίνη και αρχίζουν να κερατινοποιούνται. Σχηματίζονται ινίδια τα οποία σταθεροποιούνται με δισουλφιδικούς δεσμούς ανάμεσα σε αμινοξέα όπως η κυστίνη.

Τα θυλάκια περιστοιχίζονται από δύο πυκνά δίκτυα τριχοειδών αγγείων, το σχήμα των οποίων είναι διαφορετικό στα δραστήρια και τα αδρανή θυλάκια. Το κατώτατο τρίτο ενός δραστήριου θυλακίου, από τη βάση μέχρι λίγο πάνω από το βολβό, περικλείεται από ένα πλούσιο πλέγμα αγγείων. Υπάρχει ένα επίσης πλούσιο πλέγμα αγγείων στο επίπεδο του σμηγματογόνου αδένα, το οποίο επεκτείνεται στην επιφάνεια του δέρματος. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα από κοινού ο βολβός και ο σμηγματογόνος αδένας να έχουν πλούσια παροχή αίματος. Κατά την τελογεννή φάση ο βολβός της τρίχας δεν έχει την ίδια παροχή αίματος (Wolfarm 2003).

## 2.2 Κύκλος και ρυθμός ανάπτυξης της τρίχας

Η τρίχα δεν επιμηκύνεται διαρκώς και με σταθερό ρυθμό, αλλά ανά φάσεις, κατά τις περιόδους ανάπτυξης που εναλλάσσονται σε κυκλική ροή με τις περιόδους ανάπαυσης. Η φάση του κύκλου της κάθε τρίχας είναι ανεξάρτητη από εκείνη ενός γειτονικού θυλάκου και είναι γνωστή ως μωσαϊκή ανάπτυξη. Υπάρχουν τρεις φάσεις:

Αναγενής φάση – ανάπτυξη. Πολλαπλασιάζονται τα μητρικά κύτταρα του βολβού. Διαρκεί περισσότερο από τα άλλα στάδια. Κυμαίνεται από δύο έως έξι έτη.

Καταγενής – αναστολή ανάπτυξης. Ο πολλαπλασιασμός των μητρικών κυττάρων σταματά και ο βολβός συρρικνώνεται και ανέρχεται προς την επιφάνεια. Διαρκεί από δύο έως τρεις εβδομάδες.

Τελογενής – περίοδος ηρεμίας. Ο κερατινοποιημένος βολβός του θυλάκου βρίσκεται πλέον ψηλά, κοντά στην επιφάνεια της επιδερμίδας και σε αυτό το στάδιο ένας νέος βολβός εμφανίζεται πίσω από τον προηγούμενο και ενώνεται με την παλιά θηλή στην οποία μεγαλώνει μια νέα τρίχα, η οποία κατά την ανάπτυξη της σπρώχνει την παλιά μέχρι να πέσει.

Από το σύνολό τους, υπολογίζεται ότι ένα ποσοστό 80-85% βρίσκεται στην πρώτη φάση, 1-2% στη δεύτερη και 15-20% στην τρίτη. Εννοείται ότι σε παθολογικές καταστάσεις τα ποσοστά αλλάζουν, με το στάδιο ανάπτυξης να υποχωρεί και τα άλλα δύο να αυξάνονται αντίστοιχα. Ο φυσιολογικός ρυθμός τριχόπτωσης είναι γύρω στις 100 ανά εικοσιτετράωρο, ενώ μεγαλύτερα νούμερα θεωρούνται παθολογικά. Σε αρκετά άτομα η πτώση των τριχών μπορεί να παρουσιάζει μια εποχιακή διακύμανση.

Είναι συνήθως αποδεκτό ότι η τρίχα μεγαλώνει με ρυθμό περίπου 1cm/μήνα. Αυτό όμως αποτελεί μια υπεραπλούστευση. Είναι δύσκολο να έχουμε ακριβείς τιμές για το ρυθμό ανάπτυξης των τριχών στους ανθρώπους. Δεν αναπτύσσονται όλες οι τρίχες με τον ίδιο ρυθμό και το ποσοστό των θυλακίων στην αναγενή φάση εξαρτάται από το σημείο του σώματος που βρίσκεται το θυλάκιο και την ηλικία. Για τις τρίχες της κεφαλής μόνο, υπάρχουν αναφορές για ρυθμό ανάπτυξης που ποικίλει από 0.6-3.36 cm/μήνα (Hops, 1977, Giovanoli-Jakubezak and Berg, 1974). Ο τύπος της τρίχας και το σημείο του σώματος που αναπτύσσεται το θυλάκιο είναι οι πιο σπουδαίοι παράγοντες που καθορίζουν το ρυθμό ανάπτυξης. Οι τρίχες της κεφαλής αναπτύσσονται γρηγορότερα από τις τρίχες στη μασχάλη ή στην ηβική χώρα, που με τη σειρά τους αναπτύσσονται γρηγορότερα από τις τρίχες της γενειάδας. Επιπλέον ο ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται να εξαρτάται από τη φυλή, το φύλο και την ηλικία. Οι τρίχες της κεφαλής στις γυναίκες αναπτύσσονται γρηγορότερα από τις αντίστοιχες στους άντρες. Οι τρίχες της καυκάσιας φυλής αναπτύσσονται γρηγορότερα από τις αντίστοιχες των Ασιατών και γενικά ο ρυθμός ανάπτυξης φαίνεται να μειώνεται με την ηλικία. Σαν σημείο δειγματοληψίας έχει επικρατήσει το πίσω μέρος της κεφαλής επειδή εκεί υπάρχουν περισσότερα θυλάκια στην αναγενή φάση (περίπου 85%) και οι τρίχες αναπτύσσονται με ταχύτερο ρυθμό από άλλα σημεία του σώματος. (Harkey, 1993).

### 2.3 Μηχανισμοί εναπόθεσης ουσιών στην τρίχα

Υπάρχουν δυο μηχανισμοί απορρόφησης και παγίδευσης ουσιών στην τρίχα. Ο ένας συμβαίνει κατά την κερατινοποίηση των καινούριων κυττάρων της τρίχας. Οι ουσίες που κυκλοφορούν στο αίμα εισχωρούν στην τρίχα μέσω του θυλακίου και παραμένουν παγιδευμένες σε συγκεκριμένα σημεία της τρίχας. Ο άλλος μηχανισμός έχει να κάνει με την εξωτερική εναπόθεση ουσιών που βρίσκονται είτε στο περιβάλλον είτε είναι διαλυμένες στον ιδρώτα ή στο σμήγμα που εκκρίνουν οι σμηγματογόνοι αδένες. Οι ουσίες απομακρύνονται κατά την περιποίηση το λούσιμο και το κόψιμο των μαλλιών.

Έχουν γίνει πολλές μελέτες προκειμένου να εξακριβωθεί η σχέση που υπάρχει ανάμεσα στη δόση ενός χημικού που εισχωρεί στον οργανισμό και στη συγκέντρωση του χημικού που ανιχνεύεται στις τρίχες. Τα αποτελέσματα προς το παρόν δεν έχουν βοηθήσει να εξαχθεί ένα ασφαλές συμπέρασμα. Παρά τις αντιρρήσεις που προβάλλονται από την επιστημονική κοινότητα σχετικά με την αποτελεσματικότητα και την αξιοπιστία της ανάλυσης τριχών, η τεχνική έχει ήδη διευκολύνει εγκληματολογικές και ιστορικές έρευνες, έχει χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις ελέγχου doping, μελέτης αυτοψίας, υιοθεσίας και

βιασμού και τα αποτελέσματά της έχουν προσαχθεί στα στοιχεία σε μια σειρά δικαστικών υποθέσεων. Εκτός από τα παραπάνω, η ανάλυση τριχών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην ιατρική, σαν μέσο ελέγχου της συμμόρφωσης ασθενών σε χρόνια θεραπεία για διάφορες ασθένειες.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των τριχών ποικίλει και ρόλο παίζουν διάφοροι παράγοντες, όπως για παράδειγμα το μέρος του σώματος που φύονται. Ένας μέσος ρυθμός ανάπτυξης που είναι γενικά αποδεκτός, ειδικά για τις τρίχες της κεφαλής είναι 1.0±0.3 cm/μήνα. Αυτός ο ρυθμός χρησιμοποιείται στην τμηματική ανάλυση τριχών προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα για την έκθεση σε χημικά σε βάθος χρόνου. Η ανάλυση μιας τρίχας συνολικού μήκους 10 cm μας δίνει πληροφορίες για την έκθεση του ατόμου τους δέκα τελευταίους μήνες. Στη ρίζα αντιστοιχεί η πιο πρόσφατη έκθεση ενώ στην άκρη εκείνη που έγινε στο απώτερο παρελθόν.

Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή, δύο είναι οι κύριοι μηχανισμοί εναπόθεσης ουσιών στις τρίχες. Το αίμα, ο ιδρώτας, το δέρμα και το σμήγμα μπορούν να θεωρηθούν σαν πιθανές δεξαμενές μέσω των οποίων διάφορες ουσίες εισχωρούν στις τρίχες. Κάθε οδός εισχώρησης χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη σταθερά. Κάθε ουσία μπορεί να εισέλθει στην τρίχα κατευθείαν από το περιβάλλον ή μέσω κάποιας από τις προαναφερθείσες δεξαμενές (Cone, 1996).

Οι διάφορες ουσίες και οι μεταβολίτες τους κατανέμονται σε όλο το σώμα κατά κύριο λόγο μέσω της παθητικής διάχυσης τους από το αίμα. Η κατανομή μέσω των μεμβρανών διευκολύνεται από την υψηλή διαλυτότητα μιας ουσίας στα λιπίδια, τη χαλαρή πρόσδεση στις πρωτεΐνες του πλάσματος και τις φυσικοχημικές παραμέτρους που ευνοούν τη μη ιονισμένη μορφή μιας ουσίας στο αίμα. Η διάχυση των ουσιών από τα τριχοειδή αγγεία των θυλακίων στα κύτταρα του υποστρώματος της βάσης του θυλακίου, αναφέρεται σαν ο κύριος μηχανισμός εναπόθεσης ουσιών στις τρίχες. Πιθανότατα οι ουσίες προσδένονται στο υπόστρωμα και στις χρωστικές των τριχών. Καθώς τα κύτταρα επιμηκύνονται και παλιώνουν, νεκρώνονται σταδιακά και σχηματίζουν το στέλεχος της τρίχας με τις ουσίες παγιδευμένες στο υπόστρωμα.

Πολλές ουσίες έχουν ανιχνευτεί και στον ιδρώτα, ο οποίος συντελεί στην εξωτερική εναπόθεση των ουσιών που είναι διαλυμένες σε αυτόν στις τρίχες. Η εναπόθεση της κοκαΐνης μέσω του ιδρώτα έχει μελετηθεί ιδιαίτερα (Cone *et al*, 1994).

Το σμήγμα είναι λιπαρό υλικό το οποίο εκκρίνεται από τους σμηγματογόνους αδένες που βρίσκονται στο θυλάκιο της τρίχας. Υπάρχουν όμως και αδένες που εκκρίνουν κατευθείαν στην επιφάνεια του δέρματος. Το σμήγμα αποτελείται κατά το ένα τρίτο από

ελεύθερα λιπαρά οξέα, κατά το ένα τρίτο από δεσμευμένα λιπαρά οξέα και κατά το ένα τρίτο από υλικά όπως σκουαλίνη, χοληστερίνη και κηρούς. Ο βαθμός που το σμήγμα συνεισφέρει στην εναπόθεση ουσιών στις τρίχες δεν είναι γνωστός. Το σμήγμα καλύπτει το στέλεχος της τρίχας όταν βγαίνει από το θυλάκιο. Αν μια ουσία βρίσκεται διαλυμένη στο σμήγμα, τότε μπορεί να περάσει στην τρίχα. Η επικάλυψη της τρίχας με τους κηρούς και τα λιπίδια του σμήγματος μπορεί να διευκολύνει τη μεταφορά μιας ουσίας από τον ιδρώτα, το δέρμα ή το περιβάλλον σε αυτήν. Μέσω του παραπάνω μηχανισμού πιστεύεται ότι μεταφέρονται τα ιχνοστοιχεία στις τρίχες.

Τέλος, πολλές ουσίες μπορεί να εναποτεθούν στις τρίχες μέσω του δέρματος ή κατευθείαν από το περιβάλλον, αν βρεθεί κάποιος σε χώρο όπου υπάρχουν ατμοί των ουσιών.

# 3 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΜΟΛΥΝΤΩΝ ΣΤΗ ΤΡΙΧΑ

## 3.1 Ανάλυση τριχών για φυτοφάρμακα

Η πρόοδος που έχει σημειωθεί με τη βελτίωση των αναλυτικών τεχνικών και τη δυνατότητα της ανάλυσης ιχνοποσοτήτων σε πολύπλοκα δείγματα, οδήγησε κάποιους επιστήμονες στην διερεύνηση της πιθανότητας να χρησιμοποιηθούν τρίχες για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων και την αξιολόγηση της χαμηλής και μακροχρόνιας έκθεσης σε αυτά. Η επιστημονική βιβλιογραφία που αναφέρεται στα πρώτα εντομοκτόνα που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες δεικνύει πως περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα και οι περιβαλλοντικοί μολυντές.

Αναλυτική έρευνα της βιβλιογραφίας αποκάλυψε ότι οι ουσίες εκείνες πάνω στις οποίες υπάρχουν δημοσιευμένα αποτελέσματα είναι πιο συγκεκριμένα οι πολυχλωριωμένες διβενζο-παρα-διοξίνες (polychlorinated dibenzo-p-dioxins-PCDDs), τα πολυχλωριομένα διβενζοφουράνια (polychlorinated dibenzofurans -PCDFs), τα πολυχλωριομένα διφαινύλια (co-planar polychlorinated biphenyls-Co- PCBs) και τα ολικά πολυχλωριομένα διφαινύλια (total PCBs), lindane, DDTs, diazinon, aldrin, chlorpyrifos, malathion, dieldrin, permethrin, και cyhalothrin. Οι προαναφερθείσες ενώσεις είναι επικίνδυνες για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία εξαιτίας της χημικής τους σταθερότητας και του εντοπισμού τους στην τροφική αλυσίδα και τους ανθρώπινους ιστούς. Οι περισσότεροι από τους ερευνητές που έχουν ασχοληθεί με το θέμα δημοσιεύουν τις αναλυτικές τεχνικές που ανέπτυξαν κατά τη διάρκεια απλών πιλοτικών μελετών, στην προσπάθεια να εξερευνήσουν κάποιες από τις παραμέτρους που επηρεάζουν τη συγκέντρωση των υπό μελέτη ουσιών στις τρίχες.

### *3.1.1 Μέθοδοι εκχύλισης των φυτοφαρμάκων από τις τρίχες και μελέτες ανάκτησης*

Πολλές είναι οι μέθοδοι εκχύλισης των ουσιών από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα της τρίχας που αναπτύχθηκαν. Ενδεικτικά αναφέρονται οι: όξινη υδρόλυση, εκχύλιση soxhlet, reflux και εκχύλιση υγρής –στερεής φάσης.

**Πίνακας 3.1** Ενώσεις υπό ανάλυση, μέθοδος προετοιμασίας δείγματος και ανάκτηση

| **Ενώσεις** | **Μέθοδος προετοιμασίας δείγματος** | Ανάκτηση % | **Συγγραφέας-Αναφορά** |
|---|---|---|---|
| PCBs (clophen) PCDDs, PCDFs co PCBs | Soxhlet εκχύλιση, καθαρισμός σε πολλαπλές στήλες | - | Schramm 1997<br>Schramm 1992 |
| PCDDs, PCDFs,και co PCBs | Reflux με toluene, καθαρισμός με στήλη silica gel πολλαπλών στρωμάτων, επιπλέον καθαρισμός με HPLC | | Nakao *et al* 2002 |
| DDT, lindane | Όξινη υδρόλυση, LLE | | Neuber *et al* 1999 |
| PCBs, DDTs, Diazinon, permethrin, chlorpyriphos, Malathion, | LLE με εξάνιο ή hexane: ethyl acetate (4:1 v/v). | 35-128 | Liu & Pleil 2002 |
| PCBs, DDTs HCHs | Διάφορες μέθοδοι εκχύλισης | ≥85 | Covaci *et al* 2001 |
| Διάφορα εντομοκτόνα | Μεθανολική εκχύλιση | - | Cirimele *et al* 1999 |

Ο Schramm και συνεργάτες (Schramm 1997) σε μια δημοσιευμένη εργασία που αφορούσε τη μελέτη της εναπόθεσης οργανοχλωριομένων ενώσεων στις τρίχες, μελέτησαν την εξωτερική επιμόλυνση των τριχών με μίγμα διοξινών Clophen A 40. Το πρώτο βήμα στη διαδικασία της προετοιμασίας του δείγματος ήταν εκχύλιση soxhlet με τολουένιο για 24 h. Το πρώτο εκχύλισμα καθαρίστηκε περαιτέρω με πολλαπλή χρωματογραφία στήλης (silica, ενεργοποιημένη alumina, οξινισμένο με θειικό οξύ silica gel και τελικά απενεργοποιημένο florisil).

Οι Nakao και συνεργάτες ανέπτυξαν μια πολύπλοκη μέθοδο για να αναλύσουν PCDDs, PCDFs, και co PCBs (Nakao *et al* 2002). Επίσης εξέτασαν το αποτέλεσμα που έχουν στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση κάθε ουσίας παράμετροι όπως η συχνότητα πλυσίματος με ένα κοινό σαμπουάν, διάφορες αλκαλικές τεχνικές διάσπασης του πρωτεϊνικού υποστρώματος, ο χρόνος της εκχύλισης και η παρουσία άλλων ουσιών. Αρχικά το δείγμα τριχών εκχυλίστηκε με 200 ml τολουένιο για 4 h under reflux. Το εκχύλισμα καθαρίστηκε με

χρωματογραφία πολλαπλών στρωμάτων που περιείχαν $Na_2SO_4$, οξινισμένη silica και βασική silica. Το έκπλυμα χωρίστηκε σε τρεις φάσεις με HPLC και η τρίτη φάση αναλύθηκε με GC MS.

Οι Neuber και συνεργάτες ανίχνευσαν τις ουσίες DDT και lindane, προερχόμενες από συντηρητικά ξύλου, σε τρίχες παιδιών προσχολικής ηλικίας (Neuber *et al* 1999). Το πρωτεϊνικό υπόστρωμα της τρίχας διαλύθηκε με επώαση σε θειικό οξύ (7.1 M) στους 80 $^0$C για 1 h. Οι υπό ανάλυση ουσίες απομονώθηκαν με υγρή-υγρή εκχύλιση με κυκλοεξάνιο και το δείγμα αναλύθηκε με GC-MS.

Οι Liu και Pleil (Liu & Pleil 2002) ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ανάλυση τριάντα τεσσάρων διαφορετικών εντομοκτόνων. Οι ουσίες που αναλύθηκαν σε σκόνη και τρίχες σκύλου ανήκουν στις τάξεις των οργανοχλωριομένων, των οργανοφωσφορικών και των πυρεθρινών. Η μέθοδος επιλογής για την απομόνωση των ουσιών περιλάμβανε υγρή-υγρή εκχύλιση με εξάνιο ή μείγμα εξανίου: αιθυλικού ακετυλεστέρα (4:1,v/v).

Οι Cirimele και συνεργάτες (Cirimele *et al* 1999) χρησιμοποίησαν μια πολύ απλή μέθοδο εκχύλισης για να ανιχνεύσουν εντομοκτόνα σε τρίχες εργατών σε αμπέλια. Η μέθοδος περιλάμβανε μεθανολική εκχύλιση των ουσιών από τις τρίχες, εξάτμιση του διαλύτη, επαναδιάλυση του στερεού υπολείμματος σε μεθανόλη και ανάλυση με GC-MS.

Μελέτες ανάκτησης των μεθόδων εκχύλισης που προτείνονται αναφέρονται σε κάποιες εργασίες. Οι περισσότερες μέθοδοι έχουν ανάκτηση ανάμεσα στα 35-120% (Πίνακας 5). Φαίνεται ότι η ανάκτηση εξαρτάται από τη λιποδιαλυτότητα της κάθε ένωσης, καθώς και τον τύπο και τον χρόνο της εκχύλισης.

### *3.1.2 Αναλυτικές τεχνικές*

Η μέθοδος επιλογής από τους περισσότερους επιστήμονες για την ανάλυση των δειγμάτων είναι η αέρια χρωματογραφία, συνδυασμένη είτε με φασματογράφο μάζας (MS) ή Electron Capture Detector (ECD). Ο ανιχνευτής ECD προσφέρει μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικότητα στην ανάλυση των οργανοχλωριομένων ενώσεων. Για την ανίχνευση των οργανοφωσφορικών ενώσεων μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (NPD).

**Πίνακας 3.2:** Αναλυτικές συνθήκες

| **Ενώσεις** | **Αναλυτική μέθοδος** | **Στήλη** | **Ένεση** |
|---|---|---|---|
| PCDD και PCDF | HRGC- HRMS | $Rt_x$ –2330 (60 x 0.25 x 0.25 ) | splitless |
| PCBs | EI ή NCI | DB5 MS (60 x 0.25 x 0.1) | |
| 4 και 6 chlorPCDD/Fs | HRGC-HRMS | SP2331 (60 x 0.32 x 0.20) | splitless |
| 7 και 8chlor PCDDs/Fs | | J&W DB5 (30 x 0.32x 0.25) | |
| Lindane και DDTs | EI GC-MS | CP SIL 5CB (30x0.25 x 0.25) | Splitless |
| PCBs, OCPs, OPPs, | EI GC-MS | pre column: (10x0.53) | Ένεση |
| Pyrethroids | (SIM mode) | $Rt_x$ –CLpest. (30x 0.25 x .25) | μεγάλου |
| | | | όγκου |
| PCBs, HCHs, DDTs | EI GC-MS and GC-ECD | DB1 (25 x0,25 x 0,25)s<br>HT8 (25 x 0.22 x 0.25) | Splittless |
| 15 εντομοκτόνα | EI GC-MS και NCI GC-MS | | Splittless |
| Methomyl | ELISA, HPLC –UV | LC8 column | - |

Η επιλογή της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης ήταν πολύ σημαντική για το σωστό διαχωρισμό των από ανάλυση ενώσεων Οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποίησαν τριχοειδείς στήλες μήκους 30 m. Οι αναλυτικές μέθοδοι έπρεπε να έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν τις ουσίες σε συγκεντρώσεις pg/g (Πίνακας 3.3). Το δείγμα εισήχθη με ένεση σε splittless mode και σε μια εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική cold on large volume injection για να βελτιωθεί η ευαισθησία (Liu and Pleil, 2002).

Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν μεταξύ 200 και 250 $^0$C, ενώ σε όλες σχεδόν τις εργασίες το ήλιο ήταν το φέρον αέριο.

Κάποιες από τις μελέτες έγιναν σε ανθρώπινες τρίχες ενώ κάποιες άλλες έγιναν σε τρίχες πειραματόζωων. Οι Liu και Pleil χρησιμοποίησαν τρίχες σκύλου για τα πειράματα τους. Τα επίπεδα των οργανοχλωριομένων που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες φαίνονται παρακάτω (Πίνακας 3.3).

**Πίνακας 3.3.** Όρια ανίχνευσης (LODs) και επίπεδα ενώσεων στα δείγματα τριχών

| Ενώσεις | Επίπεδα | LOD |
|---|---|---|
| PDDDs and PCDFs | 0.1-10 pg/g | - |
| PCDDs, | 0.481-1.95 pg/g | 0.088-0.12 pg/g |
| PCDFs, | 0.403-1.51 pg/g | 0.088-0.12 pg/g |
| co PCBs | 0.25-0.38pg/g | 0.25 pg/g |

| | | |
|---|---|---|
| DDT, | 50-400 ng/g | 50 ng/g |
| Lindane | 120-400 ng/g | 120 ng/g |
| Diazinon, | 20 ng/g | 25-50 pg |
| permethrin, | 100 ng/g | |
| chlorpyriphos, | 33-700 ng/g | |
| Malathion | 7-24 ng/g | |
| PCBs, | 5.2-13.7 ng/g | 0.5 ng/g |
| DDTs | 18.8-101 ng/g | 1 ng/g |
| HCHs | 14 - 40 ng/g | 1 ng/g |

Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα των DDTs που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες στις συγκεκριμένες μελέτες ήταν μεταξύ 19-400 ng/g, των PCBS 5-13 ng/g των PCDDs και PCDFs 0.1-10 pg/g του lindane 120-400 ng/g των HCHs 14-40 ng/g. Με εξαίρεση τις μελέτες για PCDDs και PCDFs, όπου τα επίπεδα των ουσιών ήταν σε pg/g, οι υπόλοιπες ουσίες που αναφέρονται ανιχνεύονται σε επίπεδα ng/g. Η ανίχνευση και ανάλυση των οργανικών ενώσεων σε ανθρώπινα και περιβαλλοντικά δείγματα είναι ένα όλο και πιο σημαντικό κομμάτι στη διαδικασία αναγνώρισης και διαχείρισης του κινδύνου από την έκθεση στις ουσίες αυτές. Αν και μέχρι τώρα τα πιο κοινά δείγματα που χρησιμοποιούνται στην αξιολόγηση της ανθρώπινης έκθεσης είναι τα βιολογικά υγρά, οι τρίχες κερδίζουν όλο και περισσότερο έδαφος σαν δείγμα επιλογής για την αξιολόγηση της χρόνιας ή μικρής διάρκειας έκθεσης σε διάφορες χημικές ουσίες.

Τα επίπεδα διαφόρων φυτοφαρμάκων στις τρίχες έχουν μετρηθεί επίσης σε περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης ψεκαστών σε θερμοκήπια (Tsatsakis *et al* 2001).

Η ποσοτική εκχύλιση των ουσιών από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα της τρίχας είναι το σπουδαιότερο βήμα στη διαδικασία της ανάλυσης. Αυτό είναι ένα δύσκολο βήμα μια και οι τρίχες περιέχουν λιπόφιλες ουσίες που εμποδίζουν την ανάλυση. Πολλές μέθοδοι καθαρισμού έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί κάποιες από τις οποίες είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και χρονοβόρες.

Οι οργανοχλωριομένες ενώσεις που μελετήθηκαν είναι αρκετά σταθερές, άρα κι έτσι μένουν ανέπαφες από δραστικές διαδικασίες υδρόλυσης του πρωτεϊνικού υποστρώματος, όπως είναι η όξινη και η αλκαλική εκχύλιση. Τα πιο ασταθή εντομοκτόνα όπως τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθροειδή εκχυλίστηκαν από τις τρίχες με υγρή στερεή εκχύλιση με κάποιο οργανικό διαλύτη όπως η μεθανόλη.

Πολλές είναι οι παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της εκχύλισης. Κάποιες από αυτές είναι ο χρόνος επώασης στο εκχυλιστικό μέσο, το πλύσιμο του δείγματος πριν την έναρξη της διαδικασίας, και το pH του μείγματος (Schramm 1997, Nakao *et al* 2002, Covaci *et al* 2001).

Επιπλέον καθαρισμός του δείγματος ήταν δυνατό να επιτευχθεί είτε περνώντας το εκχύλισμα από χρωματογραφικά στηλάκια πολλαπλών στρωμάτων ή με υγρή-υγρή εκχύλιση. Κάποιοι ερευνητές (Cirimele *et al*, 1999) απέφυγαν τον παραπέρα καθαρισμό του δείγματος φοβούμενοι την απώλεια των πτητικών φυτοφαρμάκων.

Η μέθοδος επιλογής για την ανάλυση των ενώσεων στα δημοσιευμένα άρθρα, ήταν GC-MS είτε με ηλεκτρονικό ιονισμό (EI) ή αρνητικό χημικό ιονισμό (NCI) Η ανίχνευση επιλεγμένων ιόντων, χαρακτηριστικό για κάθε φυτοφάρμακο (Selected Ion Monitoring -SIM mode) βελτίωσε τα όρια ανίχνευσης. Για την ανάλυση των οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων η χρήση του ECD ανιχνευτή προσέφερε ακόμη μεγαλύτερη ευαισθησία, κάτι που ίσχυε και για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και τη χρήση ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD).

Ο συγκεκριμένος τύπος ανάλυσης δεν είναι ιδαίτερα αξιόπιστος επειδή κατά την εφαρμογή του δεν γίνεται σωστός διαχωρισμός των ενώσεων, και ιδίως στην περίπτωση κάποιων PCBs. Η επιλογή λοιπόν της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης είναι ακόμη ένας παράγοντας που επηρεάζει την επιτυχία της αναλυτικής μεθόδου. Ο Covaci και συνεργάτες (Covaci *et al* 2001) δοκίμασαν έξι στήλες διαφορετικής πολικότητας για να καταλήξουν στο συμπέρασμα ότι για να διαχωριστούν οι ουσίες σωστά, είναι απαραίτητες τουλάχιστον δύο στήλες διαφορετικής πολικότητας. Συμπέραναν επίσης ότι η πλέον κατάλληλη στήλη για το διαχωρισμό των περισσότερων ουσιών ήταν η DB-1 στήλη και όχι η DB-5, που χρησιμοποιείται από τα περισσότερα εργαστήρια. Ο χρόνος της ανάλυσης και το πρόγραμμα θερμοκρασίας κατέχουν επίσης σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Τα περισσότερα θερμοκρασιακά προγράμματα κρατούν περίπου 30 min ή περισσότερο.

Τέλος, αν και οι περισσότεροι ερευνητές εισάγουν 1 μl δείγματος προς ανάλυση σε splittless mode, κάποιοι χρησιμοποίησαν cold on large volume injection σε μια προσπάθεια να αυξηθεί η ευαισθησία (Liu and Pleil 2002)

Οι δυσκολίες στην ανάλυση των εντομοκτόνων και περιβαλλοντικών μολυντών γίνονται εύκολα αντιληπτές συγκρίνοντας τα επίπεδα των άλλων ουσιών όπως τα φάρμακα και τα ναρκωτικά, που ανιχνεύονται στις τρίχες με αυτά των εντομοκτόνων και των περιβαλλοντικών μολυντών (Πίνακας 3.3).

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι περισσότεροι ερευνητές έχουν συγκεντρωθεί στην ανάπτυξη αναλυτικών τεχνικών και στη διενέργεια πιλοτικών μελετών προκειμένου να εξάγουν κάποια πρώτα συμπεράσματα για τη σπουδαιότητα της ανάλυσης τριχών στη διαδικασία της αξιολόγησης του κινδύνου για τον άνθρωπο. Οι περισσότεροι ερευνητές που δούλεψαν με PCDDs, PSDFs και co PCBs κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ανάλυση τριχών είναι πολύ χρήσιμη στην αξιολόγηση του κινδύνου. Η συγκέντρωση κάποιων από τις ενώσεις που αναλύθηκαν αντικατοπτρίζουν την συνολική επιβάρυνση του οργανισμού (Schramm 1997, Nakao *et al* 2002, Hashimi *et al* 1992, Oghami *et al* 1991). Επίσης η συγκέντρωση των PCDD, PCDF, και Co-PCBs στις τρίχες αντικατοπτρίζει εκείνη του περιβάλλοντος.

Οι Schramm και συνεργάτες προτείνουν στο μέλλον η δουλειά να εστιαστεί στον καταμερισμό των ουσιών ανάμεσα στο αίμα, τους ιστούς και τις τρίχες για διαφορετικές συνθήκες έκθεσης και να γίνουν επιδημιολογικές μελέτες (Schramm 1997, Schramm *et al* 1992). Υποδεικνύουν ότι αν γίνουν πειράματα με διαφορετικούς τύπους τριχών θα εκμηδενιστούν οι διαφορές ανάμεσα στα είδη αλλά και ανάμεσα στα άτομα του ίδιου είδους. Τέλος, τονίζουν ότι η ανάλυση τριχών θα παρέχει ένα φτηνό και ηθικώς αποδεκτό σύστημα αξιολόγησης έκθεσης για ανθρώπους και ζώα, ειδικά για τα προστατευόμενα είδη.

Η ανάλυση τριχών ήταν επίσης χρήσιμη στην αξιολόγηση της οικιακής έκθεσης σε lindane και DDT που οφειλόταν σε συντηρητικά ξύλου ευρισκόμενα είτε στις ξύλινες σκεπές ή σε έπιπλα που είχαν εισαχθεί από τρίτες χώρες, σύμφωνα με τον Neuber και συνεργάτες (Neuber *et al* 1999).

Ο Cirimele και συνεργάτες πιθανόν να ανίχνευσε την ελλιπή εφαρμογή των κανόνων ασφαλείας από τους ψεκαστές των αμπελιών. Δραστικές ουσίες φυτοφαρμάκων είχαν εντοπιστεί σε δείγματα τριχών από γυναίκες που είχαν εκτεθεί σε σύγχρονα φυτοφάρμακα κατά την εργασία τους σε θερμοκήπια (Dopapsakis *et al* 2001, Tutudaki *et al* 2002).

Γενικά οι ερευνητές συμφωνούν ότι η ανάλυση τριχών μπορεί να γίνει ένα χρήσιμο εργαλείο για την αξιολόγηση του κινδύνου στον οποίο υπόκεινται άνθρωποι και περιβάλλον, με την προϋπόθεση να ληφθούν υπόψη όλες εκείνες οι παράμετροι που είναι δυνατό να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα.

# 4 ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΜΟΛΥΝΤΕΣ: ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

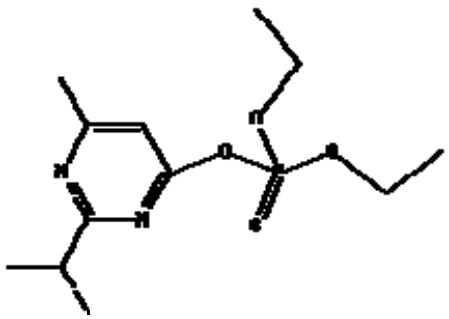
Παρακάτω παρουσιάζονται συνοπτικά τα εντομοκτόνα που αναλύθηκαν ή χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικά standards στην διατριβή

## 4.1 Οργανοφωσφορικά Εντομοκτόνα

Τα οργανοφωσφορικά είναι μια πολύ αποτελεσματική ομάδα εντομοκτόνων που περιέχουν φώσφορο στο μόριο τους. Είναι εστέρες του φωσφορικού οξέος με διάφορους υποκαταστάτες. Χημικά είναι λιγότερο σταθερά από τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα και αυτός είναι ο λόγος αντικατάστασης. Ταυτόχρονα, είναι από τα πιο τοξικά εντομοκτόνα για τα σπονδυλωτά. Εξαιτίας της δομικής τους ομοιότητας με τα αέρια πολέμου, έχουν και παρόμοιο μηχανισμό δράσης. Οι εντομοκτόνες τους ιδιότητες ανακαλύφθηκαν στη Γερμανία κατά τη διάρκεια του Β΄ Παγκοσμίου Πολέμου. Η ανακάλυψη επιτεύχθηκε ψάχνοντας για αντικαταστάτες της νικοτίνης, που μέχρι τότε χρησιμοποιούνταν σαν αποτελεσματικό, αλλά δυσεύρετο εντομοκτόνο.

Η οικογένεια των οργανοφωσφορικών είναι αρκετά μεγάλη και χωρίζεται σε υποκατηγορίες ανάλογα με τη φύση των υποκαταστατών του φωσφορικού οξέος (Ware & Whitaker 2004). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρία συγκεκριμένα φυτοφάρμακα, το diazinon του οποίου η εναπόθεση στις τρίχες μελετήθηκε διεξοδικά, το fenthion και το methyl parathion που χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικά standards.

### *4.1.1 Diazinon*



**Εικόνα 4.1:** Συντακτικός τύπος του diazinon

Το diazinon έχει ένα ετεροκυκλικό αρωματικό δακτύλιο με δύο άτομα αζώτου, ενώ ένα από τα οξυγόνα του φωσφορικού οξέος έχει αντικατασταθεί από ένα άτομο θείου. Εξαιτίας των δύο αυτών στοιχείων το diazinon εκτός από το φασματογράφο μάζας, μπορεί να ανιχνευτεί και με ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD).

Σε καθαρή μορφή πρόκειται για ένα υποκίτρινο υγρό, με μοριακό βάρος 304. Η διαλυτότητα του στο νερό είναι 40 mg/L στους 25 $^{0}$C, ενώ είναι ευδιάλυτο σε διάφορους οργανικούς διαλύτες. Χρησιμοποιείται για την εξόντωση ενός πλήθους εντόμων όπως οι κατσαρίδες, τα ψαράκια, τα μυρμήγκια και οι ψύλλοι σε οικιακές εγκαταστάσεις. Η χρήση του είναι επίσης διαδεδομένη στην κτηνοτροφία, στον έλεγχο των τσιμπουριών και των ψύλλων. Τέλος, χρησιμοποιείται εκτενώς σε πολλές καλλιέργειες για την εξόντωση εντόμων που καταστρέφουν το φύλλωμα και τους καρπούς των διακοσμητικών φυτών και των καρποφόρων δέντρων.

Πολλές μελέτες σε ανθρώπους και ζώα έχουν γίνει προκειμένου να βρεθεί σε ποιους ιστούς έχει την τάση να συγκεντρώνεται το diazinon, ποια άλλα ένζυμα επηρεάζονται εκτός από τη ακετυλοχολινεστεράση και ποια είναι τα λιγότερο εμφανή συμπτώματα που ενδεχομένως σχετίζονται με χρόνια και σε χαμηλές δόσεις έκθεση.

Σύγκριση τριών πιθανών ιστών στόχων σε μια μελέτη με ποντίκια, έδειξε ότι το diazinon έχει την τάση να συγκεντρώνεται περισσότερο στο νεφρό και λιγότερο στο ήπαρ και στον εγκέφαλο (Tomokuni *et al* 1985). Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι επηρεάζει το μεταβολισμό της τρυπτοφάνης στα ποντίκια και προκαλεί υπεργλυκαιμία (Seifert 1992).

Τέσσερα ένζυμα του πλάσματος επηρεάζονται από την ύπαρξη του εντομοκτόνου στον οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, αναστέλλονται η εθυλοξική γλουταμική τρανσαμινάση (glutamic oxaloacetic transaminase -GOT), η γλουταμική πυρουβική τρανσαμινάση (glutamic pyruvic transaminase -GPT), η γλουταμική τρανσφεράση Glutamyl transerase (GT) και η αφυδρογονάση του γαλακτικού οξέος lactate dehydrogenase (LDH) (Enan *et al* 1982).

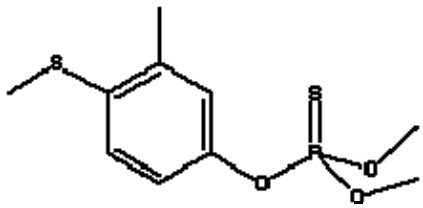
Μελέτη σε ανθρώπους επαγγελματικά εκτεθειμένους στο εντομοκτόνο έδειξε μειωμένη μάζα οστών (Compston *et al* 1999), ενώ έχει αποδειχθεί ότι η έκθεση μπορεί να προκαλέσει χρωμοσωμικές ανωμαλίες (Matsuoka *et al*, 1979) πρόβλημα στην ποιότητα του σπέρματος (Piña-Guzmán *et al*, 2005) και άρα στην αναπαραγωγή (Dutta & Meijec, 2003) ή και τερατογένεση σε μερικά είδη (Hamm and Hinton 2000). Τέλος, επηρεάζει δυσμενώς και το ανοσοποιητικό σύστημα (Handy *et al*, 2002). Τα μέχρι τώρα διαθέσιμα βιβλιογραφικά στοιχεία δεν του αποδίδουν καρκινογόνες ιδιότητες (NCI, 1979).

Στο έδαφος ο χρόνος ημίσειας ζωής του diazinon κυμαίνεται από δύο έως τέσσερις εβδομάδες, ανάλογα με τις κλιματολογικές συνθήκες (Wachope *et al*, 1992). Σπάνια εισχωρεί

στο έδαφος βαθύτερα από μερικά εκατοστά. Σε μερικές περιπτώσεις όμως έχει ανιχνευθεί σε νερά ποταμών και λιμνών (Howard 1991). Ο ρυθμός αποικοδόμησης του στο νερό εξαρτάται από την οξύτητα του νερού. Σε ελαφρώς όξινα περιβάλλοντα ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι περίπου δώδεκα ώρες, ενώ αντίθετα σε ουδέτερο pH μπορεί να είναι μέχρι και έξι μήνες (Howard 1991). Το diazinon απορροφάται από τις ρίζες του φυτού και μεταφέρεται στον κορμό τα φύλλα και τον καρπό. Χαμηλές θερμοκρασίες και μεγάλη περιεκτικότητα των ιστών σε έλαια μεγαλώνει το χρόνο παραμονής του εντομοκτόνου στα φυτά (Bartsch 1974). Το diazinon είναι ιδιαίτερα τοξικό για τα πουλιά, μερικά είδη ψαριών και τις μέλισσες (Kidd, *et al* 1991).

### *4.1.2 Fenthion*

Το fenthion είναι ένα ακόμη μέλος της οικογένειας των οργανοφωσφορικών.



**Εικόνα 4.2:** Συντακτικός τύπος του fenthion

Το fenthion, όπως και το diazinon έχει ένα αρωματικό δακτύλιο, που είναι όμως ομοκυκλικός. Δεν έχει άζωτα στο μόριο του, έχει όμως δύο άτομα θείου. Το καθαρό fenthion είναι ένα άχρωμο υγρό, ενώ σε μορφή technical grade εμφανίζεται σαν ένα ελαιώδες κιτρινωπό υγρό με χαρακτηριστική μυρωδιά σκόρδου. Η διαλυτότητα του στο νερό είναι 2 mg/L στους 20 $^{0}$C, ενώ είναι ευδιάλυτο στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες .

Το fenthion δρα μετά από επαφή με το δέρμα ή μετά από κατάποση. Χρησιμοποιείται λοιπόν ευρέως σαν εντομοκτόνο στην καταπολέμηση των κουνουπιών, του δάκου, της μύγας των φρούτων και άλλων επιβλαβών εντόμων. Στην Κρήτη χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το dimethoate για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς. Το fenthion είναι αρκετά τοξικό για τα θηλαστικά και πολύ τοξικό για τα πτηνά.

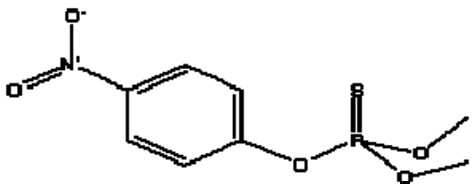
Το fenthion εισχωρεί στον οργανισμό από το γαστρεντερικό σύστημα, το δέρμα ή και

τους πνεύμονες και κατανέμεται σε όλο το σώμα μέσω του αίματος. Είναι μέτρια τοξικό όταν χορηγείται από το στόμα με $LD_{50}$ από 180 έως 298 mg/kg για τους αρουραίους, 150 mg/kg για τα κουνέλια και 88-145 mg/kg για τα ποντίκια (U.S. Public Health Service 1995, Kidd and James 1991). Τα συμπτώματα της οξείας δηλητηρίασης είναι όμοια με αυτά που περιγράφονται για το diazinon, χρειάζονται όμως περισσότερο χρόνο για να αναπτυχθούν. Συμπτώματα είναι δυνατό να υπάρξουν και από χρόνια έκθεση σε χαμηλότερα επίπεδα, όπως για παράδειγμα συνέβη σε κτηνιάτρους που χρησιμοποιούσαν χωρίς προστασία σκεύασμα που περιείχε fenthion (Gallo and Lawryk, 1991).

Το fenthion έχει χρόνο ημίσειας ζωής τριάντα τέσσερις ημέρες στο έδαφος. Υπολείμματα στο χώμα μπορεί να ανιχνευθούν ακόμα και έξι εβδομάδες μετά από την εφαρμογή του. Απορροφάται από τα σωματίδια στο χώμα και άρα είναι πολύ πιθανή η μετανάστευση του στα βαθύτερα στρώματα. Μπορεί επίσης να μολύνει το νερό, όπως αποδεικνύει η ανίχνευσή του στα νερά ενός ποταμού έξι εβδομάδες μετά την εφαρμογή του (Khan 1977). Ο χρόνος ημίσειας ζωής στο νερό έχει υπολογιστεί στις δύο εβδομάδες, ενώ είναι πιο σταθερό σε αλκαλικά περιβάλλοντα. Απορροφάται από τα φυτά και σε μερικά είδη μπορεί να αποβεί βλαβερό, ειδικά αν χρησιμοποιείται σε μεγάλες δόσεις. Είναι τοξικό για τα πουλιά, τις μέλισσες και κάποια είδη ψαριών και υδρόβιων οργανισμών.

### *4.1.3 Methyl Parathion*

Το methyl parathion είναι ένα ακόμη μέλος της οικογένειας των οργανοφωσφορικών,



**Εικόνα 4.3:** Συντακτικός τύπος του Methyl parathion

και μάλιστα από αυτά με την πιο μεγάλη οξεία τοξικότητα. Η καθαρή ουσία εμφανίζεται σαν ένα άχρωμο κρυσταλλικό στερεό, ενώ στην τεχνική μορφή έχει ένα καφέ χρώμα και καθαρότητα περίπου 80 %.

Το methyl parathion χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες όπως το βαμβάκι, τα καπνά και τα μήλα για τον έλεγχο παρασίτων που καταστρέφουν την παραγωγή, τα οποία εξοντώνει αφού εισχωρήσει στον οργανισμό τους από το πεπτικό σύστημα, το δέρμα ή τους πνεύμονες.

Το methyl parathion διεισδύει πολύ εύκολα στην κυκλοφορία του αίματος από όλες τις πιθανές οδούς χορήγησης. Δεν συγκεντρώνεται στο σώμα, ενώ αποβάλλεται από τα νεφρά μέσα σε είκοσι τέσσερις ώρες σαν φαινολικοί μεταβολίτες.

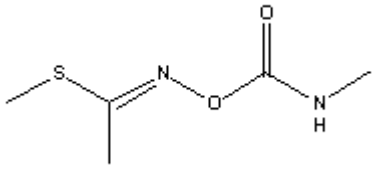
Το methyl parathion έχει πολύ μεγάλη οξεία τοξικότητα, ειδικά όταν χορηγείται από το στόμα. Ενδεικτικά, για τους αρουραίους έχουν αναφερθεί $LD_{50}$ από 5 έως 50 mg/kg, για τα κουνέλια 420 mg/kg και 90 mg/kg για σκύλους. Είναι επίσης τοξικό εφόσον εισχωρήσει στον οργανισμό μέσω του δέρματος ή με εισπνοή. Τοξικολογικές μελέτες αναπαραγωγής σε ποντίκια έδειξαν ότι το methyl parathion προκαλεί δυσκολίες στην αναπαραγωγή, έχοντας σαν αποτέλεσμα μικρότερο αριθμό εμβρύων ανά κύηση και μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης των εμβρύων από το κανονικό. Για τον άνθρωπο δεν υπάρχουν προς το παρόν ανάλογα στοιχεία. Τέλος, το methyl parathion δεν φαίνεται να προκαλεί μεταλλάξεις ή καρκίνο.

Το methyl parathion δεν έχει την τάση να συγκεντρώνεται στο έδαφος και το περιβάλλον. Μελέτες αναφέρουν σαν χρόνο ημίσειας ζωής από μία έως τριάντα ημέρες. Ο ρυθμός διάσπασης επιταχύνεται σε αυξημένες θερμοκρασίες και ηλιοφάνεια. Στο νερό έχει χρόνο ημίσειας ζωής οκτώ ημέρες το καλοκαίρι και τριάντα οκτώ το χειμώνα. Διασπάται γρηγορότερα στο γλυκό νερό και η διάσπαση επιταχύνεται με την παρουσία ιζημάτων. Ο κύριος μηχανισμός διάσπασης φαίνεται να είναι η φωτόλυση. Απορροφάται και μεταβολίζεται πολύ γρήγορα από τα φυτά. Είναι πολύ τοξικό για τα πουλιά, τις μέλισσες και αρκετούς υδρόβιους οργανισμούς.

## 4.2 Καρβαμιδικά

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα είναι παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος και, όπως τα οργανοφωσφορικά, δρουν μέσω της αναστολής του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση. Το πρώτο από τα καρβαμιδικά που χρησιμοποιήθηκε εκτενώς από το 1956 που ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιείται ακόμη και σήμερα είναι το carbaryl. Στην παρούσα έρευνα όμως, επιλέξαμε να ασχοληθούμε με το methomyl, εξαιτίας της ευρείας χρήσης του στην περιοχή της Κρήτης σαν ποντικοφάρμακο και του πλήθους των ατυχημάτων που έχουν προκληθεί εξαιτίας της μεγάλης τοξικότητάς του.

### *4.2.1 Methomyl*




**Εικόνα 4.4:** Συντακτικός του τύπος methomyl

Το methomyl πρωτοπαρουσιάστηκε στην αγορά το 1966 σαν ένα ευρέως φάσματος εντομοκτόνο. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο τσιμπουριών και αραχνών, για τη διατήρηση της υγείας του φυλλώματος λαχανικών και φρούτων και για τη συνολική προστασία καλλιεργειών όπως το βαμβάκι. Στην κτηνιατρική χρησιμοποιείται σε εκτροφεία ορνίθων και σε γαλακτοπαραγωγές μονάδες. Είναι επίσης πολύ αποτελεσματικό για τον έλεγχο των τρωκτικών. Δρα με δυο τρόπους, καταρχήν σαν εντομοκτόνο εξ' επαφής, επειδή σκοτώνει τα έντομα στόχους με την απευθείας επαφή με το σώμα τους και κατά δεύτερον σαν συστηματικό εντομοκτόνο, εξαιτίας της ικανότητας του να προκαλεί συστηματική δηλητηρίαση, αφού απορροφάται από τον οργανισμό των εντόμων που τρώνε από τα ψεκασμένα φυτά. Το methomyl απορροφάται επίσης από τα φυτά χωρίς όμως να τους προκαλεί τοξικότητα.

Ο χρόνος ημίσειας ζωής του methomyl στο έδαφος είναι περίπου δεκατέσσερις ημέρες. Είναι πολύ ευδιάλυτο στο νερό και έχει μικρή τάση να προσδένεται στα σωματίδια του εδάφους. Αυτό αυξάνει την πιθανότητα μετανάστευσης και μόλυνσης του παρακείμενου υδροφόρου ορίζοντα. Διασπάται γρήγορα από μικροοργανισμούς του εδάφους. Στο νερό ο χρόνος ημίσειας ζωής του έχει εκτιμηθεί στις έξι ημέρες στα επιφανειακά νερά, ενώ είναι μεγαλύτερος σε εδαφικά νερά. Το ηλιακό φως και τα αλκαλικά περιβάλλοντα επιταχύνουν το ρυθμό αποικοδόμησης του. Το methomyl είναι πολύ τοξικό για τα πουλιά, διάφορους υδρόβιους μικροοργανισμούς και τις μέλισσες.

Το methomyl απορροφάται γρήγορα από τον οργανισμό, μεταβολίζεται από το συκώτι και τα προϊόντα μεταβολισμού απεκκρίνονται με τα ούρα. Δεν φαίνεται να υπάρχει συγκέντρωση στους ιστούς, υπάρχουν όμως στοιχεία που δείχνουν ότι το methomyl επηρεάζει τη λειτουργία κι άλλων ενζύμων εκτός από τις χολινεστεράσες (US National library, 1995). Η οξεία τοξικότητα του methomyl είναι πάρα πολύ μεγάλη για πολλά διαφορετικά είδη ζώων και για τον άνθρωπο (Gosselin *et al*, 1984). Είναι ιδιαίτερα τοξικό αν χορηγηθεί από το στόμα ή αν εισχωρήσει στον οργανισμό από τους πνεύμονες, ενώ η

τοξικότητά του δεν είναι τόσο μεγάλη αν υπάρξει δερματική απορρόφηση. Τα αναφερθέντα στη βιβλιογραφία $LD_{50}$ είναι 17-24 mg/kg για τους αρουραίους (Kidd and James 1991), 10 mg/kg για τα ποντίκια και 15 mg/kg για τα ινδικά χοιρίδια (Baron 1991).

Χρόνια επαναλαμβανόμενη έκθεση είναι δυνατό να δημιουργήσει συμπτώματα που μοιάζουν με αυτά της γρίπης, εξαιτίας της μη αντιληπτής αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης. Τα όργανα που φαίνεται να επηρεάζονται περισσότερο είναι οι πνεύμονες, το δέρμα, το πεπτικό σύστημα και η σπλήνα. Μελέτες σε ζώα και *in vitro* που έχουν γίνει για να εξετάσουν την ικανότητα του methomyl να προξενεί βλάβες στην αναπαραγωγή ή τα έμβρυα καθώς και την ικανότητα του να προκαλεί μεταλλάξεις ή καρκίνο, έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα.

## 4.3 Οργανοχλωριομένα

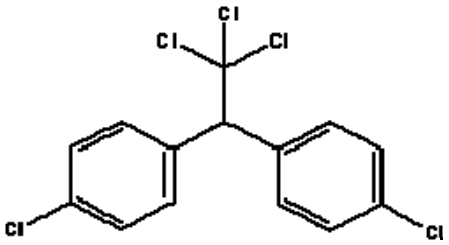
Οι οργανοχλωριομένες ενώσεις είναι οργανικές ενώσεις που στο μόριο τους περιέχουν ένα ή περισσότερα χλώρια. Οι ενώσεις που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα και τα χλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), τα οποία είναι κυρίως βλαβερά προϊόντα της βιομηχανικής δραστηριότητας του ανθρώπου.

Τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα είναι ενώσεις που περιέχουν άνθρακα, υδρογόνο και χλώριο. Ήταν τα πρώτα συνθετικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν στη θέση ενώσεων του αρσενικού, της νικοτίνης, των φυσικών πυρεθρινών, αλάτων του χαλκού και διαφόρων άλλων απλών ενώσεων.

Η πρώτη ένωση που χρησιμοποιήθηκε ήταν το DDT, το οποίο χρησιμοποιήθηκε, σε εξαιρετικά μεγάλες ποσότητες από το 1940 που ανακαλύφθηκε μέχρι το 1973 που απαγορεύτηκε στις Η.Π.Α. Μια άλλη ένωση που χρησιμοποιήθηκε ιδιαίτερα ήταν το lindane ή γ-κυκλοχλωροεξάνιο (γ-hexachlorcyclohexane HCH), το οποίο εξαιτίας του χαμηλού κόστους του, χρησιμοποιείται ακόμη σε πολύ συγκεκριμένες περιπτώσεις.

Ο λόγος για τον οποίο τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα αποσύρθηκαν από την Ευρώπη και την Αμερική, ήταν η εξαιρετικά μεγάλη τους σταθερότητα και ο μεγάλος χρόνος ημίσειας ζωής τους στο περιβάλλον και τους βιολογικούς ιστούς. Αξίζει να σημειωθεί ότι μελέτες που έγιναν σε ευρωπαϊκές χώρες όπως η Γερμανία και το Βέλγιο, έδειξαν ότι παρόλο που η χρήση των οργανοχλωριομένων έχει σταματήσει την δεκαετία του ΄70, ανιχνεύονται ακόμη σε ανθρώπινους ιστούς και στο μητρικό γάλα. (Covaci 2001).

### *4.3.1 DDT*




**Εικόνα 4.5:** Συντακτικός τύπος του DDT

Το DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane) είναι ένα οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο πολύ αποτελεσματικό για τον έλεγχο των κουνουπιών και της ελονοσίας που μεταδίδουν. Στις ανεπτυγμένες χώρες έχει αντικατασταθεί από άλλα λιγότερο σταθερά εντομοκτόνα. Χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου πολέμου για τον έλεγχο των ασθενειών που μεταδίδονται μέσω εντόμων. Με τη λήξη του πολέμου χρησιμοποιήθηκαν τεράστιες ποσότητες σαν εντομοκτόνα στην γεωργία. Η χρήση του DDT απαγορεύτηκε στη Σουηδία το 1970 ενώ στην Αμερική το 1973. Ακολούθησαν όλες οι υπόλοιπες χώρες του ανεπτυγμένου κόσμου. Το DDT ήταν διαθέσιμο σε πολλά σκευάσματα, μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα μη αλκαλικά εντομοκτόνα. Το DDT και τα παράγωγα του είναι πολύ διαλυτό σε λίπη και οργανικούς διαλύτες και σχεδόν αδιάλυτό στο νερό, ενώ παραμένουν σταθερά σε ισχυρά οξέα.

Το DDT είναι λίγο έως μέτρια τοξικό σε διάφορα είδη θηλαστικών, χορηγούμενο από το στόμα. Οι αναφερόμενες $LD_{50}$ για τους αρουραίους κυμαίνονται από 113-800 mg/kg (ATSDR, 1994). Η βαρύτητα των συμπτωμάτων ποικίλει ανάλογα με το χορηγούμενο σκεύασμα και την παρουσία λιπών στο γαστρεντερικό σωλήνα, μια και το εντομοκτόνο απορροφάται από το πεπτικό σύστημα και η παρουσία λιπών διευκολύνει την απορρόφηση. Η χορήγηση μιας δόσης των 50 mg/kg σε αρουραίους προκάλεσε μειωμένη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα. Η χορήγηση μιας δόσης των 150 mg/kg σε μαϊμούδες προκάλεσε αύξηση στα ανιχνευόμενα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων στο αίμα και αλλαγές στην κυτταρική χημεία του νευρικού συστήματος. Η οξεία τοξικότητα στον άνθρωπο μπορεί να εκδηλωθεί με ναυτία, διάρροια, αύξηση των ηπατικών ενζύμων, ενόχληση στα μάτια τη μύτη ή το λαιμό, αστάθεια και υπερκινητικότητα. Μεγαλύτερη έκθεση μπορεί να προκαλέσει τρέμουλο και σπασμούς. Μελέτες χρόνιας τοξικότητας σε ζώα έδειξαν ότι τα όργανα στόχοι είναι το νευρικό σύστημα, το ήπαρ, τα νεφρά και το ανοσοποιητικό σύστημα (ATSDR, 1994, WHO,

1979). Από μελέτες σε ζώα εξάγονται στοιχεία ότι το DDT προκαλεί βλάβες στο αναπαραγωγικό σύστημα, είναι μεταλλαξιογόνο και τερατογόνο. Τέλος υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι σε κάποια ζώα μπορεί να προκαλέσει καρκίνο.

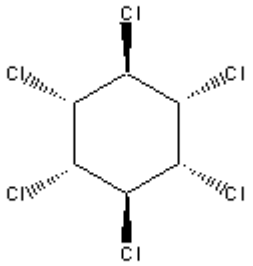
Το DDT στα θηλαστικά μεταβολίζεται πολύ αργά σε DDE και DDD, τα οποία αποθηκεύονται στο λιπώδη ιστό. Οι ουσίες αυτές τελικά μεταβολίζονται σε bis(dichlorodiphenyl)acetic acid (DDA).Το DDA ή τα σύμπλοκα αυτού τελικά αποβάλλονται από τον οργανισμό με τα ούρα. Εκτός από το λιπώδη ιστό, το DDT και οι μεταβολίτες του ανιχνεύονται και στο μητρικό γάλα (Covaci 2001).

Όπως έχει προαναφερθεί το DDT είναι εξαιρετικά επίμονο στο περιβάλλον, με αναφερόμενο χρόνο ημίσειας ζωής από δύο έως δεκαπέντε χρόνια. Ο μηχανισμός μείωσης της συγκέντρωσής του στο περιβάλλον περιλαμβάνει εξάτμιση, φωτόλυση και βιοαποικοδόμηση, διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα με πολύ αργούς ρυθμούς. Τα προϊόντα αποικοδόμησης του DDT στο έδαφος είναι τα DDE και DDD, τα οποία είναι επίσης εξαιρετικά επίμονα στο περιβάλλον και έχουν παρόμοιες φυσικές και χημικές ιδιότητες με τη μητρική ένωση (WHO 1989, Augustjin-Beckers *et al*, 1994).

Αν και η οξεία τοξικότητα του DDT δεν είναι πολύ μεγάλη, για τα πουλιά η χρόνια έκθεση στο εντομοκτόνο δυσχεραίνει την αναπαραγωγή, προκαλώντας θάνατο των εμβρύων και αυγά με λεπτό και εύθραυστο κέλυφος. Φαίνεται μάλιστα ότι η λέπτυνση του κελύφους οφείλεται στο DDE (WHO, 1989). Η έκθεση των πουλιών αλλά και των περισσότερων οργανισμών γίνεται μέσω της τροφικής αλυσίδας. Υπάρχουν στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η παρουσία μεταβολιτών των οργανοφωσφορικών και τα πολυχλωριομένα διφαινύλια αυξάνει την τοξικότητα του DDT.

Το DDT είναι πολύ τοξικό για τα υδρόβια ασπόνδυλα είδη (Johnson and Finley, 1980), δεν είναι όμως τοξικό για τις μέλισσες ή τους γαιοσκώληκες (WHO, 1989). Σε πολλά είδη ψαριών βιοσυσσωρεύεται ακόμη και 1.000.000 φορές πάνω από την συγκέντρωση του περιβάλλοντος. Κατανάλωση επιβαρυμένων τροφίμων προκαλεί προβλήματα στον άνθρωπο και στους οργανισμούς που βρίσκονται στην κορυφή της τροφικής αλυσίδας.

### *4.3.2 Lindane*




**Εικόνα 4.6:** Συντακτικός τύπος του lindane

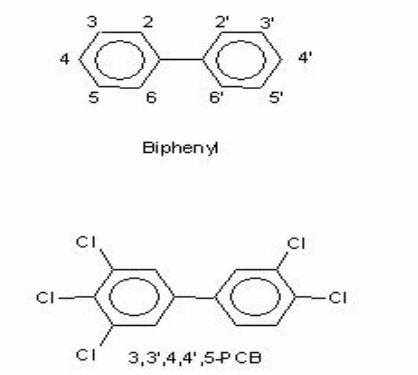
Το lindane είναι το γ ισομερές της ένωσης εξαχλωροκυκλοεξάνιο και είναι το μόνο από τα πέντε ισομερή που απαντώνται στο τεχνικό σκεύασμα που έχει εντομοκτόνες ιδιότητες. Έτσι το ισομερές αυτό απομονώνεται και κυκλοφορεί στην αγορά σαν άοσμο εντομοκτόνο με την ονομασία lindane. Εξαιτίας του πολύ χαμηλού του κόστους χρησιμοποιείται ακόμη σε πολλές χώρες.

Το lindane απορροφάται από όλες τις πιθανές οδούς χορήγησης και αποθηκεύεται στον λιπώδη ιστό. Μεταβολίζεται μέσω διαφόρων μεταβολικών μονοπατιών με πιο γνωστά την κατά βήματα αφαίρεση των χλωρίων και τη σύζευξη και θειικές και γλουκουρονικές ομάδες. Άλλα μεταβολικά μονοπάτια οδηγούν σε σύνθεση μερκαπτοουρικού οξέος. Έχει μέτρια οξεία τοξικότητα ($LD_{50}$ από 88-190 mg/kg για τους αρουραίους, 59-562 mg/kg για ποντίκια, 200 mg/kg για κουνέλια). Στοιχεία από μελέτες σε ανθρώπους με χρόνια επαγγελματική έκθεση δείχνουν ότι σε χαμηλά επίπεδα μπορεί να μην υπάρχουν συμπτώματα, μπορεί όμως να εντοπιστούν αλλαγές στα καρδιογραφικά ευρήματα των εκτιθέμενων. Στοιχεία που προέρχονται από μελέτες σε ζώα δείχνουν ότι το lindane μπορεί να προκαλέσει διάφορες βλάβες στον οργανισμό. Τα όργανα στόχοι φαίνεται να είναι το κεντρικό νευρικό σύστημα, το ανοσοποιητικό σύστημα, το ήπαρ, ο νεφρός, το πάγκρεας, οι όρχεις και το επιθήλιο της μύτης. Τα στοιχεία σε σχέση με την ικανότητα καρκινογένεσης δεν επιτρέπουν την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Το lindane είναι πάρα πολύ σταθερό στο περιβάλλον, σε διάφορα είδη εδαφών. Η ημίσεια ζωή του έχει υπολογιστεί περίπου στους δεκαπέντε μήνες. Όταν ψεκάζεται επιφανειακά στο χώμα ο χρόνος ημίσειας ζωής είναι πολύ μικρότερος από την περίπτωση που εισχωρήσει σε βαθύτερα στρώματα. Δεν προσδένεται στα σωματίδια του εδάφους και αυτό κάνει πολύ εύκολη τη μετανάστευση του και τη μόλυνση του υδροφόρου ορίζοντα. Το

lindane είναι πολύ σταθερό στο νερό και δεν είναι ευάλωτο στη φωτοαποικοδόμηση. Μπορεί εύκολα να εισχωρήσει και να συσσωρευτεί σε ιστούς φυτών και ζώων, ειδικά σε αυτούς που είναι λιπώδεις. Εισχωρεί λοιπόν στην τροφική αλυσίδα και μολύνει το περιβάλλον και τον άνθρωπο.

### *4.3.3 Πολυχλωριομένα διαφαινύλια (PCBs)*




**Εικόνα 4.7:** Γενικός Συντακτικός τύπος των PCBs

Τα πολυχλωριομένα διαφαινύλια παράχθηκαν βιομηχανικά σαν πολύπλοκα μείγματα για μια μεγάλη ποικιλία χρήσεων, όπως διηλεκτρικά υγρά σε μετασχηματιστές, υδραυλικά υγρά, λιπαντικά, και σαν πρόσθετα φυτοφαρμάκων, βαφών, σε φωτοτυπικό χαρτί, και σε πλαστικά (Erickson 1997). Ένα από τα πιο γνωστά μείγματα PCBs κυκλοφόρησε στην αγορά από το 1933 μέχρι το 1977 με την ονομασία Aroclor. Στα μείγματα αυτά έχουν εντοπιστεί πάνω από 130 ισομερή, ενώ θεωρητικά είναι δυνατό να υπάρχουν 209 ισομερή (Giesy *et al* 1999). Τα άτομα του χλωρίου στον διφαινυλικό πυρήνα αριθμούνται όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.7. Τα διάφορα ισομερή έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες, οι οποίες και είναι υπεύθυνες για τη διαφορετική κατανομή των ισομερών στο περιβάλλον και τους ιστούς και τη διαφορετική τους τοξικότητα.

Τα PCBs έχουν μικρή διαλυτότητα στο νερό, είναι όμως πολύ διαλυτά σε οργανικούς διαλύτες, λίπη και έλαια. Έχουν μεγάλη αντοχή στη φωτιά, στη θερμότητα και χρήσιμες ηλεκτρικές ιδιότητες. Παρόλα αυτά, εξαιτίας της μεγάλης χημικής τους σταθερότητας και της τοξικότητάς τους η χρήση τους σε ανοικτά συστήματα έχει απαγορευτεί παγκοσμίως από το

1970. Επιτρέπεται όμως η χρήση τους σε κλειστά συστήματα και κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες μέχρι το 2010, οπότε και σχεδιάζεται η πλήρης απαγόρευση της χρήσης τους.

Μελέτες σε ζώα και ανθρώπους έδειξαν ότι τα πολυχλωριομένα διφαινύλια είναι καρκινογόνα. Επιδημιολογικές μελέτες σε εργαζόμενους με PCBs έδειξαν αυξημένες περιπτώσεις καρκίνου του ήπατος και κακοήθους μελανώματος. Επίσης αποδείχτηκε ότι τα μίγματα εκείνα των PCBs που έχουν την τάση να συγκεντρώνονται στους ιστούς των ψαριών και των ζώων είναι και τα πιο καρκινογόνα, άρα οι άνθρωποι που καταναλώνουν τρόφιμα επιβαρυμένα με τις παραπάνω ουσίες είναι πολύ πιθανό να εμφανίσουν καρκίνο. Μελέτες σε ζώα, έδειξαν επίσης ότι έκθεση σε PCBs έχει δυσμενή αποτελέσματα στο ανοσοποιητικό, το νευρικό το ενδοκρινικό και το αναπαραγωγικό σύστημα (EPA, 2006).

Τα PCBs απελευθερώνονται στο περιβάλλον κατά τη βιομηχανική παρασκευή τους, τη χρήση τους και την μη ασφαλή απόρριψη των συσκευών που τα περιέχουν. Επίσης μπορούν να απελευθερωθούν σε περιπτώσεις ατυχημάτων ή κατά την καύση αποβλήτων σε χωματερές. Πρόκειται για πολύ σταθερές ενώσεις και μπορούν να μεταφερθούν με τον αέρα σε πολύ μακρινές αποστάσεις. Δεν είναι πολύ διαλυτά στο νερό, προσδένονται όμως σε σωματίδια που είναι διαλυμένα στο νερό και επικάθονται στα ιζήματα του πυθμένα. Τα PCBs προσλαμβάνονται από τους μικροοργανισμούς και τα ψάρια στο νερό. Με αυτόν τον τρόπο εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και βιοσυσωρεύνταιι σε μεγαλύτερους οργανισμούς. Τα επίπεδα που ανιχνεύονται στους επιβαρυμένους οργανισμούς μπορεί να είναι και χιλιάδες φορές υψηλότερα από αυτά που ανιχνεύονται στο νερό (ASTDR, 2001). Τα ισομερή των πολυχλωριομένων διφαινυλίων (PCB congeners αριθμοί κατά IUPAC) που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα 28, 52, 99, 101, 118, 138, 149, 153, 156, 170, 180 και 187

# ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 5 ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ: ΤΟ DIAZINON ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ *IN VIVO* ΚΑΙ *IN VITRO* ΜΕΛΕΤΕΣ ΤΗΣ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΣΤΙΣ ΤΡΙΧΕΣ.

Το diazinon είναι ένα πολύ αποτελεσματικό και ευρέως χρησιμοποιούμενο εντομοκτόνο. Δρα βασικά αναστέλλοντας το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση και είναι γνωστό ότι μπορεί να προκαλέσει πολύ βαριά οξεία δηλητηρίαση στον άνθρωπο (Holmsted, 1959). Υπάρχουν όμως και πολύ σοβαρές ενδείξεις ότι εκτός από το βασικό ένζυμο στόχο, μια πλειάδα άλλων σπουδαίων ενζύμων του οργανισμού (Seifert *et al*, 1992), όπως για παράδειγμα η υδρολάση των αμιδίων των λιπαρών οξέων (fatty acid amide hydrolase), ένζυμο υπεύθυνο για τον ύπνο και την αναλγησία, επηρεάζονται από την έκθεση στο diazinon και σε άλλα οργανοφωσφορικά (Quistad *et al*, 2001).

Χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα diazinon μπορεί να προκαλέσει μείωση της οστικής μάζα (Compston *et al*, 1999), δυσλειτουργία των πνευμόνων (Peiris-John *et al* 2005) ή δυσμενείς επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα (Handy *et al*, 2002, Neishabouri *et al* 2004). Όλα τα παραπάνω υποδεικνύουν την αναγκαιότητα μιας μεθόδου αξιολόγησης της χρόνιας έκθεσης σε χαμηλά επίπεδα του εντομοκτόνου.

Ο πρώτος στόχος της έρευνας ήταν η ανάπτυξη κατάλληλης και αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου, προκειμένου σε αυτή να στηριχτούν επόμενα στάδια της διατριβής.

Η μέθοδος επιλογής ήταν η αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας. Για τη βελτίωση των ορίων ανίχνευσης στην περίπτωση του diazinon, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με αρνητικό χημικό ιονισμό. Χαμηλά όρια ανίχνευσης, χωρίς όμως τη δυνατότητα της ταυτοποίησης των ουσιών μας, επιτεύχθηκαν με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με ανιχνευτή NPD.

Η διαδικασία ανάπτυξης αναλυτικής μεθόδου έγινε σε συνδυασμό με δύο μελέτες σε πειραματόζωα, οι οποίες παρουσιάζονται παρακάτω:

## 5.1 ΜΕΛΕΤΗ Ι: Ανίχνευση του εντομοκτόνου Diazinon σε τρίχες άσπρων κουνελιών Νέας Ζηλανδίας.

### *5.1.1 Πειραματόζωα*

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τρεις ομάδες άσπρων κουνελιών Νέας Ζηλανδίας. Κάθε ομάδα απαρτίζονταν από πέντε ζώα. Η πρώτη ομάδα χρησιμοποιήθηκε σαν ομάδα μαρτύρων και οι υπόλοιπες δύο έλαβαν δύο διαφορετικές δόσεις του εντομοκτόνου στο πόσιμο νερό τους. Πριν την έναρξη του πειράματος τα πειραματόζωα έλαβαν θεραπεία για εξωτερικά και εσωτερικά παράσιτα καθώς και αντιαιμορραγικό εμβόλιο. Είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και ο ημερήσιος κύκλος τους ήταν 12-h φως/σκοτάδι.

Οι δόσεις που χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα ήταν περίπου δέκα φορές κάτω από την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία θανατηφόρα δόση ($LD_{50}$) των 130 mg/kg για την από του στόματος χορήγηση. Η ομάδα υψηλής δόσης ελάμβανε περίπου 15 mg/kg/ημέρα και η ομάδα χαμηλής δόσης ελάμβανε 8 mg/kg/ημέρα. Το εντομοκτόνο χορηγούνταν ημερησίως μέσα σε περίπου 100 ml πόσιμου νερού για τέσσερις μήνες.

***Δειγματοληψία τριχών και αίματος***

Πριν την έναρξη της χορήγησης του εντομοκτόνου ελήφθησαν τρίχες, στο συνολικό τους μήκος από περιοχή της πλάτης των κουνελιών. Οι τρίχες αυτές χρησιμοποιήθηκαν μαζί με αυτές από τα κουνέλια μάρτυρες σαν τυφλά δείγματα και στα πειράματα με φορτισμένα δείγματα για την ανάπτυξη και τελειοποίηση της αναλυτικής μεθόδου.

Μετά το πέρας των τεσσάρων μηνών, στο τέλος της χορήγησης, ελήφθησαν τρίχες από την ίδια περιοχή της πλάτης των κουνελιών στο συνολικό τους μήκος. Τα δείγματα που συλλέξαμε πλύθηκαν με μεθανόλη, στέγνωσαν και αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ανάλυση.

Επίσης συλλέχθηκε αίμα από τις φλέβες του αυτιού σε αποστειρωμένους σωλήνες, χρησιμοποιώντας σύριγγες ινσουλίνης. Μετά τη φυγοκέντρηση για το διαχωρισμό του πλάσματος, πραγματοποιούνταν αμέσως η μέτρηση της ακετυλοχολινεστεράσης του αίματος και το υπόλοιπο δείγμα φυλασσόταν στους –20 $^{0}$C.

### 5.1.2 Υλικά και Μέθοδοι

***Αντιδραστήρια***

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC

grade) προερχόμενοι από τη Merck (New Jersey, USA). Τα εντομοκτόνα diazinon και fenthion ήταν technical grade (98%) και μια γενναιόδωρη προσφορά της Ciba Geigy Hellas Ε.Π.Ε. (Ανθούσα, 153 44 Ελλάδα).

#### *5.1.2.1 Μετρήσεις ακετυλοχολινεστεράσης πλάσματος*

Η δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης του αίματος μετρήθηκε στην αρχή και το τέλος της περιόδου χορήγησης, χρησιμοποιώντας το αντίστοιχο κιτ της Roche (Βασιλεία, Ελβετία). Οι οδηγίες του κιτ για την μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου ακολουθήθηκαν με ακρίβεια. Η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε με τη βοήθεια φασματοφωτόμετρου (Jasco 7800 Model, UV/Vis., Tokyo, Japan) στα 405 nm. Οι φυσιολογικές τιμές για τους ανθρώπους κυμαίνονται μεταξύ 5.300-12.900 U/I. Οι φυσιολογικές τιμές για τα κουνέλια μάρτυρες του πειράματος κυμάνθηκαν μεταξύ 404-500 U/I. Το φωτόμετρο μηδενίστηκε με απεσταγμένο νερό.

#### *5.1.2.2 Εκχύλιση diazinon από τις τρίχες*

Για την επιλογή της πιο κατάλληλης μεθόδου εκχύλισης του εντομοκτόνου από τις τρίχες έγιναν πειράματα χρησιμοποιώντας φορτισμένα δείγματα τριχών. Δοκιμάστηκαν τρεις μέθοδοι. Η όξινη και η βασική υδρόλυση του πρωτεϊνικού υποστρώματος αποδείχθηκαν πολύ δραστικές με αποτέλεσμα να μην ανιχνεύεται ούτε το ίδιο το diazinon στα χρωματογραφήματα, λόγω της διάσπασης του. Η μεθανολική εκχύλιση αποδείχθηκε ότι δεν ήταν τόσο ισχυρή, αλλά ήταν αρκετά αποτελεσματική στην απομόνωση του εντομοκτόνου από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα της τρίχας.

Αρχικά 100 mg τριχών ζυγίστηκαν και ομογενοποιήθηκαν σε ειδικό ομογενοποιητή. Η σκόνη μεταφέρθηκε σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 2 ml μεθανόλης και το εσωτερικό standard (2 ng/mg τελική συγκέντρωση fenthion). Το μείγμα επωάσθηκε στους 37 $^{0}$C όλη τη νύχτα. Ακολούθως το μεθανολικό υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε καθαρό δοκιμαστικό και η μεθανόλη εξατμίστηκε με τη βοήθεια ήπιου ρεύματος αζώτου. Το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 2 ml νερού καθαρότητας HPLC. Ακολούθησε υγρή-υγρή εκχύλιση με 3 ml αιθυλικού ακετυλεστέρα. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε δύο φορές. Οι οργανικές στοιβάδες ενώθηκαν και εξατμίστηκαν με τη βοήθεια ρεύματος αζώτου. Το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 50 μl αιθυλικού ακετυλεστέρα. Ακολούθησε ανάλυση με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (GC-NPD) και αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

#### *5.1.2.3 Ανάλυση με GC-NPD*

Ένα μικρόλιτρο (1 μl) του τελικού διαλύματος εισήχθη με ένεση και αναλύθηκε σε splitless mode, σε χρωματογράφο Carlo Erba GC 6000 Vega Series 2 (Milan, Italy), συνδυασμένο με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ουσιών ήταν τύπου DB-1 30m x 0.32mm τριχοειδής στήλη (J&W Scientific, Folsom, USA). Οι συνθήκες ανάλυσης είχαν ως εξής: Το πρόγραμμα της θερμοκρασίας της στήλης ξεκινούσε στους 180 $^0$C, όπου παρέμενε για 3 min. Αυξανόταν στους 230$^0$C με βήμα 5$^0$C/min, σταθερό για 5 min και τελικά έφτανε τους 265$^0$C, με βήμα 10 $^0$C/min, όπου και παρέμεινε για 15 min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα (injector) ήταν 250$^0$C και του ανιχνευτή 290$^0$C. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με ροή 2,1 ml/min. Κάτω από τις προαναφερόμενες συνθήκες, ο χρόνος έκλουσης για το diazinon ήταν Rt = 25.49 min, και για το fenthion Rt= 33.57 min.

#### *5.1.2.4 Ανάλυση με GC-MS*

Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των προηγούμενων μετρήσεων έγινε με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματογράφο μάζας. Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ανάλυση ήταν το GCQ, της Finnigan Mat (Austin, USA). Οι ουσίες διασπάστηκαν με ηλεκτρονικό ιονισμό. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των ουσιών ήταν τύπου AT- 5 MS (30m x 0.25mm x 0.25μm) τριχοειδής στήλη της Altech (Deerfield, USA). Ήλιο υψηλής καθαρότητας (99.999%) και με γραμμική ταχύτητα 20 cm/sec χρησιμοποιήθηκε σαν το φέρον αέριο. Ένα μικρόλιτρο του τελικού διαλύματος εισήχθη με ένεση σε splitless mode και αναλύθηκε κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης ξεκινούσε από τους 100 $^0$C όπου και παρέμενε για 3 min, αυξανόταν στους 230 $^0$C με βήμα 10$^0$C/min, σταθερό για 2 min, και τελικά αυξάνονταν στους 300$^0$C, με βήμα 20$^0$C/min, όπου και παρέμενε για 2 min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 200$^0$C. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς (transfer line) ήταν 275 $^o$C. Οι παράμετροι που αφορούσαν το φασματογράφο μάζας ήταν οι παρακάτω: Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων (ion source) ήταν 200 $^0$C, η τάσης κρούσης των ηλεκτρονίων ιονισμού (electron impact ionisation) ήταν 70 eV και η τάση του πολλαπλασιαστή σήματος (electron multiplier voltage) ήταν 1200 V. Προκειμένου να κατεβάσουμε τα όρια ανίχνευσης όσο ήταν δυνατό, ο φασματογράφος μάζας ήταν προγραμματισμένος να ανιχνεύει συγκεκριμένα ιόντα (selected ion-monitoring mode ή SIM) τα οποία ορίστηκαν m/z 179 και 304 για το diazinon, και 278 για το fenthion Κάτω από τις προαναφερόμενες συνθήκες ο χρόνος έκλουσης για το diazinon ήταν Rt = 16.14 min, ενώ για το fenthion που ήταν το εσωτερικό standard ήταν Rt=

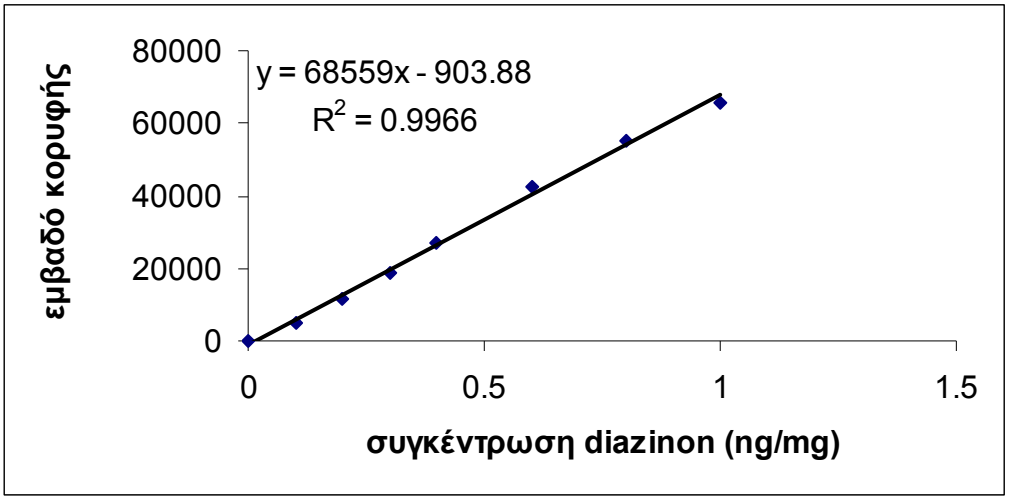
18.63 min.

#### *5.1.2.5 Πειράματα αξιολόγησης της μεθόδου εκχύλισης*

Τα πειράματα αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της μεθόδου εκχύλισης που χρησιμοποιήσαμε έγιναν σε φορτισμένες τρίχες. Η ανάκτηση των υπό ανάλυση ουσιών αξιολογήθηκε πειραματικά σε δυο συγκεντρώσεις. Το diazinon προστέθηκε σε 100 mg καθαρών τριχών, προερχόμενων από τα ζώα μάρτυρες, σε τελικές συγκεντρώσεις 0.6 και 1 ng/mg τριχών. Προετοιμάστηκαν δύο σετ δειγμάτων με τον ακόλουθο τρόπο: Στην πρώτη περίπτωση το εντομοκτόνο μαζί με το εσωτερικό στάνταρ προστέθηκαν στις τρίχες στην αρχή της διαδικασίας εκχύλισης. Στην δεύτερη περίπτωση η διαδικασία της εκχύλισης των τριχών ακολουθήθηκε κανονικά και οι ενώσεις προστέθηκαν στο εκχύλισμα στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας. Τα εκχυλίσματα μετρήθηκαν με GC- NPD. Η ανάκτηση των ουσιών με τη συγκεκριμένη μέθοδο εκχύλισης επί τοις εκατό μετρήθηκε ως εξής: Καταρχήν υπολογίστηκε το πηλίκο της επιφάνειας της κορυφής του diazinon προς την επιφάνεια της κορυφής του εσωτερικού standard, για τα δύο σετ δειγμάτων στις δύο συγκεντρώσεις ξεχωριστά. Ακολούθως διαιρέθηκε το ευρεθέν πηλίκο του πρώτου σετ με το ευρεθέν πηλίκο του δευτέρου σετ για την κάθε συγκέντρωση. Το αποτέλεσμα πολλαπλασιάστηκε επί εκατό (Slawson *et al* 1998). Η τελική τιμή της ανάκτησης εκφράστηκε σαν τη μέση τιμή της επί τοις εκατό ανάκτησης για τις δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις.

$$\%\alpha\nu\acute{\alpha}\kappa\tau\eta\sigma\eta = \frac{\frac{Adiazinon}{Afenthion}a}{\frac{Adiazinon}{Afenthion}b} \times 100$$

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του εντομοκτόνου έγινε με GC-NPD. Ο φασματογράφος μάζας (GC-MS) χρησιμοποιήθηκε μόνο σε επιλεγμένα δείγματα για επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με τη βοήθεια πρότυπης καμπύλης 8 σημείων, η οποία κατασκευάστηκε με μεθανολικά διαλύματα. Η καμπύλη ήταν γραμμική ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0.1 και 1 ng/mg (Εικόνα5.1).




**Εικόνα 5.1:** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης diazinon.

### 5.1.3 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης και των συγκεντρώσεων του diazinon που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες των ζώων στις διαφορετικές ομάδες αναλύθηκαν στατιστικά με Student's t-test. Στατιστικά σημαντικές διαφορές θεωρήθηκαν αυτές που είχαν τιμή p μικρότερη του 0,05.

### 5.1.4 Αποτελέσματα και συζήτηση

Όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα του πίνακα 5.1, υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση στην τιμή της ακετυλοχολινεστεράσης στα ζώα και των δύο ομάδων στα οποία χορηγούνταν εντομοκτόνο, συγκρινόμενα με αυτά της ομάδας μαρτύρων. Οι μέσες τιμές που βρέθηκαν ήταν 468 ± 118 I/U για την ομάδα μαρτύρων, 401 ± 48 I/U για την ομάδα χαμηλής δόσης και 245 ± 68 I/U για την ομάδα υψηλής δόσης. Με εξαίρεση μια μικρή μείωση της δραστηριότητας των ζώων της ομάδας υψηλής δόσης, η μείωση στη δραστηριότητα του ενζύμου δεν έδωσε άλλα εμφανή κλινικά συμπτώματα.

**Πίνακας 5.1** Τιμές ακετυλοχολινεστεράσης αίματος στο τέλος της περιόδου χορήγησης.

| Ομάδα | κουνέλι | Χολινεστεράση I/U | Μέσες τιμές ± S.D. | T-test †τιμή p |
|---|---|---|---|---|
| **μάρτυρες** | **1** | **490 ± 2** | **468±118** | |
| | **2** | **501 ± 6** | | |
| | **3** | **445± 5** | | |
| | **4** | **404 ± 3** | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **5** | **500 ± 10** | | |
| **Χαμηλή** | **1** | **460 ± 8** | **401 ± 48** | **0,046** |
| **Δόση** | **2** | **388 ± 7** | | |
| | **3** | **333± 4** | | |
| | **4** | **427 ± 6** | | |
| | **5** | **397 ± 3** | | |
| **Υψηλή** | **1** | **280 ± 2** | **245±68** | **0,04** |
| **Δόση** | **2** | **430± 3** | | |
| | **3** | **168± 4** | | |
| | **4** | **220± 2** | | |
| | **5** | **127 ± 5** | | |

†Επίπεδα σημαντικότητας για τις ομάδες χαμηλής και υψηλής δόσης συγκρινόμενες με την ομάδα μάρτυρες

n=5

Οι τιμές που δίδονται είναι οι μέσες τιμές τριών μετρήσεων ανά δείγμα. Οι τιμές για τις ομάδες είναι οι μέσες τιμές των διαφορετικών δειγμάτων που απαρτίζουν την ομάδα.

Η ποσοτική ανάλυση τριχών έγινε με GC-NPD (πίνακας 5.2, Εικόνα 5.2), ενώ όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, για επιβεβαίωση των μετρήσεων και ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων, σε συγκεκριμένα δείγματα χρησιμοποιήσαμε GC-MS (Εικόνα 5.3). Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές. Παράλληλα με τα δείγματα μας αναλύθηκαν και δείγματα προερχόμενα από τους μάρτυρες (τυφλά δείγματα) για να αποκλείσουμε παρεμβολές οφειλόμενες στο υπόστρωμα των τριχών.

Η μέση ανάκτηση της μεθόδου εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε ήταν περίπου 69%. Η πρότυπη καμπύλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό ήταν γραμμική ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0.1-1 ng/mg, με τιμή $R^2 = 0.9966$. Η εξίσωση που περιγράφει την καμπύλη ήταν $y = 68559x – 903.88$, όπου y η επιφάνεια της κορυφής του diazinon and x η συγκέντρωση του diazinon σε ng/mg δείγματος (Εικόνα 5.1). Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ήταν 0.05 ng/mg για τις μετρήσεις με GC-NPD.

Η συγκέντρωση του diazinon στις τρίχες των εκτιθέμενων κουνελιών κυμάνθηκε μεταξύ 0.11-0.26 ng/mg δείγματος. Η μέση συγκέντρωση του εντομοκτόνου στις τρίχες της ομάδας χαμηλής δόσης ήταν 0.17 ± 0.05 ng/mg τριχών ενώ η αντίστοιχη για την ομάδα υψηλής δόσης ήταν 0.23 ± 0.02 ng/mg τριχών.

**Πίνακας 5.2** Συγκέντρωση του Diazinon στις τρίχες των κουνελιών στο τέλος της περιόδου χορήγησης, μετρημένη με GC-NPD.

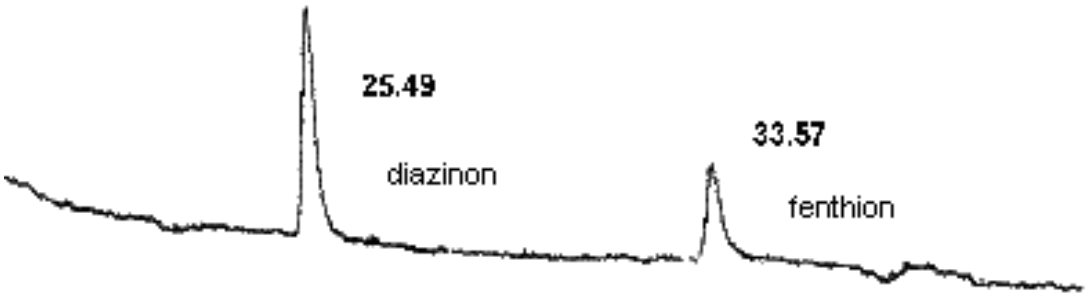
| Κουνέλι | Συγκέντρωση ng/mg τριχών ± S.D. | Μέση τιμή ομάδας ± S.D. | T-test τιμή p † |
|---|---|---|---|
| Μάρτυρες 1-5 | 0 – 0 | 0 | |
| Χαμηλή δόση 1 | 0,14 ± 0,03 | | |
| 2 | 0,16 ± 0.04 | | |
| 3 | 0,24 ± 0.04 | 0,17 ± 0,05 | |
| 4 | 0,11 ± 0.03 | | 0,023 |
| 5 | 0,18 ± 0.05 | | |
| Υψηλή δόση 1 | 0,21 ± 0.02 | | |
| 2 | 0,23 ± 0,05 | | |
| 3 | 0,26 ± 0,04 | 0,23 ± 0,02 | |
| 4 | 0,24 ± 0,03 | | |
| 5 | 0,22 ± 0,02 | | |

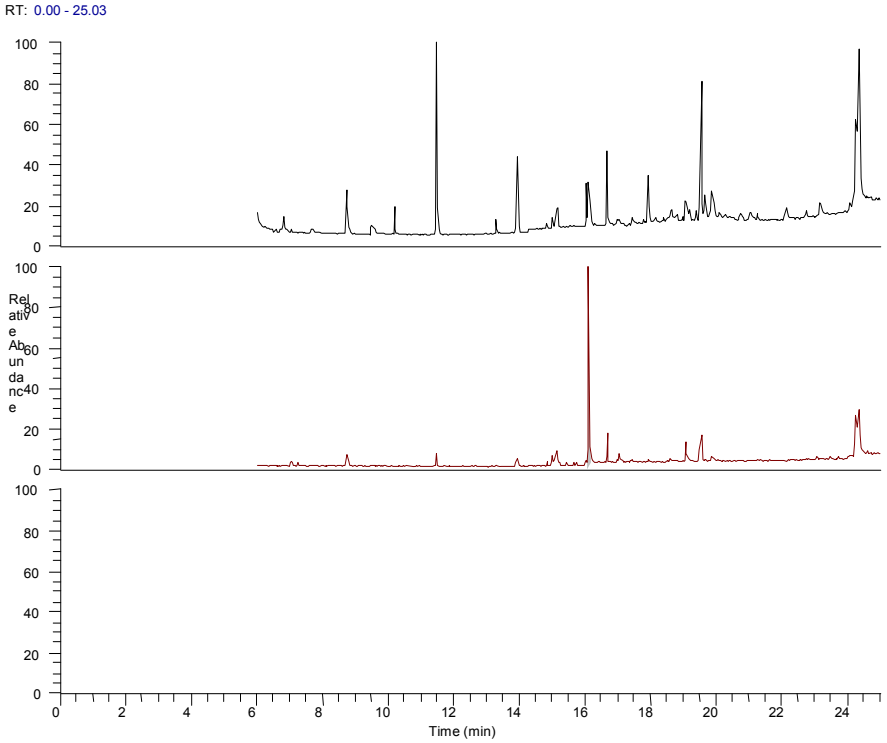
†Επίπεδα σημαντικότητας ανάμεσα στις ομάδες υψηλής και χαμηλής δόσης

n=5

Οι τιμές που δίδονται είναι οι μέσες τιμές τριών μετρήσεων ανά δείγμα.

**Εικόνα 5.2:**GC-NPD χρωματογράφημα δείγματος τρίχας, προερχόμενο από πειραματόζωο της υψηλής ομάδας χορήγησης,






**Εικόνα 5.3***:* GC-MS χρωματογράφημα δείγματος τρίχας

Οι τιμές της δραστηριότητας της χολινεστεράσης του αίματος χρησιμοποιήθηκαν σαν ένας ήδη αποδεκτός δείκτης της τοξίνωσης των πειραματόζωων. Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 1, η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας ήταν στατιστικώς σημαντική και στις δύο ομάδες χορήγησης, και μάλιστα φάνηκε ότι ήταν ανάλογη της χορηγούμενης δόσης.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει έντονο ενδιαφέρον και έχουν γίνει πολλές έρευνες προκειμένου να εξακριβωθεί αν οι τρίχες είναι κατάλληλο υπόστρωμα για την αξιολόγηση της χρόνιας έκθεσης σε πολλές και ποικίλες ουσίες, όπως για παράδειγμα τα ναρκωτικά. Η βιβλιογραφική μας έρευνα αποκάλυψε ότι δεν έχει γίνει μέχρι τώρα καμιά προσπάθεια να αξιολογηθεί η χρόνια έκθεση σε οργανοφωσφορικά ή καρβαμιδικά εντομοκτόνα. Αντίθετα, πολλή δουλειά έχει γίνει για τη μέτρηση βαρέων μετάλλων όπως ο υδράργυρος (Dolbec *et al* 26) και οργανοχλωριομένων ενώσεων όπως το εντομοκτόνο lindane (Neuber *et al*, 1999) και περιβαλλοντικών μολυντών όπως τα PCBs (Covaci *et al*, 2002) στις τρίχες.

Βασικός στόχος της παρούσας μελέτης ήταν καταρχήν να εξακριβωθεί αν το diazinon μπορεί να ανιχνευτεί στις τρίχες μετά από χρόνια έκθεση και αν υπάρχει κάποια σχέση ανάμεσα στη χορηγούμενη για συγκεκριμένη χρονική περίοδο δόση του εντομοκτόνου και στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση στις τρίχες. Το πρώτο βήμα του εγχειρήματος ήταν η ανάπτυξη μιας σχετικά απλής αλλά αξιόπιστης αναλυτικής μεθόδου για την εκχύλιση και τη μέτρηση της συγκέντρωσης του diazinon στις τρίχες. Λάβαμε ολικά δείγματα τριχών από την πλάτη των πειραματόζωων. Τρεις μέθοδοι εκχύλισης του εντομοκτόνου από το υπόστρωμα της τρίχας δοκιμάστηκαν για να βρεθεί η πιο κατάλληλη. Αποδείχθηκε πειραματικά ότι το

diazinon ήταν τόσο ασταθές στην όξινη ή την αλκαλική υδρόλυση του πρωτεϊνικού υποστρώματος ώστε διασπάστηκε ολοκληρωτικά, και δεν έδωσε την παραμικρή κορυφή στα χρωματογραφήματα. Επίσης αποδείχθηκε ότι η πολύωρη επώαση (πάνω από 12 h) στους 40 $^{0}$C ή περισσότερο μείωνε την ανάκτηση του εντομοκτόνου. Η μέθοδος εκχύλισης που περιγράφουμε αποδείχθηκε αρκετά αξιόπιστη και απλή, δίνοντας μια μέση ανάκτηση 69%. Η μεθανόλη είναι αποτελεσματική στο να απομακρύνει τις ενώσεις που μας ενδιαφέρουν από το πρωτεϊνικό υπόστρωμα χωρίς να τις καταστρέφει. Κατά τη υγρή-υγρή εκχύλιση, το περισσότερο εντομοκτόνο μεταφέρθηκε από την υδατική στην οργανική φάση.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε με GC-NPD. Ο ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου είναι ένας επιλεκτικός ανιχνευτής, κατάλληλος για ενώσεις που έχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριο τους. Τα πολύ καθαρά χρωματογραφήματα που πήραμε οφείλονται ακριβώς σε αυτό το γεγονός.

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα, το diazinon μπορεί ανιχνευτεί στις τρίχες των ζώων που εκτέθηκαν σε αυτό. Η συγκέντρωση του εντομοκτόνου που ανιχνεύτηκε στις τρίχες ήταν ανάλογη της χορηγούμενης δόσης. Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν άσπρα, έτσι οι γενικά χαμηλές συγκεντρώσεις που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες μπορεί να αποδοθούν στην απουσία μελανίνης και άρα στον μικρό αριθμό διαθέσιμων θέσεων πρόσδεσης. Η μελέτη της επίπτωσης του χρώματος των τριχών στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του εντομοκτόνου θα είχε ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Μελέτες για άλλες ενώσεις έχουν δείξει ότι το χρώμα των τριχών επηρεάζει την συγκέντρωση της δεσμευμένης ουσίας (Slawson *et al*, 2002, Uematsu *et al*, 1990).

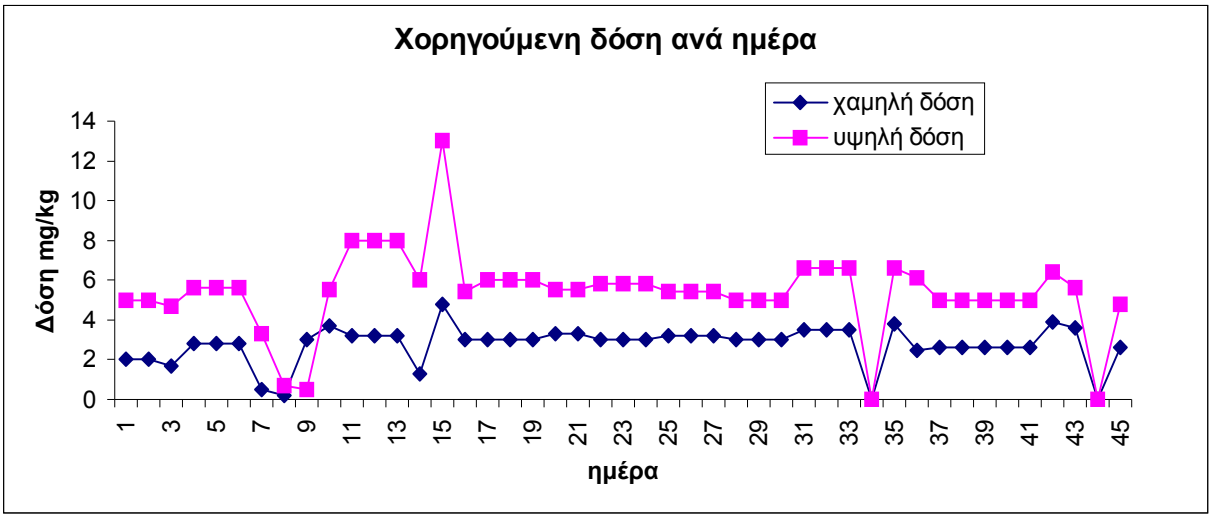
## 5.2 ΜΕΛΕΤΗ ΙΙ: Ανίχνευση του εντομοκτόνου diazinon σε τρίχες άσπρων αρουραίων Sprague-Dawley.

### *5.2.1 Πειραματόζωα*

Τρεις ομάδες άσπρων αρουραίων Sprague-Dawley χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Κάθε ομάδα αποτελούνταν από 5 αρσενικούς αρουραίους, ηλικίας στην αρχή του πειράματος 40 ημερών και βάρους περίπου 400 gr. Η μια ομάδα χρησιμοποιήθηκε σαν ομάδα μαρτύρων και οι υπόλοιπες δύο έλαβαν δύο διαφορετικές δόσεις του εντομοκτόνου στο πόσιμο νερό τους. Ο ημερήσιος κύκλος όλων των πειραματόζωων ήταν 12 h φως/σκοτάδι και είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή. Το βάρος των πειραματόζωων ελεγχόταν μια φορά εβδομαδιαίως και η χορηγούμενη δόση προσαρμοζόταν στο βάρος τους.

Οι δόσεις που χορηγήθηκαν στα πειραματόζωα ήταν τουλάχιστον 100 φορές μικρότερες από την αναφερόμενη στη βιβλιογραφία $LD_{50}$ των 300-400 mg/kg (Kidd and James 1991). Οι δόσεις που έλαβαν τα πειραματόζωα στην διάρκεια των 45 ημερών που κράτησε η χορήγηση φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

.




**Εικόνα 5.4:** Διάγραμμα ημερήσιας χορήγησης εντομοκτόνου για τις ομάδες χαμηλής και υψηλής δόσης

Η μέση χορηγούμενη δόση ανά ημέρα ήταν περίπου 6 mg/kg/day για την ομάδα υψηλής δόσης, η οποία χορηγούνταν μέσα στα 20 ml νερού που κατανάλωνε κατά μέσο όρο ο κάθε αρουραίος. Αντίστοιχα η ομάδα χαμηλής δόσης ελάμβανε περίπου 3 mg/kg/day.

***Δειγματοληψία τριχών***

Πριν την έναρξη της χορήγησης και στο τέλος του πειράματος, όταν είχε αποκατασταθεί το τρίχωμα των αρουραίων, καθαρίστηκε από τις τρίχες το μεγαλύτερο μέρος της πλάτης των ζώων. Τα δείγματα που συλλέχθηκαν αρχικά πλύθηκαν με νερό και μεθανόλη προκειμένου να απομακρυνθεί η εξωτερική επιμόλυνση. Ακολούθως στέγνωσαν στους $40^0$C για 30 min, και αποθηκεύτηκαν σε πλαστικούς κλειστούς περιέκτες σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι την ανάλυση.

### *5.2.2 Αντιδραστήρια*

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και τους προμηθευτήκαμε από τη Merck (New Jersey, USA). Τα εντομοκτόνα diazinon και fenthion ήταν technical grade (98%) και προσφορά της Ciba Geigy Hellas Ε.Π.Ε. (Ανθούσα, 153 44 Ελλάδα).

### *5.2.3 Εκχύλιση του diazinon από τις τρίχες*

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την εκχύλιση του diazinon από τις τρίχες περιγράφεται στη μελέτη Ι, με τις ακόλουθες τροποποιήσεις: Η τελική συγκέντρωση του fenthion που χρησιμοποιήθηκε σαν εσωτερικό standard ήταν 10 ng/mg τριχών. Επίσης προκειμένου να μειωθεί ο χρόνος επώασης των δειγμάτων σε μεθανόλη, η επώαση έγινε σε υδατόλουτρο υπερήχων για 6h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το τελικό διάλυμα που προέκυψε από την συμπύκνωση των συνδυασμένων οργανικών στοιβάδων στα 50 μL αναλύθηκε με GC-MS.

### *5.2.4 Ανάλυση με Negative Chemical Ionization GC-MS (NCI GC-MS)*

Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας με αρνητικό χημικό ιονισμό. Η ανάλυση έγινε σε σύστημα της Finnigan Matt GCQ με παγίδα ιόντων (ion trap). Ο διαχωρισμός έγινε σε τριχοειδή στήλη DB- 5 MSITD (30m x 0.25mm x 0.25μm). Το φέρον αέριο ήταν καθαρό ήλιο με γραμμική ταχύτητα 20 cm/sec. Ένα μικρόλιτρο δείγματος εισήχθη με ένεση σε splittles mode και αναλύθηκε κάτω από τις παρακάτω συνθήκες: Η θερμοκρασία της στήλης ξεκινούσε από 110 $^0$C όπου παρέμενε σταθερή για 4 min, ανέβαινε στους 200 $^0$C με βήμα $10^0$C/min, σταθερή για 3 min, και τελικά έφτανε στους $300^0$C, με βήμα $20^0$C/min, όπου παρέμενε για 2 min. Η θερμοκρασία του injector ήταν $200^0$C. Η θερμοκρασία του transfer line ήταν 275 $^o$C. Οι παράμετροι που αφορούσαν το φασματογράφο μάζας ήταν οι ακόλουθοι: Θερμοκρασία

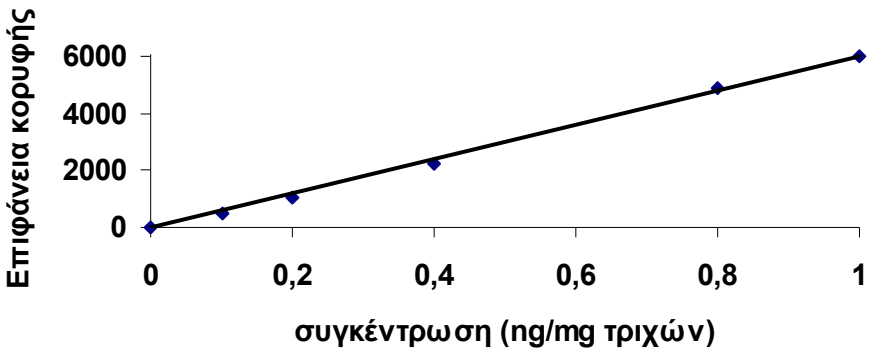
πηγής ιόντων (ion source) 200 $^{0}$C, τάση των ηλεκτρονίων ιονισμού (electron impact ionisation) 70 eV και τάση του πολλαπλασιαστή σήματος (electron multiplier voltage) 1200 V. Προκειμένου να χαμηλώσου τα όρια ανίχνευσης η μάζα λειτουργούσε σε selected ion-monitoring mode (SIM) και ήταν προγραμματισμένη να ανιχνεύει τα ιόντα m/z 169 για το diazinon, και 263 για το fenthion. Ο συνολικός χρόνος για κάθε ένεση ήταν περίπου 30 min. Σαν αέριο ιονισμού χρησιμοποιήθηκε μεθάνιο. Κάτω από τις προαναφερόμενες συνθήκες ο χρόνος έκλουσης για το diazinon ήταν Rt=16.12 min, ενώ για το fenthion που χρησιμοποιήσαμε σαν εσωτερικό standard ήταν Rt=18.57 min.

### *5.2.5 Αξιολόγηση της μεθόδου*

Η αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της χρησιμοποιούμενης μεθόδου έγινε με φορτισμένα δείγματα, με τον ίδιο τρόπο που περιγράφεται στη μελέτη Ι.

***Γραμμικότητα***

Για την μέτρηση των αγνώστων δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε καμπύλη έξι σημείων. Η καμπύλη ήταν γραμμική ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0.0 and 1.0 ng/mg (Εικόνα 5.5).




**Εικόνα 5.5:** Καμπύλη αναφοράς με φορτισμένα δείγματα τριχών

Η ευαισθησία και η επαναληψιμότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε σε SIM mode, χρησιμοποιώντας φορτισμένα δείγματα με δύο γνωστές συγκεντρώσεις εντομοκτόνου, 0.6ng/mg και 1 ng/mg τριχών. Οι αποκλίσεις των μετρήσεων που καταγράφηκαν κατά τη διάρκεια της ίδιας μέρας και σε διαφορετικές μέρες φαίνονται στον πίνακα 5.3. Η απόκλιση μέσα στην μέρα μετρήθηκε αναλύοντας το ίδιο δείγμα 4 συνεχόμενες φορές. Η απόκλιση των μετρήσεων σε διαφορετικές ημέρες εκτιμήθηκε αναλύοντας το ίδιο δείγμα μια φορά ημερησίως για 4 συνεχόμενες ημέρες.

**Πίνακας 5.3** Παράμετροι αξιολόγησης της μεθόδου εκχύλισης και της NCI GC-MS αναλυτικής μεθόδου

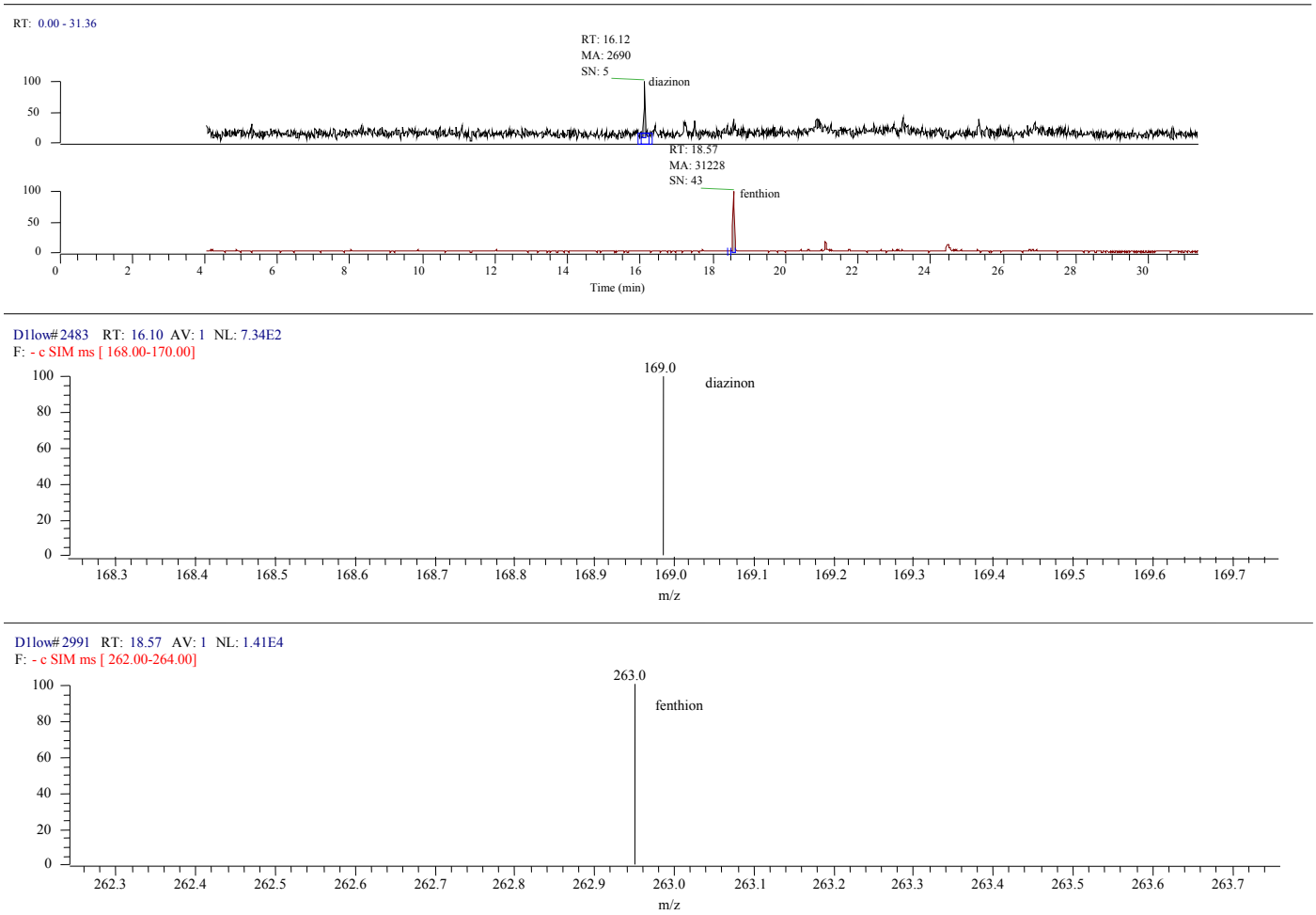
| Συγκέντρωση (ng/mg) φορτισμένων δειγμάτων | Ανάκτηση (%) | Όριο ποσοτικού προσδιορισμού ng/mg | $R^2$ | Ακρίβεια και επαναληψιμότητα Μέση συγκέντρωση (ng/mg) ± S.D. (conc.) n = 4 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Την ίδια μέρα | Διαφορετικές μέρες |
| 1,0 | 73 | 0,1 | 0,9976 | 1,0± 0,14 | 0,95 ± 0,12 |
| 0,6 | 65 | 0,1 | 0,9976 | 0,6 ± 0,09 | 0,50 ± 0,09 |

Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές και οι τιμές που δίδονται είναι οι μέσες τιμές των τριών μετρήσεων ± τυπική απόκλιση. Τυφλά δείγματα από ζώα της ομάδας μαρτύρων αναλύθηκαν επίσης, προκειμένου να εξασφαλιστεί η απουσία παρεμβολών από το υπόστρωμα στον χρόνο έκλουσης του diazinon.

Η ανάκτηση του diazinon ήταν 69.0±4.0 %. Η πρότυπη καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε στον ποσοτικό προσδιορισμό των δειγμάτων ήταν γραμμική ανάμεσα στις συγκεντρώσεις 0.00-1.00 ng/mg με $R^2$ = 0.9976 (Εικόνα 5.5). Το όριο ποσοτικοποίησης ήταν 0.1 ng/mg

**Εικόνα 5.6**

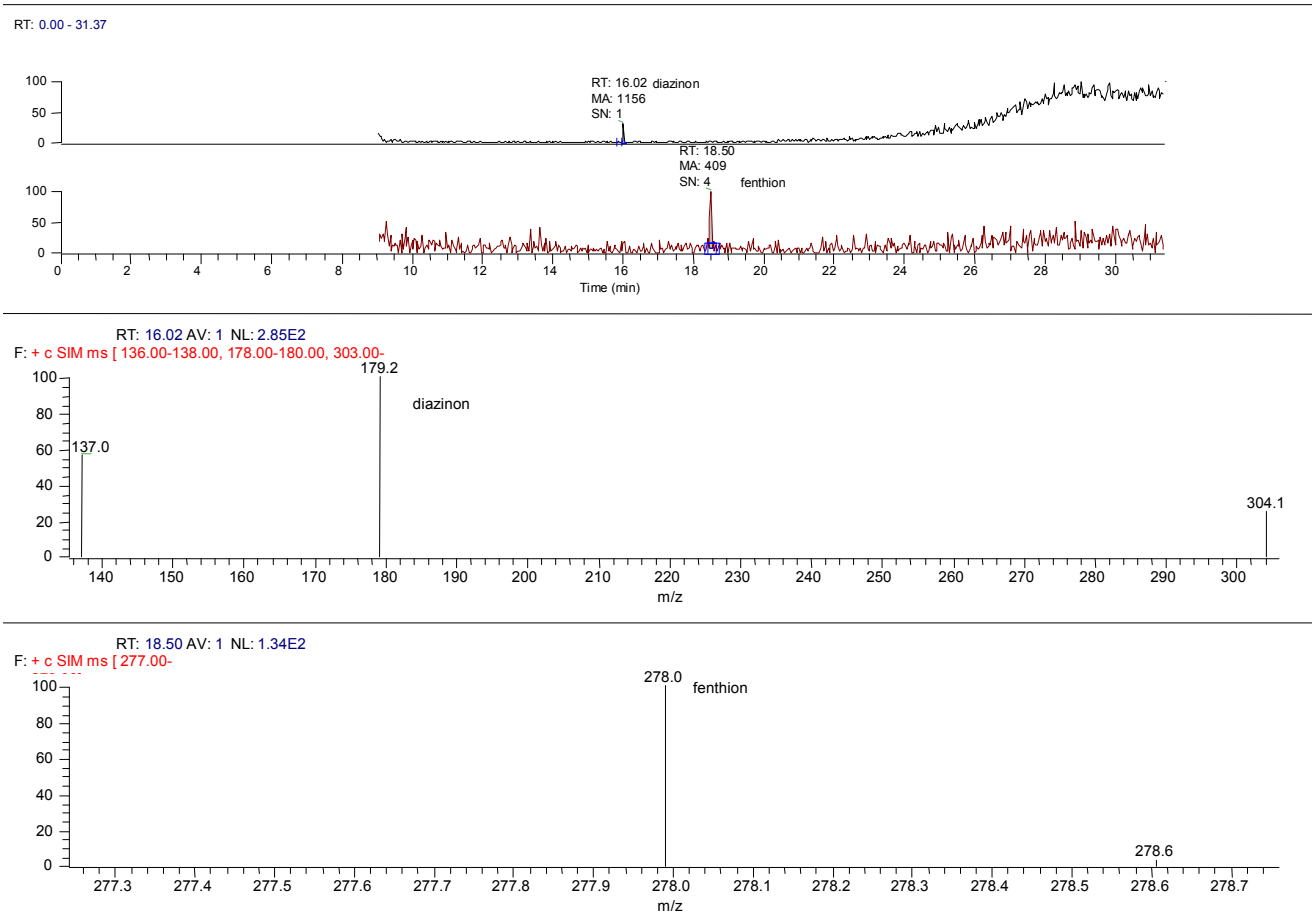
Χρωματογράφημα του δείγματος τριχών του ζώου 1 της χαμηλής δόσης, αναλυμένο με NCI GC-MS.




Μια εικόνα των αποτελεσμάτων φαίνεται στις εικόνες 5.6 και 5.7. Στην εικόνα 5.6 παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα του δείγματος τριχών του ζώου 1 της χαμηλής δόσης, αναλυμένο με NCI GC-MS. Στην εικόνα 5.7 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης του ίδιου δείγματος με ηλεκτρονικό ιονισμό (EI GC-MS).

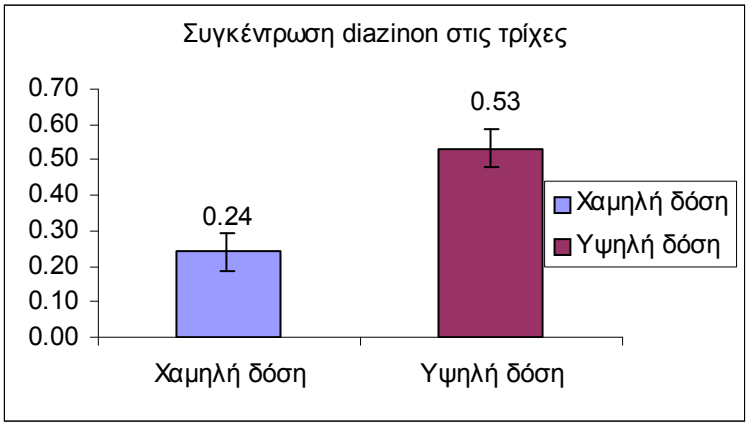
**Εικόνα 5.7**

Χρωματογράφημα του δείγματος τριχών του ζώου 1 της χαμηλής δόσης αναλυμένο με EI GC-MS.




Η συγκέντρωση του diazinon στις τρίχες των πειραματόζωων στα οποία χορηγήθηκε το εντομοκτόνο κυμάνθηκε μεταξύ 0,23-0,61 ng/mg τριχών. Στην ομάδα χαμηλής δόσης η μέση συγκέντρωση diazinon που ανιχνεύτηκε ήταν 0,24 ± 0,01 ng/mg τριχών ενώ η αντίστοιχη συγκέντρωση στην ομάδα υψηλής δόσης ήταν 0,53 ± 0,05ng/mg τριχών (Πίνακας 5.4).

Η διαφορά στις συγκεντρώσεις των τριχών ανάμεσα στα ζώα χαμηλής και υψηλής δόσης αξιολογήθηκε στατιστικά με τον δίπλευρο έλεγχο t ανεξαρτήτων δειγμάτων Η διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικά σημαντική ($t=-12,01$, $df=8$, $p<0,001$). Χρησιμοποιήθηκε επίσης έλεγχος t ενός δείγματος για να διαπιστωθεί εάν οι συγκεντρώσεις της ομάδας χαμηλής δόσης είναι διαφορετικές από τις μηδενικές (ομάδα μαρτύρων). Και σε αυτή την περίπτωση η διαφορά που παρατηρήθηκε ήταν στατιστικά σημαντική. ($t=66,68$, $df=4$, $p<0,001$).




**Εικόνα 5.8***:* Μέσες συγκεντρώσεις diazinon στις τρίχες ανά ομάδα ± st dev

Τα παραπάνω αποτελέσματα επιβεβαίωσαν ότι η συγκέντρωση του diazinon στις τρίχες ήταν δοσοεξαρτώμενη.

**Πίνακας 5.4** Συγκέντρωση diazinon σε τρίχες εκτιθέμενων αρουραίων

| Δείγμα | Συγκέντρωση diazinon ng/mg τριχών | Μέση τιμή ομάδας ng/mg τριχών ± st.dev. |
|---|---|---|
| Ομάδα μάρτυρες | 0 | 0* |
| Χαμηλή δόση | | |
| αρουραίος 1 | 0,24 | |
| αρουραίος 2 | 0,25 | |
| αρουραίος 3 | 0,25 | 0,24 ± 0,01** |
| αρουραίος 4 | 0,24 | |
| αρουραίος 5 | 0,23 | |
| Υψηλή δόση | | |
| αρουραίος 1 | 0,61 | |
| αρουραίος 2 | 0,53 | |
| αρουραίος 3 | 0,47 | 0,53 ± 0,05 |
| αρουραίος 4 | 0,50 | |
| αρουραίος 5 | 0,55 | |

** Σύγκριση μαρτύρων με ομάδα χαμηλής δόσης* ***(p<0,001)***

*** Σύγκριση ομάδων χαμηλής και υψηλής δόσης* ***(p<0,001).***

Η μελέτη έγινε για να βελτιωθεί η μέθοδος ανάλυσης με GC-MS του diazinon στις τρίχες που αναπτύχθηκε στο προηγούμενο πείραμα και για να συγκριθούν οι συγκεντρώσεις του εντομοκτόνου στις τρίχες στις περιπτώσεις που χρησιμοποιούνται ζώα ευαίσθητα στο diazinon, όπως είναι τα κουνέλια και ζώα ανθεκτικά σε αυτό, όπως είναι οι αρουραίοι. Και στα δύο πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ζώα άσπρου χρώματος έτσι οι όποιες διαφορές στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση μπορούν να αποδοθούν στις μεταβολικές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δύο είδη.

Και σε αυτή τη μελέτη δεν πραγματοποιήθηκε τμηματική ανάλυση τριχών. Αυτή τη φορά δεν το επέτρεψε ο τρόπος ανάπτυξης των τριχών στους αρουραίους. Όταν ξυρίστηκαν οι πλάτες των αρουραίων στην αρχή του πειράματος, παρατηρήσαμε ότι οι τρίχες δεν επανέρχονταν με το φυσιολογικό τρόπο. Αντί να μακραίνουν σταδιακά, τρίχες στο τελικό μήκος εμφανίστηκαν στην θέση των ξυρισμένων, και αυτές οι μακριές τρίχες πύκνωναν σταδιακά, μέχρι να επανέλθει η πλάτη των πειραματόζωων στην αρχική μορφή. Το πείραμα έληξε και η πλάτη των πειραματόζωων ξυρίστηκε ξανά σε αυτό το σημείο. Τα δείγματα αναλύθηκαν όπως περιγράφεται παραπάνω.

Η ανάλυση με NCI GC-MS σε SIM mode (Εικόνα 5.6), αποδείχθηκε πολύ πιο ευαίσθητη από την ανάλυση με EI GC-MS σε SIM mode (Εικόνα 5.7). Και στις δύο εικόνες φαίνεται το χρωματογράφημα που έδωσε το δείγμα του ζώου 1 από την ομάδα χαμηλής δόσης. Η διαφορά ενδεχομένως να οφείλεται στη μεγαλύτερη διάσπαση των μορίων που συμβαίνει όταν τα μόρια ιονίζονται με ηλεκτρόνια. Αν και η διαφορά στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ανάμεσα στις δύο μεθόδους ανάλυσης δεν είναι δραματική, είναι σημαντική όταν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός κοντά στο όριο ποσοτικοποίησης (LOQ). Το πρόβλημα με την ανάλυση με NCI GC-MS ήταν ότι δεν υπήρχαν βιβλιοθήκες διαθέσιμες. Επιλύθηκε αναλύοντας υψηλές συγκεντρώσεις (μg/mL) standard διαλυμάτων σε full scan. Οι μάζες που προέκυψαν από κάθε κορυφή χρησιμοποιήθηκαν για ανάλυση σε SIM mode.

Οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες των εκτιθέμενων πειραματόζωων κυμάνθηκαν από 0,23 σε 0,25 ng /mg (μέση τιμή 0,24 ng/mg τριχών) για την ομάδα χαμηλής δόσης, και 0,47-0,61 (μέση τιμή 0,53 ng/mg τριχών) για την ομάδα υψηλής δόσης. Αν οι τιμές αυτές συγκριθούν με τις αντίστοιχες που πήραμε από τη μελέτη με τα άσπρα κουνέλια, είναι φανερό ότι στις τρίχες των αρουραίων ανιχνεύονται πολύ ψηλότερες συγκεντρώσεις, παρόλο που οι αρουραίοι έλαβαν μόνο το 1/3 της δόσης των κουνελιών. Τα κουνέλια ελάμβαναν 15 και 8 mg/kg σωματικού βάρους από το εντομοκτόνο ημερησίως. Η μέση ανιχνευόμενη συγκέντρωση του εντομοκτόνου για τα κουνέλια της ομάδας χαμηλής δόσης

ήταν 0,17ng/mg τριχών, ενώ η αντίστοιχη για τα κουνέλια υψηλής δόσης ήταν 0,23-ng/mg τριχών. Το γεγονός ότι και στις δύο μελέτες χρησιμοποιήθηκαν άσπρα ζώα, αποκλείει την πιθανότητα οι διαφορές στη συγκέντρωση να οφείλονται στο χρώμα και μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ευθύνονται οι μεταβολικές διαφορές που υπάρχουν ανάμεσα στα δύο είδη ζώων. Είναι γνωστό ότι τα κουνέλια μεταβολίζουν πολύ περισσότερο το diazinon στο πολύ τοξικότερο diazoxon. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα από τη μια να είναι περισσότερο ευαίσθητα στην τοξικότητα του diazinon ($LD_{50}$ = 130 mg/kg σωματικού βάρους) από τους αρουραίους ($LD_{50}$ = 300 mg/kg σωματικού βάρους) και από την άλλη να κυκλοφορεί λιγότερο diazinon στο αίμα τους, άρα να ανιχνεύουμε χαμηλότερες συγκεντρώσεις στις τρίχες τους.

### *5.2.6 Συνολική παρουσίαση και συζήτηση των αποτελεσμάτων των μελετών για την ανίχνευση diazinon στις τρίχες πειραματόζωων.*

Οι δυο παραπάνω μελέτες οδήγησαν στην ανάπτυξη τριών μεθόδων ανάλυσης με αέρια χρωματογραφία και διαφορετικά είδη ανιχνευτών. Το ζητούμενο ήταν η ευαίσθητη και επιλεκτική ανίχνευση του diazinon και του fenthion που ήταν το εσωτερικό standard μας μέσα από τις παρεμβολές που δημιουργούσε το υπόστρωμα των τριχών.

Η κατεργασία των δειγμάτων μας περιλάμβανε μεθανολική εκχύλιση και καθαρισμό χρησιμοποιώντας υγρή–υγρή εκχύλιση με αιθυλικό ακετυλεστέρα. Η ανάκτηση των ουσιών κρίθηκε ικανοποιητική. Η μέθοδος όμως είχε το μειονέκτημα ότι επέτρεπε την προετοιμασία περιορισμένου αριθμού δειγμάτων ανά ημέρα.

Η μέθοδος επιλογής για την ανάλυση του diazinon και άλλων οργανοφωσφορικών ήταν η αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη είτε ανιχνευτή αζώτου φωσφόρου (NPD) είτε με φασματογράφο μάζας. Το μειονέκτημα της ανάλυσης με NPD είναι ότι δεν μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των ουσιών από βιβλιοθήκη. Είναι ανάγκη να αναλυθούν ταυτόχρονα και πρότυπες ουσίες και η ταυτοποίηση γίνεται μόνο βάση του Rt. Τα όρια ανίχνευσης όμως που επιτυγχάνονται είναι ιδιαίτερα χαμηλά. Αυτό είναι πολύ χρήσιμο στην περίπτωση της ανάλυσης υπολειμματικών ποσοτήτων φυτοφαρμάκων στις τρίχες.

Η ανάλυση με φασματογράφο μάζας λύνει το πρόβλημα της ταυτοποίησης των ουσιών με τη χρήση βιβλιοθήκης. Αν η ανάλυση γίνεται σε SIM mode, η ταυτοποίηση των ουσιών γίνεται με βάση το Rt και την κορυφή που δίνουν συγκεκριμένα θραύσματα Ο ηλεκτρονικός ιονισμός όμως που συνήθως χρησιμοποιείται δεν δίνει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης σε σχέση με αυτά της ανάλυσης με NPD. Βελτίωση των ορίων ανίχνευσης επιτυγχάνεται με τη χρήση των ειδικών φίλτρων για συγκεκριμένα ιόντα (SIM mode). Στην

ανάλυση με NCI GC-MS ενώ προσφέρει πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης για τα οργανοφωσφορικά που μας ενδιαφέρουν, δεν υπάρχει η δυνατότητα χρήσης βιβλιοθηκών. Συγκρίνοντας τις παραμέτρους των δύο μεθόδων ανάλυσης, EI και NCI,φαίνεται ότι τα όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται με τη δεύτερη μέθοδο ανάλυσης είναι δύο φορές χαμηλότερα σε σύγκριση με αυτά της πρώτης. Η διαφορά ενδεχομένως να οφείλεται στη μεγαλύτερη διάσπαση των μορίων που συμβαίνει όταν τα μόρια ιονίζονται με ηλεκτρόνια. Αν και η διαφορά στα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης ανάμεσα στις δύο μεθόδους ανάλυσης δεν είναι δραματική, είναι σημαντική όταν απαιτείται ποσοτικός προσδιορισμός κοντά στο LOQ.

Και οι δύο μελέτες έδειξαν ότι το diazinon από τη στιγμή που κυκλοφορεί στο αίμα των πειραματόζωων, ακόμη και σε υποτοξικές δόσεις, περνάει και ανιχνεύεται στις τρίχες τους. Οι ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις είναι πολύ μικρές σε σχέση με τη χορηγούμενη δόση, αυτό όμως είναι αναμενόμενο, γιατί η απέκκριση στις τρίχες είναι μόνο μία από τις δευτερεύουσες οδούς αποτοξίνωσης του οργανισμού. Το diazinon μεταβολίζεται κυρίως στο ήπαρ και τα νεφρά και απεκκρίνεται μέσω των κοπράνων και των ούρων.

Η συγκέντρωση του εντομοκτόνου στις τρίχες των πειραματόζωων και στις δύο μελέτες ήταν δοσοεξαρτώμενη. Συγκρίνοντας όμως τις δόσεις που χορηγήθηκαν στα δύο είδη με τις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις βλέπουμε ότι αυτές δεν ήταν ανάλογες. Στις τρίχες των αρουραίων ανιχνεύτηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις από τις τρίχες των κουνελιών παρόλο που τα κουνέλια ελάμβαναν μεγαλύτερες δόσεις. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο διαφορετικό μεταβολικό προφίλ των δυο ειδών, και είναι κάτι που πρέπει να ληφθεί υπ' όψιν σε περιπτώσεις που πρέπει να γίνει συγκέντρωση δόσης και συγκέντρωσης στις τρίχες, ειδικά στους ανθρώπους. Ανάμεσα στο ανθρώπινο είδος υπάρχουν πολλά μεταβολικά προφίλ, και ανθεκτικών και ευάλωτων στην τοξικότητα των υπό εξέταση εντομοκτόνων.

Παρά το γεγονός ότι η χορήγηση του εντομοκτόνου στο νερό των πειραματόζωων δεν μοιάζει με τον τρόπο της ανθρώπινης έκθεσης, έδωσε χρήσιμες πληροφορίες για την συμπεριφορά του εντομοκτόνου στον οργανισμό και ισχυρές θετικές ενδείξεις για τη χρήση των τριχών σαν δείκτη χρόνιας έκθεσης στο diazinon, έχοντας στη διάθεση μας αναλυτική μέθοδο που ανιχνεύει το εντομοκτόνο στα χαμηλά επίπεδα που αναμένονται στις τρίχες.

## 5.3 Μελέτη ΙΙΙ: Πειράματα in vitro με ανθρώπινες τρίχες φορτισμένες με diazinon

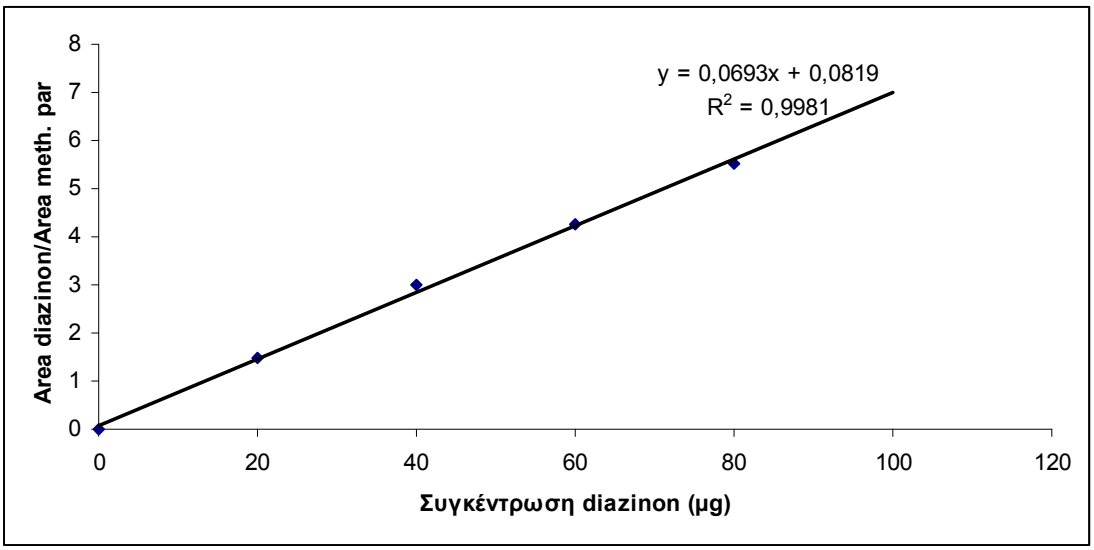
Στις δύο παραπάνω μελέτες εξετάστηκε κατά πόσο το diazinon περνάει από την κυκλοφορία του αίματος στην τρίχα. Η έκθεση όμως των αγροτών δεν είναι μόνο συστηματική Κατά κύριο λόγο η έκθεση τους προέρχεται από το περιβάλλον, κατά τη διάρκεια της εφαρμογής των εντομοκτόνων αν τηρούνται πλημμελώς οι κανόνες ασφάλειας. Για να μελετήσουμε την παθητική πρόσδεση της ουσίας από το περιβάλλον στις τρίχες, πραγματοποιήσαμε τα παρακάτω πειράματα:

### *5.3.1 Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εμβάπτισης των τριχών σε διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης diazinon, στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του εντομοκτόνου στις τρίχες.*

Χρησιμοποιήθηκε διάλυμα συγκέντρωσης 0,01 mg/ml, στο οποίο εμβαπτίστηκαν 100 mg καθαρών (blank) τριχών, προερχόμενα από το ίδιο άτομο, για 1 και 4 h, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Στο τέλος κάθε περιόδου επώασης οι τρίχες, απομακρύνθηκαν από το διάλυμα, στέγνωσαν και κρατήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστούς περιέκτες μέχρι την ανάλυση. Πριν την ανάλυση ξεπλύθηκαν σε μεθανόλη για 2 min για να φύγει η χαλαρά δεμένη ουσία, ομογενοποιήθηκαν και αναλύθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο ανάλυσης με EI GC -MS. Σαν εξωτερικό standard προστέθηκε methyl parathion σε σταθερή συγκέντρωση και ίση με 10μg/ml.

**Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης diazinon**

Για τη μέτρηση της ποσότητας που προσδέθηκε στις τρίχες κατά την εμβάπτισης τους στο διάλυμα του φυτοφαρμάκου ήταν αναγκαία η δημιουργία πρότυπης καμπύλης. Για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν μεθανολικά διαλύματα diazinon τα οποία περιείχαν methyl parathion σε συγκέντρωση 10 μg/ml σαν εσωτερικό standard. Στον άξονα των χ τοποθετήθηκαν οι αυξανόμενες ποσότητες diazinon ενώ στον άξονα των ψ ο λόγος των εμβαδών της κορυφής του diazinon προς αυτού της κορυφής του methyl parathion.




**Εικόνα 5.9:** Πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του diazinon στις τρίχες.

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται τα αποτελέσματα της εμβάπτισης των τριχών σε υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 0,01 mg/ml για 1 h και 4 h.

**Πίνακας 5.5** Ανιχνευόμενη συγκέντρωση diazinon σε τρίχες μετά από εμβάπτιση τους σε υδατικό διάλυμα diazinon συγκέντρωσης 0,01 mg/ml για 1 h και 4 h

| Συγκέντρωση διαλύματος εμβάπτισης (mg/ml) | Χρόνος εμβάπτισης (h) | Ανιχνευόμενη συγκέντρωση diazinon (μg/mg) |
|---|---|---|
| 0,01 | 1 | 0,46 |
| 0,01 | 4 | 2,22 |

### 5.3.2 Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του διαλύματος εμβάπτισης στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του diazinon στις τρίχες.

Ποσότητες δείγματος 100 mg τριχών, προερχόμενες από το ίδιο άτομο, εμβαπτίστηκαν σε υδατικά διαλύματα τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων (0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml και 1 mg/ml) για 1 h. Στο τέλος της τα δείγματα απομακρύνθηκαν από τα διαλύματα επώασης, στέγνωσαν και αναλύθηκαν με EI GC –MS

Στον πίνακα που ακολουθεί φαίνονται οι ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις diazinon στις

τρίχες μετά την εμβάπτιση τους για μια ώρα στα υδατικά διαλύματα των τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων. Χρησιμοποιήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης που κατασκευάστηκε στην προηγούμενη ενότητα.

**Πίνακας 5.**6 Ανιχνευόμενη συγκέντρωση diazinon σε τρίχες μετά από εμβάπτιση τους για 1 h σε διαλύματα τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων.

| Συγκέντρωση υδατικού διαλύματος diazinon (mg/ml) | Χρόνος επώασης (h) | Συγκέντρωση diazinon στις τρίχες (μg/mg) |
|---|---|---|
| 0,01 | 1 | 0,10 |
| 0,1 | 1 | 1,59 |
| 1 | 1 | 3,99 |

Γίνεται εύκολα αντιληπτό από τον παραπάνω πίνακα ότι η συγκέντρωση του διαλύματος εμβάπτισης παίζει ρόλο στην συγκέντρωση του εντομοκτόνου που ανιχνεύεται στις τρίχες. Λογικό είναι κάποια στιγμή να συμβεί κορεσμός, όταν εξαντληθούν οι διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης του εντομοκτόνου στις τρίχες.

### 5.3.3 Μελέτη της επίδρασης του χρώματος των τριχών στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση diazinon

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι το χρώμα των τριχών παίζει ρόλο στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση πολλών ουσιών που έχουν προσδεθεί σε αυτές, ειδικά αν η απορρόφηση της ουσίας γίνεται μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, κατά τη διάρκεια της κερατινοποίησης της τρίχας (Hubbard et al, 2000). Έχει βρεθεί ότι το χρώμα των μαλλιών και κατ' επέκταση η περιεκτικότητα τους σε μελανίνη είναι ανάλογο της ανιχνευόμενης συγκέντρωσης. Η υπόθεση αυτή εξετάστηκε και στην περίπτωση που το diazinon εναποτίθεται στις τρίχες εξωτερικά, από το περιβάλλον, επωάζοντας ανθρώπινες τρίχες διαφορετικού χρώματος σε ίδια συγκέντρωση διαλύματος diazinon για το ίδιο χρονικό διάστημα, και αναλύοντας τις με EI GC-MS. Πιο συγκεκριμένα, πέντε δείγματα ποσότητας 100 mg τριχών κεφαλής προερχόμενα από πέντε διαφορετικά άτομα και με χρώμα από μαύρο έως ξανθό, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα συγκέντρωσης 0,1 mg/ml για 1 h, απομακρύνθηκαν από το διάλυμα, στέγνωσαν και αναλύθηκαν με GC-MS όπως περιγράφεται παραπάνω. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας5.7** Συγκέντρωση diazinon (μg/mg) σε τρίχες διαφορετικού χρώματος που έχουν εμβαπτιστεί σε διάλυμα ίδιας συγκέντρωσης για ίδιο χρόνο.

| Δείγμα | Χρώμα | Ανιχνευόμενη συγκέντρωση (μg/mg) |
|---|---|---|
| 1 | Καστανό (βαμμένο) | 3,3 |
| 2 | Καστανό ανοιχτό | 2,2 |
| 3 | Ξανθό | 0,1 |
| 4 | Μαύρο | 0,03 |

Στην περίπτωση της εναπόθεσης του diazinon στην τρίχα από το περιβάλλον, η περιεκτικότητα της τρίχας σε μελανίνη δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο. Παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ανιχνευόμενων συγκεντρώσεων, που όμως δεν φαίνεται να σχετίζονται αναλογικά με την περιεκτικότητα σε μελανίνη. Αυτό είναι λογικό γνωρίζοντας ότι οι τρίχες εξωτερικά καλύπτονται από μια μεμβράνη η οποία περικλείει το μέρος του στελέχους που φέρει τα μελανοσώματα. Για την πρόσβαση των ουσιών στα μελανοσώματα είναι αναγκαία η καταστροφή της προστατευτικής μεμβράνης. Έτσι άλλοι παράμετροι παίζουν σημαντικότερο ρόλο στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση του εντομοκτόνου. Μια από τις παραμέτρους αυτές μπορεί να είναι η φυσική κατάσταση της τρίχας, αφού βλέπουμε ότι η βαμμένη τρίχα συγκρατεί περισσότερο diazinon. Ίσως η χημική κατεργασία να καταστρέφει την προστατευτική μεμβράνη κάνοντας το στέλεχος της τρίχας πιο πορώδες και άρα να διευκολύνοντας την πρόσδεση του εντομοκτόνου. Μια άλλη παράμετρος μπορεί να είναι η λιπαρότητα της τρίχας. Ίσως οι πιο λιπαρές τρίχες να προσφέρονται περισσότερο για την πρόσδεση του diazinon αυτές. Τέλος, μια άλλη σημαντική παράμετρος δείχνει να είναι η διάμετρος του στελέχους των τριχών. Οι τρίχες με στελέχη μικρής διαμέτρου ίσως να προσφέρουν περισσότερες θέσεις πρόσδεσης από αυτά με μεγαλύτερη διάμετρο.

# 6 ΚΑΡΒΑΜΙΔΙΚΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ: ΤΟ METHOMYL ΩΣ ΜΟΝΤΕΛΟ ΓΙΑ ΤΗΝ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΣΕ ΤΡΙΧΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΩΝ

***Εισαγωγή***

Το methomyl είναι ένα ισχυρό καρβαμιδικό εντομοκτόνο με ευρεία χρήση στην περιοχή της Κρήτης. Κυκλοφορεί σαν υδατικό διάλυμα ή σκόνη με τις εμπορικές ονομασίες NUNDRIN ή LANNATE. Αποικοδομείται από τους ιστούς των φυτών σε διοξείδιο του άνθρακα και ακετονιτρίλιο (Harvey *et al* 1973). Είναι όμως πολύ τοξικό για τα ζώα και τους ανθρώπους και συχνά χρησιμοποιείται σε επιτυχείς κατά κανόνα απόπειρες αυτοκτονίας (Tsatsakis *et al*, 1996).Υπάρχει όμως και σημαντική έκθεση του πληθυσμού σε υποτοξικές δόσεις του methomyl κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής τους ενασχόλησης με τις καλλιέργειες. Αυτού του είδους η έκθεση δεν έχει μελετηθεί επαρκώς. Σχεδιάστηκε λοιπόν η παρακάτω μελέτη, προκειμένου να διαπιστωθεί αν ενδύκνειται η χρήση των τριχών σαν δείκτες χρόνιας έκθεσης στο methomyl, όταν το εντομοκτόνο εισέρχεται στην τρίχα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος.

## 6.1 ΜΕΛΕΤΗ IV: Ανίχνευση methomyl σε τρίχες κουνελιών Νέας Ζηλανδίας

### *6.1.1 Πειραματόζωα*

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν σαν πειραματόζωα άσπρα κουνέλια Νέας Ζηλανδίας. Τα ζώα παραχωρήθηκαν στο εργαστήριο από το κουνελοτροφείο του Ιδρύματος Άγιος Σπυρίδωνας στον Κρουσσώνα Ηρακλείου. Πριν την έναρξη του πειράματος τα κουνέλια εξετάστηκαν από κτηνίατρο, τους χορηγήθηκε προληπτικά τετρακυκλίνη και τους δόθηκε θεραπεία για τα εσωτερικά και εξωτερικά παράσιτα. Τέλος τους χορηγήθηκε αντιαιμορραγικό εμβόλιο. Τα πειραματόζωα είχαν ελεύθερη πρόσβαση σε τροφή και νερό.

***Δοσολογία***

Το εντομοκτόνο methomyl χορηγήθηκε στα πειραματόζωα μέσω του πόσιμου νερού για τέσσερις μήνες. Κάθε δόση αποτελούνταν από 30-40 mg methomyl διαλυμένα σε 1,5 l νερού τα οποία καταναλώνονταν σε περίπου τέσσερις μέρες. Η χορήγηση του εντομοκτόνου διακόπτονταν για 2 μέρες κάθε φορά που τα πειραματόζωα παρουσίαζαν σημεία δηλητηρίασης, η οποία διαπιστώνονταν είτε εργαστηριακά από πτώση στις τιμές της ακετυλοχολινεστεράσης, είτε από μειωμένη φυσική δραστηριότητα. Η συνολική ποσότητα

methomyl που καταναλώθηκε μέσα στους τέσσερις μήνες του πειράματος ήταν περίπου 600 mg. Το βάρος των πειραματόζωων κατά τη διάρκεια του πειράματος ήταν περίπου 5 kg. Η μέση ημερήσια δόση εντομοκτόνου ανά κιλό σωματικού βάρους η οποία χορηγήθηκε στα πειραματόζωα ήταν 2 mg/kg/day.

### *6.1.2 Μέτρηση ακετυλοχολινεστεράσης*

Στην αρχή και κατά τη διάρκεια του πειράματος σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνονταν αίμα από το αυτί του κουνελιού για τη μέτρηση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης. Περίπου 1 ml αίματος λαμβάνονταν με τη βοήθεια σύριγγας ινσουλίνης. Το αίμα φυκεντρούνταν αμέσως για να διαχωριστεί ο ορρός. Αν η ανάλυση δεν γινόταν αμέσως, οι ορροί φυλάσσονταν στους –20$^0$C. Η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου έγινε φωτομετρικά με τη βοήθεια kit της Boehringer Mannheim. Οι φυσιολογικές τιμές για τους ανθρώπους κυμαίνονται από 3.000 – 12.000 U/I, ενώ για τα κουνέλια κυμαίνονται από 300-600 U/I.

### *6.1.3 Συλλογή δειγμάτων τριχών*

Τα δείγματα των τριχών ελήφθησαν από συγκεκριμένα τμήματα της πλάτης των πειραματόζωων, κατά τη διάρκεια και στο τέλος της περιόδου χορήγησης. Οι τρίχες που συλλέχθηκαν στο τέλος του πειράματος κόπηκαν σε τρία τμήματα, 1, 2, και 3 εκατοστά από την κορυφή και αναλύσαμε κάθε τμήμα χωριστά για να βρεθεί η συγκέντρωση του methomyl. Τα δείγματα φυλάχτηκαν σε πλαστικά δοχεία σε θερμοκρασία δωματίου και ξηρή ατμόσφαιρα μέχρι την ανάλυση.

### *6.1.4 Εκχύλιση εντομοκτόνου*

Η μέθοδος εκχύλισης που ακολουθήθηκε ήταν η τροποποιημένη των Cone και συνεργατών (Cone *et al* 1993). Χρησιμοποιήθηκαν 50 mg δείγματος από το κάθε τμήμα. Το δείγμα ζυγίστηκε με ακρίβεια και κονιορτοποιήθκε σε Minibead Cell disrupter (Biospec Products Inc, Barkesville). Η σκόνη που προέκυψε μεταφέρθηκε σε καθαρό δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 2 ml μεθανόλης. Το μείγμα επωάσθηκε στους 40 $^0$C για 18h. Ακολούθησε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο δοκιμαστικό σωλήνα. Η μεθανόλη εξατμίστηκε με τη βοήθεια ήπιου ρεύματος αζώτου και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 2 ml απεσταγμένου νερού. Ακολούθησε εκχύλιση στερεής φάσης (SPE extraction) σε στηλάκια $C_{18}$ (Supelco, 500 mg, 6 ml) τα οποία είχαν προηγουμένως ενεργοποιηθεί με 6 ml

μεθανόλης ακολουθούμενα από 6 ml απεσταγμένου νερού. Φορτώθηκε το δείγμα, το στηλάκι πλύθηκε με 6 ml νερό και στέγνωσε με ήπιο ρεύμα αζώτου. Τελικά, το εντομοκτόνο εκχυλίστηκε με 1 ml διχλωρομεθανίου, το οποίο εξατμτίστηκε και το υπόλειμμα διαλύθηκε ξανά σε 200 μl απεσταγμένο νερό για να αναλυθεί με ανοσοδιαγνωστικές μεθόδους (ELISA).

### *6.1.5 Μέτρηση επιπέδων methomyl στις τρίχες με ανοσοχημική μέθοδο (ELISA)*

Το A00196 Rapid Assay Immunoassay Test kit της Ohmicron (Ohmicron Environmental Diagnostics, Inc. Newtown, USA) για την ανίχνευση methomyl χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των επιπέδων του methomyl στις τρίχες. Διακόσια πενήντα μικρόλιτρα δείγματος ή standard αναμίχθηκαν σε κατάλληλους δοκιμαστικούς σωλήνες με 250 μl ενζύμου συζευγμένου με methomyl. Στο μείγμα προστέθηκαν 500 μl διαλύματος παραμαγνητικών σωματιδίων με τα αντισώματα για το εντομοκτόνο. Οι σωλήνες αφού αναδεύτηκαν σε vortex επωάσθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min. Μεταφέρθηκαν σε μαγνητικό διαχωριστικό υποδοχέα δοκιμαστικών σωλήνων όπου παρέμειναν για 2 min. Ακολούθως απορρίφθηκαν τα υγρά περιεχόμενα των σωλήνων. Σε όλους προστέθηκε 1 ml διαλύματος πλυσίματος. Οι σωλήνες αφέθηκαν στο μαγνητικό διαχωριστικό υποδοχέα για 2 ακόμη λεπτά και το υγρό τους περιεχόμενο απορρίφθηκε ξανά. Το βήμα αυτό επαναλήφθηκε άλλη μια φορά. Ο υποδοχέας απομακρύνθηκε από το μαγνητικό διαχωριστή και 0,5 ml χρωματικού διαλύματος προστέθηκε σε όλους τους σωλήνες. Μετά από ισχυρή ανάδευση σε vortex το διάλυμα επωάσθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Αφού προστέθηκε 0,5 ml διαλύματος που σταματά την αντίδραση μετρήθηκε η απορρόφηση στα 450 nm.

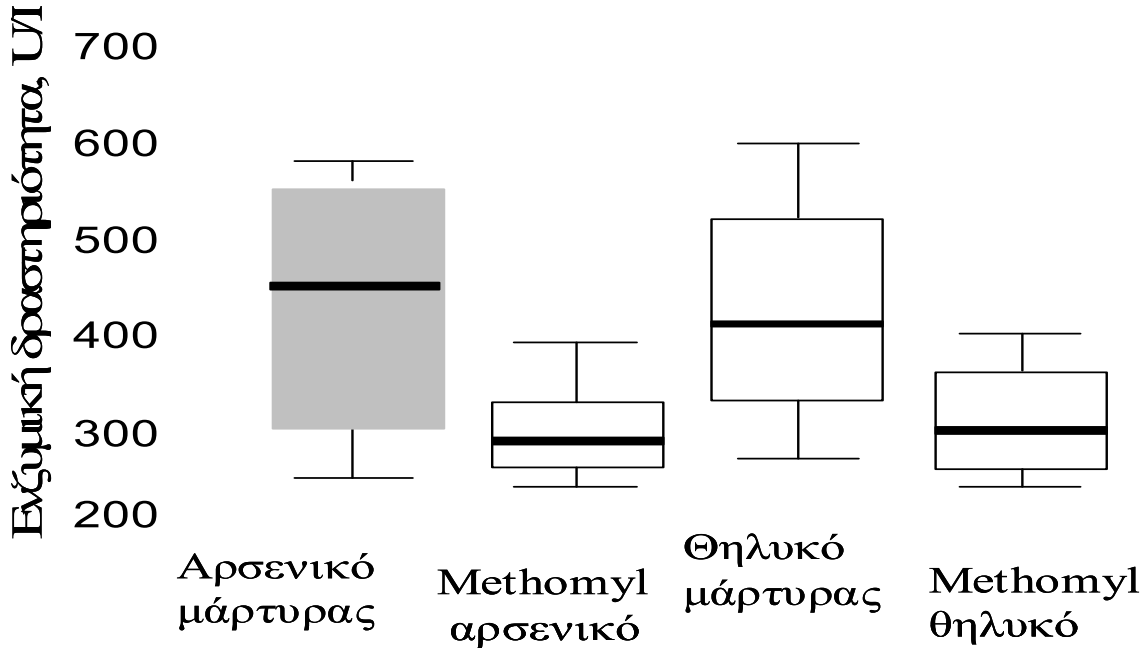
Παρόλο που η ανάλυση του methomyl με ELISA στις τρίχες ήταν επιτυχής, δεν ίσχυσε το ίδιο με τα υπόλοιπα εντομοκτόνα (diazinon και fenthion) που εξετάστηκαν. Ο συνδυασμός της έλλειψης ειδικού αντισώματος με τον πολύ υψηλό θόρυβο εξαιτίας του υποστρώματος δεν επέτρεψε την χρησιμοποίηση της μεθόδου αυτής για περαιτέρω αναλύσεις.

### *6.1.6 Μέτρηση επιπέδων methomyl στις τρίχες με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)*

Το δείγμα των τριχών (500 mg) επωάστηκε σε 4 ml μεθανόλης όπως περιγράφεται παραπάνω και μετά την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη το υπόλειμμα επαναδιαλύθηκε σε 1 ml απεσταγμένου νερού. Το methomyl απομονώθηκε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) σε στηλάκια $C_{18}$ (Supelco, 500 mg, 6 ml).

Η ανάλυση έγινε σε Spectra Physics Model SP8810 υγρό χρωματογράφο εξοπλισμένο με Model 7125 20 μl injector και SP 8450 UV-Vis ανιχνευτή, ρυθμισμένο στα 254 nm. Χρησιμοποιήθηκε C8 στήλη αντίστροφης φάσης. Ο διαλύτης έκλουσης ήταν μίγμα νερού 92,5: ακετόνης 7,5 με ροή 1 ml/min. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ανάλυσης, ο χρόνος έκλουσης του methomyl ήταν 11,64 min.

**Εικόνα 6.1:** Ενζυμική δραστηριότητα της ακετυλοχολινεστεράσης στα πειραματόζωα




### *6.1.7 Μέτρηση της δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης*

Η δραστηριότητα του ενζύμου μειώθηκε αισθητά στα δηλητηριασμένα ζώα. Πιο συγκεκριμένα στο αρσενικό δηλητηριασμένο κουνέλι κυμάνθηκε μεταξύ 240-390 U/I (μέση τιμή =298 U/I). Στο θηλυκό δηλητηριασμένο κουνέλι το αντίστοιχο εύρος ήταν 240-400 U/I (μέση τιμή=310 U/I). Οι τιμές της ακετυλοχολινεστεράσης στα ζώα μάρτυρες ήταν μεταξύ 250-580 με μέση τιμή 430 U/I στο αρσενικό ζώο, και μεταξύ 270-600 U/I με μέση τιμή 426 U/I στο θηλυκό ζώο.

### 6.1.8 Επίπεδα methomyl στις τρίχες

Η συγκέντρωση του methomyl που μετρήθηκε σε συνολικό δείγμα τριχών από ζώα μάρτυρες ήταν μηδενική. Στα δηλητηριασμένα ζώα έγινε τμηματική ανάλυση στα τρία τμήματα του ενός εκατοστού που προέκυψαν. Η μέση συγκέντρωση του εντομοκτόνου στις

τρίχες των δηλητηριασμένων ζώων ήταν 4,3 ng/mg στο αρσενικό κουνέλι και 1,4 ng/mg δείγματος στο θηλυκό κουνέλι. Στο παλαιότερο τμήμα τριχών, ένα εκατοστό από την κορυφή δεν ανιχνεύτηκε καθόλου methomyl σε κανένα από τα δηλητηριασμένα ζώα. Στο μεσαίο τμήμα, δηλαδή στο δεύτερο εκατοστό από την κορυφή ανιχνεύτηκαν περίπου 0,9 ng/mg τριχών και στα δύο ζώα, ενώ στο τρίτο εκατοστό από την κορυφή, δηλαδή στο τμήμα της ρίζας ανιχνεύτηκαν 3 ng/mg δείγματος. Τα αποτελέσματα φαίνονται συνοπτικά στους πίνακες 1 και 2.

**Πίνακας 6.1:** Συγκέντρωση methomyl στις τρίχες των δηλητηριασμένων κουνελιών

| **Κουνέλι** | **Εύρος συγκέντρωσης (ng/mg)** | **Μέση συγκέντρωση (ng/mg)** |
|---|---|---|
| Αρσενικός μάρτυρας | Μ.α. | Μ.α. |
| Αρσενικό δηλητηριασμένο | 1,1-1,8 | 1,3 |
| Θηλυκός μάρτυρας | Μ.α. | Μ.α. |
| Θηλυκό δηλητηριασμένο | 0,9-1,8 | 1,4 |

Μ.α.: μη ανιχνεύσιμο

Οι τιμές αντιστοιχούν σε τουλάχιστον 6 μετρήσεις διαφορετικών δειγμάτων.

**Πίνακας 6.2:** Τμηματική ανάλυση τριχών με ELISA και HPLC(*).

| **Κουνέλι** | **Συγκέντρωση methomyl (ng/mg)** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 εκατοστό από κορυφή | | 2 εκατοστά από κορυφή | | 3 εκατοστά από κορυφή | |
| | ELISA | HPLC | ELISA | HPLC | ELISA | HPLC |
| Αρσενικός μάρτυρας | Μ.α. | Μ.α*. | Μ.α. | Μ.α.* | Μ.α. | Μ.α.* |
| Αρσενικό δηλητηριασμένο | Μ.α. | Μ.α*. | 0,7 | 0,9* | 3,5 | 3,2* |
| Θηλυκός μάρτυρας | Μ.α. | Μ.α*. | Μ.α. | Μ.α.* | Μ.α. | Μ.α.* |
| Θηλυκό δηλητηριασμένο | Μ.α. | Μ.α*. | 1,1 | 0,9* | 3,1 | 3,6* |

Μέσες τιμές από τουλάχιστον 6 μετρήσεις

* Μ.α. μη ανιχνεύσιμο

Οι τιμές της ενζυμικής δραστηριότητας της ακετυλοχολινεστεράσης παρουσίασαν πτώση κατά τη διάρκεια της χορήγησης, χωρίς αυτό να συνοδεύεται από σοβαρά κλινικά συμπτώματα. Είναι γνωστό (Tsatsakis et al, 1996a, b) πως η τοξική δράση του methomyl και των υπόλοιπων καρβαμιδικών οφείλεται βασικά στην αναστολή της χολινεστεράσης, άρα η πτώση των επιπέδων στα πειραματόζωα που ελάμβαναν το methomyl ήταν αναμενόμενη (Εικόνα 6.1).

Όσον αφορά τα επίπεδα του εντομοκτόνου στις τρίχες, δεν ανιχνεύτηκε καθόλου εντομοκτόνο στο πιο απομακρυσμένο από τη ρίζα τμήμα της τρίχας, κάποια ποσότητα, περίπου 0,8 ng/mg υπήρχε στο μεσαίο τμήμα και το περισσότερο methomyl, περίπου 3,4 ng/mg, ανιχνεύτηκε στο τμήμα της ρίζας. Και οι δυο μέθοδοι μέτρησης που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν το ίδιο προφίλ αποτελεσμάτων (Πίνακας 6.2). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι το methomyl απορροφάται από την τρίχα και εγκλωβίζεται σε αυτήν σε συγκεκριμένα τμήματα του στελέχους. Η παραπάνω υπόθεση υποστηρίζεται από τη διαφορά των συγκεντρώσεων του εντομοκτόνου στα τρία τμήματα στα οποία χωρίστηκαν οι τρίχες. Στο παλαιότερο τμήμα, που αντιστοιχεί στην χρονική περίοδο κατά την οποία τα πειραματόζωα δεν ελάμβαναν methomyl, δεν ανιχνεύεται καθόλου εντομοκτόνο, ενώ η μεγαλύτερη συγκέντρωση ανιχνεύεται στο τμήμα που είναι πιο κοντά στη ρίζα, δηλαδή στο πιο πρόσφατο και εκείνο όπου η συγκέντρωση του methomyl στον οργανισμό του πειραματόζωου και άρα στο αίμα του είναι η μεγαλύτερη. Επίσης διαφαίνεται ότι το methomyl προσδένεται σε κάποιο συστατικό του στελέχους της τρίχας, όπως είναι τα λιπίδια ή η κερατίνη, και δεν μεταναστεύει κατά μήκους του στελέχους (Cone et al, 1996).

Τα αποτελέσματα μας (πίνακας 6.1) δείχνουν ότι μόνο ένα μικρό μέρος από την χορηγούμενη δόση και άρα την ποσότητα που κυκλοφορεί στο αίμα δεσμεύεται στην τρίχα.. Η απουσία της μελανίνης ίσως μείωσε τις διαθέσιμες θέσεις πρόσδεσης για το methomyl (Cone et al 1996). Πειράματα σε ζώα όπου μελετήθηκε η πρόσδεση της χλωρπρομαζίνης σε τρίχες κουνελιών και της οφλοξασίνης σε τρίχες ινδικών χοιριδίων, έδειξαν ότι μεγαλύτερη ποσότητα των ουσιών προσδένεται σε χρωματιστές τρίχες παρά σε άσπρες (Cone et al 1996, Uematsu et al, 1990, Forrest et al 1972). Η μελανίνη λοιπόν προσφέρει πολλές θέσεις πρόσδεσης στις τρίχες σε πολλές χημικές ουσίες. Μελέτες σε ανθρώπους όπου εξετάστηκε η πρόσδεση πολλών ναρκωτικών σε τρίχες Αφρικανικού, Καυκάσιου και Μογγολοειδούς τύπου, συμφώνησαν με τις μελέτες στα πειραματόζωα. Τρίχες με υψηλή περιεκτικότητα σε μελανίνη συγκρατούν μεγαλύτερες ποσότητες ναρκωτικών ουσιών από τις πιο ανοιχτόχρωμες (Cone et al 1990).

Η παρούσα μελέτη σχεδιάστηκε έτσι ώστε να είμαστε σίγουροι ότι η μόνη οδός έκθεσης των πειραματόζωων στο methomyl ήταν από το αίμα, μια και η ουσία υπήρχε μόνο στο πόσιμο νερό και όχι στο περιβάλλον. Ο μόνος τρόπος εξωτερικής εναπόθεσης της ουσίας στην τρίχα του ζώου, θα ήταν αν το κουνέλι μετέφερε το εντομοκτόνο από το νερό στο σώμα του. Παίρνοντας όμως το δείγμα από ένα σημείο της πλάτης του ζώου, η εξωτερική μόλυνση μπορούσε να αποκλειστεί.

Αυτή η προκαταρκτική μελέτη είναι μέρος μιας μεγαλύτερης έρευνας με στόχο τη

διερεύνηση της δυνατότητας της χρήσης της ανάλυσης τριχών για την αξιολόγηση της χρόνιας επαγγελματικής έκθεσης σε φυτοφάρμακα. Βέβαια πριν γίνουν ασφαλείς προεκτάσεις των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μας σε ανθρώπους, πρέπει να ερευνηθούν μια σειρά από παράγοντες. Η επαγγελματική έκθεση συμβαίνει μέσω διαφόρων οδών, οι πιο σημαντικές από τις οποίες είναι η εισπνοή και η απευθείας εναπόθεση των χημικών στις τρίχες. Τέλος ο ρυθμός ανάπτυξης και αντικατάστασης των τριχών είναι επίσης δύο παράγοντες που πρέπει να μελετηθούν, καθώς είναι πολύ διαφορετικοί στον άνθρωπο και στο κουνέλι.

# 7 ΕΠΙΜΟΝΟΙ ΟΡΓΑΝΟΧΩΡΙΟΜΕΝΟΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΜΟΛΥΝΤΕΣ ΣΕ ΤΡΙΧΕΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΔΙΑΦΟΡΩΝ ΠΕΡΙΟΧΩΝ

## Εισαγωγή

Έχοντας μελετήσει τη συμπεριφορά του diazinon σαν χαρακτηριστικού εκπροσώπου της οικογένειας των οργανοφωσφορικών και του methomyl σαν χαρακτηριστικού εκπροσώπου της οικογένειας των καρβαμιδικών, όσον αφορά την ανίχνευση τους στις τρίχες, το επόμενο ερώτημα που έπρεπε να απαντηθεί ήταν ποια μπορεί να είναι η συμπεριφορά ενώσεων σταθερών και λιπόφιλων, οι οποίες λόγω των παραπάνω ιδιοτήτων τους έχουν την τάση να βιοσυσωρεύονται, ειδικά σε ιστούς με κάποια περιεκτικότητα σε λίπος. Για τη μελέτη αυτή που παρουσιάζεται αναλυτικά παρακάτω, εκπονήθηκαν *in vitro* πειράματα σε ανθρώπινες τρίχες προερχόμενες από κατοίκους βιομηχανικών και γεωργικών περιοχών. Αρχικά έγινε σύγκριση ανάμεσα σε τρίχες προερχόμενες από τρεις διαφορετικές χώρες (Ρουμανία, Ελλάδα, Βέλγιο), ενώ αργότερα έγινε σύγκριση ανάμεσα σε τρίχες προερχόμενες από την Ελλάδα και το Λίβανο, και ανάμεσα σε τρίχες προερχόμενες από κατοίκους μιας μεγάλης περιοχής της Κρήτης, απασχολούμενους σε τρία διαφορετικά ήδη αγροτικής ενασχόλησης. Οι ουσίες που επιλέχθηκαν για τη μελέτη αυτή είναι το εντομοκτόνο DDT και κάποιοι χαρακτηριστικοί μεταβολίτες του, το εντομοκτόνο εξαχλωροκυκλοεξάνιο και κάποια μέλη της οικογένειας των πολυχλωριομένων διφαινυλίων.

## 7.1 ΜΕΛΕΤΗ V: Μελέτη χρόνιας έκθεσης ανθρώπων σε συγκεκριμένες επίμονες οργανοχλωριομένες ενώσεις

### *Αντιδραστήρια*

Τα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα α-, β-, γ- ισομερή του εξαχλωροκυκλοεξανίου (HCHs), τα o,p'-DDE, o,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDD και p,p'-DDT (τα οποία τα εκφράζουμε σαν τα DDTs) και το εξαχλωροβενζόλιο (HCB). Τα ακόλουθα ισομερή των πολυχλωριομένων διφαινυλίων (PCB congeners αριθμοί IUPAC) εξετάστηκαν επίσης: 28, 52, 99, 101, 118, 138, 149, 153, 156, 170, 180 και 187. Τα PCB 46, PCB 143 και ε-HCH χρησιμοποιήθηκαν σαν εσωτερικά standards ενώ το 1,2,3,4-tetrachloronaphthalene (TCN) σαν standard ανάκτησης. Όλα τα

standards διαλυμένα σε ισο-οκτάνιο σε συγκέντρωση 10 ng/μl τα προμηθευτήκαμε από Dr. Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Germany). Οι αραιώσεις που έγιναν για να καλύψουν όλες τις προβλεπόμενες συγκεντρώσεις των οργανοχλωριομένων στις ανθρώπινες τρίχες έγιναν με ισοοκτάνιο. Όλα τα διαλύματα αποθηκεύτηκαν στους -20$^{o}$C μέχρι τη χρήση τους.

Το εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο (DCM) και το ισοοκτάνιο που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας και προέρχονταν από τη Merck (Darmstadt, Germany). Όλοι οι διαλύτες ελέγχθηκαν για την παρουσία χρωματογραφικών παρεμβολών με συγκέντρωση από τα 15 ml στα 50 μl και ανάλυση με GC-ECD. Το υδροχλωρικό οξύ περιεκτικότητας 37%, και το πυκνό θειικό οξύ 95-97%, ήταν αναλυτικού βαθμού (Merck). Όλες οι υδατικές αραιώσεις έγιναν με δις απεσταγμένο νερό. Το άνυδρο θειικό νάτριο για υπολειμματική ανάλυση, το βασικό οξείδιο του αλουμινίου 70-230 Mesh όπως και το silica gel 60-200 Mesh (Merck) θερμάνθηκαν στους 120$^{o}$C για όλη τη διάρκεια της νύχτας πριν τη χρήση. Τα κενά στηλάκια για SPE των 5 ml που χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο βήμα καθαρισμού των δειγμάτων τα προμηθευτήκαμε από τη Supelco (Bellefonte, PA, USA).

### *7.1.1 Δειγματοληψία*

Δείγματα τριχών κεφαλής συλλέχθηκαν από το πίσω μέρος της κεφαλής, προερχόμενα από Ελληνίδες (n=30) με επαγγελματική έκθεση σε εντομοκτόνα. Οι γυναίκες αυτές είχαν απασχοληθεί στο παρελθόν σε θερμοκήπια, αμπέλια ή καλλιέργειες ελιάς. Η διάρκεια της συνολικής τους έκθεσης κυμαινόταν από 2 μέχρι 35 χρόνια. Επίσης συλλέχθηκαν δείγματα τριχών από υγιείς ανθρώπους χωρίς επαγγελματική έκθεση σε εντομοκτόνα οι οποίοι διέμεναν στο Βέλγιο (n=10) στη Ρουμανία (n=2) και στην Ελλάδα (n=5).

### *7.1.2 Μεθοδολογία*

Διακόσια (200) mg κομμένων σε τμήματα του 1 mm τριχών από το κάθε δείγμα ζυγίστηκαν με ακρίβεια και φορτίστηκαν με 5 ng των εσωτερικών standards (PCB 46 και PCB 143). Ακολούθησε ολονύκτια επώαση στους 40°C σε δύο ml 3N HCl. Το επόμενο βήμα ήταν υγρή-υγρή εκχύλιση με 2 x 3 ml εξάνιο: DCM (4:1). Οι οργανικές στοιβάδες από τις δύο εκχυλίσεις ενώθηκαν και καθαρίστηκαν με SPE σε στηλάκια που ήταν γεμισμένα από τον πάτο στην κορυφή με 250 mg αδρανοποιημένης αλουμίνας (10% νερό), 500 mg οξινισμένης silica και 250 mg άνυδρου $Na_2SO_4$. Το τροποποιημένο silica gel παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται παρακάτω: Σε 50 g silica gel, προστέθηκαν σταγόνα - σταγόνα 27 ml πυκνού θειικού οξέος ενώ το μείγμα αναδεύονταν συνεχώς για να πετύχουμε ομοιογένεια. Το μείγμα

της οξινισμένης σίλικας αναδεύτηκε για 30 επιπλέον min μετά την ολοκλήρωση της προσθήκης του θειικού οξέως.

Πριν την προσθήκη του δείγματος το στηλάκι προπλύθηκε με 2 ml εξανίου: DCM (1:1, v/v) και 2 ml εξανίου. Το δείγμα εκλούστηκε με 4 ml εξανίου. Το τελικό έκπλυμα συγκεντρώθηκε σε περίπου 50 μl κάτω από απαλό ρεύμα αζώτου, φορτίστηκε με 5 ng standard ανάκτησης (1,2,3,4-tetrachloronaphthalene -TCN) και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο χρωματογραφίας για ανάλυση.

### *7.1.3 Οργανολογία*

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριας χρωματογραφίας 6890 της Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) με ECD ανιχνευτή και εξοπλισμένο με 25m x 0,25mm x 0,25μm, HT-8 (SGE, Zulte, Belgium) 1,7-dicarba-closo-dodecarborane 8%phenyl methyl polysiloxane τριχοειδή στήλη. Ήλιο με σταθερή ροή 1,0 ml/min χρησιμοποιήθηκε σαν το φέρον αέριο, ενώ μείγμα $Ar/CH_4$ (95:5) με ροή 40 ml/min χρησιμοποιήθηκε σαν make-up gas. Δύο μl εισήχθησαν στο σύστημα σε pulsed splitless mode (πίεση παλμού = 20 psi, χρόνος παλμού = 1 min) με το split outlet να ανοίγει μετά από 1 min. Οι θερμοκρασίες του injector και του ανιχνευτή ήταν 270$^{o}$C και 320$^{o}$C, αντίστοιχα. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της HT-8 στήλης ξεκινούσε από τους 90$^{o}$C σταθερό για 1 min, μετά με βήμα 15$^{o}$C/min ανέβαινε στους 180$^{o}$C, σταθερό για 1 min, μετά ανέβαινε στους 250$^{o}$C με βήμα 3$^{o}$C/min και τελικά με βήμα 25$^{o}$C/min στους 300$^{o}$C, όπου παρέμενε σταθερό για 6 min.

Για την ανάλυση με φασματογράφο μάζας ένας Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) 6890 GC συνδέθηκε απευθείας με γραμμή μεταφοράς (direct interface) με HP 5973 φασματογράφο μάζας. Η στήλη διαχωρισμού ήταν μια 25m x 0,25mm x 0,25μm, DB-1 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) methyl polysiloxane τριχοειδής στήλη. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο με σταθερή ροή 1,0 ml/min. Η θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν στους 270$^{o}$C. Δύο μl εισήχθησαν με ένεση σε pulsed splitless mode (πίεση παλμού =20 psi, χρόνος παλμού = 1 min) με το διακόπτη (split outlet) να ανοίγει μετά από 1 min. Η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς (interface) ήταν 285$^{o}$C. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της DB-1 στήλης ξεκινούσε από τους 90$^{o}$C, παρέμενε σταθερό για 1 min και με βήμα 15$^{o}$C/min ανέβαινε στους 275$^{o}$C, όπου παρέμενε για 10 min.

Οι παράμετροι που αφορούσαν το φασματογράφο μάζας ήταν: θερμοκρασία πηγής ιόντων 200°C, ενέργεια ιονισμού 70 eV (electron impact ionisation) και τάση πολλαπλασιαστή 2000 V. Τρία ιόντα (δύο από το μοριακό cluster $M^+$ και $[M+2]^+$ καθώς και

το $[M-70]^+$ ιόν) καταγράφηκαν για κάθε επίπεδο χλωρίωσης για τα PCBs ή για κάθε εντομοκτόνο. Οι χρόνοι έκλουσης οι μάζες και η σχετική abundance των confirmation ions προς το quantification ion χρησιμοποιήθηκαν σαν κριτήρια ταυτοποίησης. Μια απόκλιση στα πηλίκα των ιόντων της τάξης του ±20% από την θεωρητική τιμή ήταν αποδεκτή.

### *7.1.4 Αξιολόγηση μεθόδου*

Η συγκέντρωση που δίδεται για κάθε ένωση είναι η μέση τιμή των μετρήσεων που πήραμε από δύο διαφορετικές στήλες. Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα των ενώσεων σε ισο-οκτάνιο. Όλες οι καμπύλες είχαν καλή γραμμικότητα με $r^2>0,99$ για το αναμενόμενο εύρος των συγκεντρώσεων στα δείγματα. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε βάση του χρόνου έκλουσης (Rt) σε σχέση με αυτόν των εσωτερικών standard. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων έγινε διαιρώντας την επιφάνεια της κορυφής της υπό εξέταση ένωσης προς την επιφάνεια της κορυφής του πλησιέστερου εσωτερικού standard. Τα ευρισκόμενα πηλίκα παραστάθηκαν γραφικά με τον χ άξονα να έχει τις συγκεντρώσεις. Η ανάκτηση των εσωτερικών standards υπολογίστηκε διαιρώντας την επιφάνεια της κορυφής των standard προς αυτήν της κορυφής του standard ανάκτησης.

***Ανάκτηση***

Η προτεινόμενη μέθοδος εκχύλισης ελέγχθηκε για την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιώντας φορτισμένα δείγματα. Οι ανακτήσεις των υπό διερεύνηση ουσιών υπολογίστηκαν αφού αφαιρέθηκαν οι τιμές των συγκεντρώσεων των ενδογενών ουσιών. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι αφού η μόλυνση με τις ουσίες αυτές είναι παγκόσμια, δεν υπάρχουν απολύτως τυφλά δείγματα. Οι υπολογιζόμενες ανακτήσεις ήταν όλες αποδεκτές και μεγαλύτερες του >85% με σχετική απόκλιση μικρότερη του 12% (Πίνακας 7.1).

**Πίνακας 7.1**. Όρια ανίχνευσης, εύρος γραμμικότητας και ανακτήσεις των υπό διερεύνηση ουσιών με την προτεινόμενη μέθοδο.

| **Ένωση** | **Όριο ανίχνευσης (LoD)** (ng/g) | | **Γραμμικότητα** | **Συγκέντρωση φόρτισης** | **Ανάκτηση** **Μέσες τιμές** ± SD | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **ECD** | **MS** | (ng/g hair) | (ng/g hair) | Μέση ανάκτηση (%) | SD |
| **HCB** | 1 | 1,5 | 1-20 | 10 | 93 | 8 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **PCBs** | 0,5 | 1 | 0,5-30 | 10 | 91-111 | 12 |
| **DDTs** | 1 | 2 | 1-1000 | 25 | 91-112 | 10 |
| **HCHs** | 1 | 10 | 1-100 | 25 | 65-83 | 12 |

Τα δείγματα των κομμένων τριχών φορτίστηκαν με διαλύματα των ενώσεων σε εξάνιο. Ακολούθως ο διαλύτης αφέθηκε να εξατμιστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάκτηση υπολογίστηκε μετά την ανάλυση τριών διαφορετικών δειγμάτων για κάθε συγκέντρωση φόρτισης.

Δοκιμάστηκαν διάφορες τεχνικές εκχύλισης πριν καταλήξουμε στην προτεινόμενη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ολονύκτια επώαση των τριχών στους 40°C με υδροχλωρικό οξύ έδινε καθαρότερα χρωματογραφήματα από τις επωάσεις με βάσεις, ένζυμα ή άλλα οξέα. Επίσης έδινε μεγαλύτερη ανάκτηση των εσωτερικών standards και των υπολοίπων υπό ανάλυση ουσιών. Η υγρή-υγρή εκχύλιση έδωσε μεγαλύτερη ανάκτηση των εσωτερικών standards σε σύγκριση με την εκχύλιση στερεής φάσης. Πιθανόν αυτό να οφείλεται στο ότι μετά την επώαση των λιπόφιλων ουσιών σε υδατικά διαλύματα αυτές δεν ελευθερώνονται στο διάλυμα και άρα δεν είναι διαθέσιμες για να αντιδράσουν με τη στερεή φάση στην SPE. Ο περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος σε στήλη SPE αποτελούμενη από συνδυασμό αδρανοποιημένης αλουμίνας και οξινισμένης σίλικας μείωσε δραματικά τις παρεμβολές από λιπίδια και άλλες ενώσεις από το εκχύλισμα. Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε σε δύο στήλες διαχωρισμού, διαφορετικής πολικότητας. Αποδείχθηκε (Covaci, 2000b) ότι στις στήλες HT-8 ή DB-1 που τελικά χρησιμοποιήθηκαν υπήρχαν λιγότερες αλληλοεπικαλύψεις κορυφών από διαφορετικές ενώσεις, από στην DB-5 (η στήλη που χρησιμοποιείται στα περισσότερα εργαστήρια για την ανάλυση των οργανοχλωριομένων). Από τους δύο ανιχνευτές που χρησιμοποιήθηκαν, ο ECD προσέφερε χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, ενώ MS μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και σιγουριά στην ταυτοποίηση των ουσιών. Έτσι η χρήση και των δύο κρίθηκε απαραίτητη στην ανάλυση αληθινών δειγμάτων. Οι ανακτήσεις όλων των ουσιών που μας ενδιέφεραν από φορτισμένα δείγματα κρίθηκαν ικανοποιητικές. (>85%) με σχετική απόκλιση των τιμών μικρότερη του 12%. Τα όρια ανίχνευσης υπολογίστηκαν για κάθε ένωση ξεχωριστά και κυμάνθηκαν ανάμεσα στα 0,3 και 2 ng/g hair (Covaci, 2000b). Δεν υπήρχε απόκλιση στις τιμές της συγκέντρωσης των οργανοχλωριομένων που προέρχονταν από κομμένες ή κονιορτοποιημένες τρίχες, οπότε στις αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν κομμένες τρίχες με τη λιγότερο επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων. Τυφλά δείγματα χρησιμοποιούμενων αντιδραστηρίων

αναλύθηκαν επίσης και δεν βρέθηκαν κρίσιμες παρεμβολές, στους χρόνους έκλουσης των υπό ανάλυση ουσιών. Τυφλά δείγματα ανθρώπινων τριχών δεν είναι δυνατό να υπάρξουν εξαιτίας της παγκόσμιας μόλυνσης. Η προτεινόμενη μέθοδος αποδείχθηκε σχετικά απλή, η χρήση οργανικών διαλυτών εξαιρετικά περιορισμένη, (όχι πάνω από 15 ml οργανικού διαλύτη) και αποτελεσματική (μπορούν να αναλυθούν μέχρι 50 δείγματα /χημικό ανά ημέρα).

### *7.1.5 Σύγκριση του προφίλ και των συγκεντρώσεων οργανοχλωριωμένων μολυντών σε τρεις Ευρωπαϊκές χώρες.*

Η αξιολόγηση της μόλυνσης με οργανοχλωριομένα σε δείγματα προερχόμενα από τρεις διαφορετικές Ευρωπαϊκές χώρες (Βέλγιο, Ελλάδα και Ρουμανία) έγινε με την ανάλυση τριχών κεφαλής Για τα PCB 28, 101 και το o,p'-DDD όλες οι μετρήσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Για τα PCB 52, 99, 118, 149, 156 και 187, HCB, α-HCH, β-HCH, o,p'-DDE o,p'-DDT και p,p'-DDD, κάποιες μετρήσεις ήταν πάνω από το όριο ανίχνευσης. Για τον υπολογισμό των μέσων συγκεντρώσεων, οι μετρήσεις που ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκαν σαν μηδενικές.

Εύκολα φαίνεται ότι τα DDTs (σύνολο των ισομερών του DDT) ήταν από τους κύριους επιμολυντές των ανθρώπινων τριχών (Πίνακας 7.2). Τα DDTs και HCHs (σύνολο των α-, β- και γ- HCH) είχαν υψηλότερες συγκεντρώσεις στα Ελληνικά δείγματα, ίσως εξαιτίας μιας πιο πρόσφατης απαγόρευσης της χρήσης των συγκεκριμένων εντομοκτόνων ενώ οι συγκεντρώσεις των PCBs ήταν υψηλότερες στα Βελγικά δείγματα εξαιτίας της πιο προχωρημένης εκβιομηχάνισης. (Πίνακας 7.2). Η μόλυνση από οργανοχλωριομένα των Ελληνικών δειγμάτων οφείλονταν βασικά στα οργανοχλωριομένα εντομοκτόνα (>95%), ενώ τα Βελγικά δείγματα περιείχαν 29% PCBs (Εικόνα 7.1). Τα ποσοστά των HCHs ήταν παρόμοια και στις τρεις χώρες (28, 34 και 31% για τα Ελληνικά, τα Ρουμάνικα και τα Βελγικά δείγματα αντίστοιχα).

**Πίνακας 7.2. Συγκεντρώσεις οργανοχλωριομένων μολυντών (ng/g τριχών) σε δείγματα τριχών από την Ελλάδα, τη Ρουμανία και το Βέλγιο.**

| Συγκέντρωση (ng/g τριχών) | Ελλάδα (n=35) | | Ρουμανία (n=2) | | Βέλγιο (n=10) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Μέση τιμή ± SD (5-95%)[a] | Εύρος | Μέση τιμή | Εύρος | Μέση τιμή ± SD (5-95%) | Εύρος |
| **HCB** | 0,5 ± 0,6 | nd[b]-2,6 | 0,9 | nd-1,3 | 0,9 ± 0,6 | nd-3,3 |
| **A-HCH** | 1,4 ± 1,2 | nd-5,2 | 3,5 | 2,4-4,6 | 1,5 ± 1,2 | nd-2,8 |
| **B-HCH** | 6,1 ± 4,7 | nd-16,3 | 12,0 | 11,7-12,3 | 3,5 ± 1,9 | 1,7-7,7 |
| **Γ-HCH** | 33,8 ± 17,0 | 18-73,7 | 16,3 | 9,8-22,8 | 9,6 ± 10,5 | 2,7-36,6 |
| **Σ- HCH** | **40,8 ± 14,7** | **21,8-95,2** | **31,8** | **24,5-39,1** | **14,7 ± 10,9** | **6,0-40,8** |
| **o,p'-DDE** | 20,2 ± 23,1 | nd–453,1 | Nd | Nd | Nd | nd |
| **p,p'-DDE** | 37,6 ± 13,4 | 18-127,4 | 37,5 | 23,6-51,4 | 10,5 ± 7,9 | 2,1-278,7 |
| **p,p'-DDD** | 4,2 ± 3,7 | nd-17,3 | Nd | Nd | 2,3 ± 1,6 | nd-5,8 |
| **o,p'-DDT** | 5,9 ± 3,6 | nd-14,4 | 3,8 | 3,4-4,2 | 2,2 ± 1,0 | nd-3,6 |
| **p,p'-DDT** | 22,0 ± 12,2 | 5-43,6 | 7,9 | 4,8-11 | 5,9 ± 4,3 | 2,4-13,6 |
| **Σ DDTs** | **101 ± 41,4** | **12,3-754,2** | **52,2** | **34,8-69,6** | **18,8 ± 12,5** | **8,7-301,8** |
| **Σ PCBs[c]** | **5,2 ± 5,9** | **nd-17,6** | **10,2** | **10,0-10,4** | **13,7 ± 18,1** | **nd - 44,7** |

[a] – % εύρος

[b]nd – μη ανιχνεύσιμο

[c]σύνολο των PCB 99, 118, 138, 149, 153, 170 και 180.

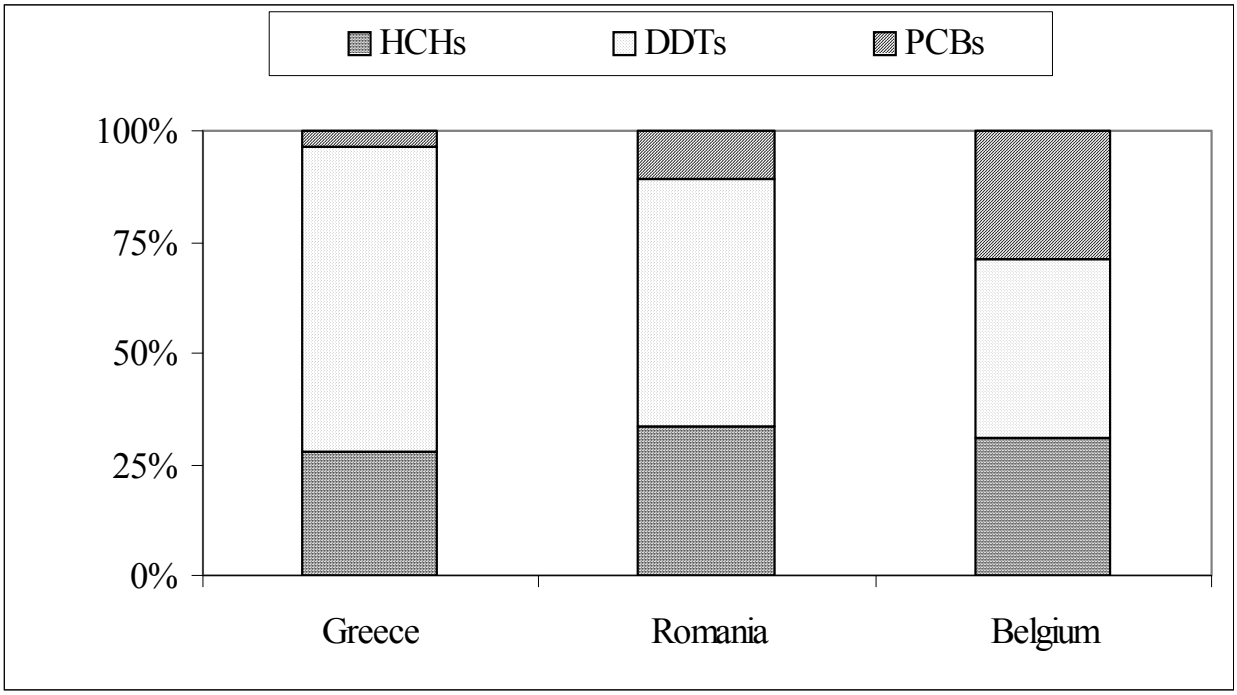
Η μέση τιμή του πηλίκου p,p'-DDT/p,p'-DDE ήταν υψηλότερη στην Ελλάδα από αυτήν στις δύο άλλες χώρες (Εικόνα 7.2). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την πιθανότητα πιο πρόσφατης χρήσης technical DDT που περιέχει p,p'- και o,p'-DDT. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από την παρουσία στα Ελληνικά δείγματα συγκεντρώσεων έως και 453 ng/g τριχών του o,p'-DDE, ενός μεταβολίτη του o,p'-DDT, με μικρότερο χρόνο ημιζωής από το p,pυ'-ισομερές. Υψηλότερα πηλίκα p,p'-DDE/σύνολοDDTs (μέχρι και 0,71 σε Ρουμάνικες τρίχες) υποδεικνύουν παρελθούσα έκθεση σε DDT.

Το lindane (γ-HCH) ήταν το κύριο ισομερές των HCH που ανιχνεύτηκε στα δείγματα τριχών (έως και το 82% των συνολικών HCHs στα Ελληνικά δείγματα). Το πηλίκο γ-HCH/σύνολο HCHs δίνει μια ιδέα για το χρόνο έκθεσης και τα μείγματα των HCH που έχουν χρησιμοποιηθεί. Έτσι η υψηλή τιμή του πηλίκου στα Ελληνικά δείγματα μπορεί να εξηγηθεί από την πρόσφατη χρήση καθαρού lindane, ενώ οι χαμηλότερες τιμές που δίνουν τα Βελγικά και τα δείγματα από τη Ρουμανία, υποδεικνύουν παρελθούσα έκθεση και χρήση technical

lindane (με υψηλό ποσοστό του λιγότερο σταθερού ισομερούς α-HCH). Επιπλέον το β-HCH, το πιο σταθερό από τα ισομερή των HCH, δίνει μια ένδειξη του χρόνου έκθεσης στα HCHs. Η υψηλή τιμή του πηλίκου β-HCH/σύνολοHCHs (0,4 και 0,3 για τα δείγματα από τη Ρουμανία και τα Βελγικά δείγματα αντίστοιχα) δείχνει παρελθούσα έκθεση σε technical lindane.

Οι παρόμοιες τιμές του πηλίκου PCB 153/σύνολοPCBs στα δείγματα και των τριών χωρών (Εικόνα 7.2) δείχνει τον ίδιο τρόπο και πηγή της μόλυνσης με PCBs (έκθεση μέσω δίαιτας). Πρέπει να σημειωθεί ότι η χαμηλότερη τιμή του πηλίκου στα Βελγικά δείγματα (0,19 και 0,26 στα Ελληνικά δείγματα) οφείλεται στην ανίχνευση μεγαλύτερου αριθμού ισομερών και μεγαλύτερων συγκεντρώσεων PCBs (Πίνακας 7.2, πίνακας 7.4). Εύκολα φαίνεται (Εικόνα 7.3) ότι τα προφίλ των PCBs στα Ρουμάνικα και στα Βελγικά δείγματα είναι σχεδόν όμοια και διαφέρουν σε κάποια σημεία από το προφίλ που έδωσαν τα Ελληνικά δείγματα. Οι διαφορές είναι πιο έντονες στα PCB 118 και 149 γιατί κάποιες από τις μετρήσεις ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης στα Ελληνικά δείγματα.

**Εικόνα 7.1**. Σχετική συνεισφορά των PCBs, HCHs και DDTs στη συνολική επιβάρυνση με οργανοχλωριομένα στις τρεις χώρες




### 7.1.6 Ελληνικά δείγματα

Η επίδραση που μπορεί να έχουν οι διάφορες τεχνικές περιποίησης των μαλλιών,

όπως για παράδειγμα η βαφή, αξιολογήθηκε σε ελληνικά δείγματα τα οποία προέρχονταν από γυναίκες με επαγγελματική έκθεση σε εντομοκτόνα και για τα οποία ξέραμε ότι ήταν βαμμένα. Οι συγκεντρώσεις όλων των υπό διερεύνηση ουσιών ήταν χαμηλότερες, οι διαφορές τους όμως από τα φυσικά μαλλιά δεν ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 7.3), υποδεικνύοντας ότι η δομική ακεραιότητα και άρα η προσροφητικές ικανότητες των τριχών αλλοιώνονται με τη βαφή. Έτσι οι ενώσεις δεν απορροφώνται εύκολα στο υπόστρωμα της τρίχας, και αν γίνει αυτό, προσδένονται χαλαρά. Επίσης πολλές ουσίες μπορεί να καταστρέφονται κατά τη διαδικασία της βαφής, στην οποία χρησιμοποιείται υπεροξείδιο του υδρογόνου και αλκαλικές συνθήκες.

Από την ανάλυση των ίδιων δειγμάτων προέκυψε ότι τα HCHs βρέθηκαν να είναι σημαντικά ($p<0,05$) υψηλότερα σε ανθρώπους με επαγγελματική έκθεση σε φυτοφάρμακα, συγκρινόμενα με αυτούς που δεν είχαν καμία έκθεση. Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες όσον αφορά τα DDTs. Δεν βρέθηκε συσχέτιση ανάμεσα στο χρόνο επαγγελματικής έκθεσης και στις συγκεντρώσεις των HCHs ή των DDTs. Δεν υπήρχαν όμως πληροφορίες για τον τύπο των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνταν κατά τη διάρκεια της επαγγελματικής έκθεσης. Τέλος δεν υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις των DDTs και των HCHs στις τρίχες των Ελληνίδων που εξετάστηκαν και στην συχνότητα εμφάνισης καρκίνου (4 δείγματα από τα 30).

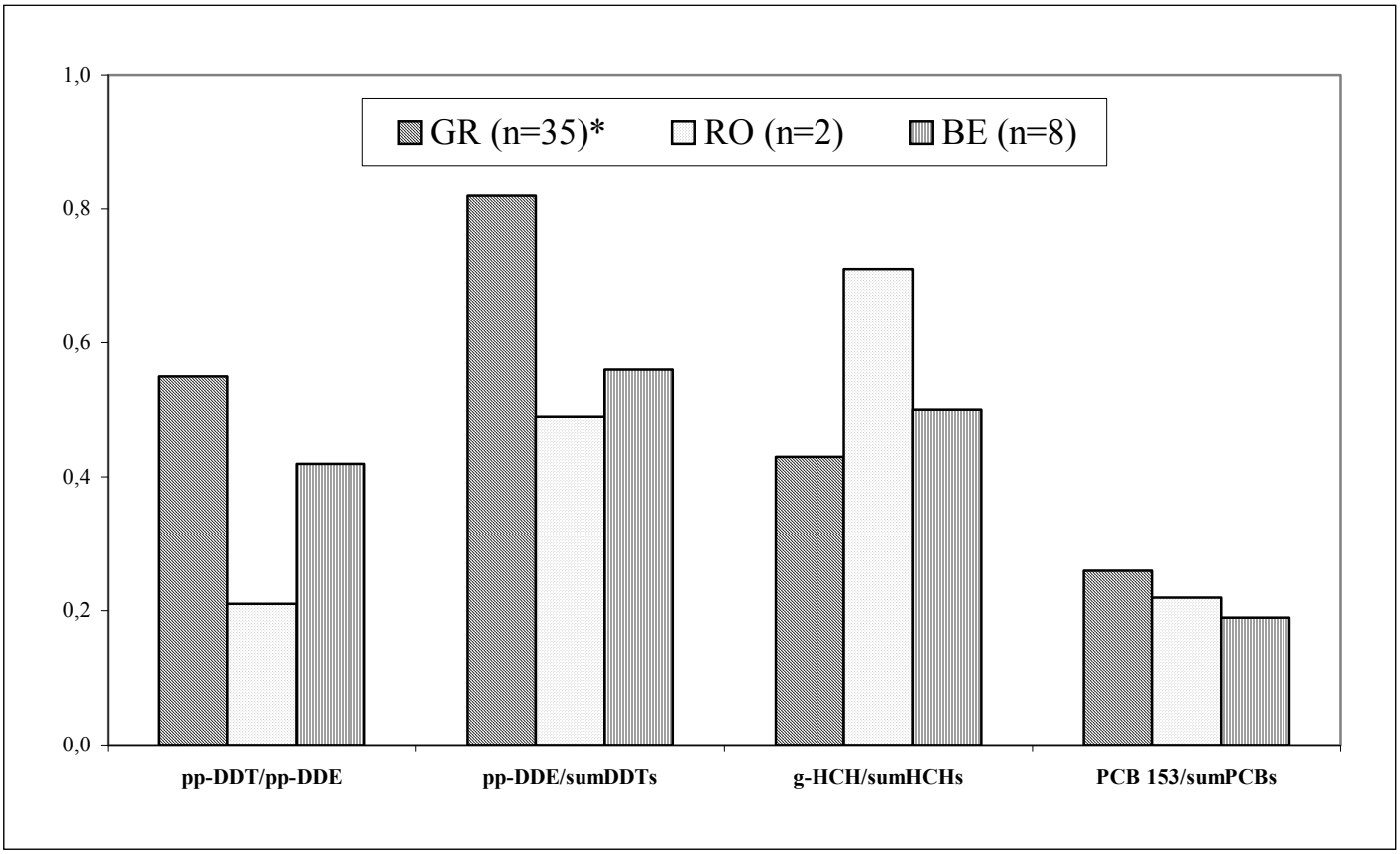
Η συσχέτιση της ηλικίας των γυναικών με τις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις οργανοχλωριομένων στις τρίχες των ήταν πολύ μικρή (Πίνακας 7.3). Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης ήταν μεγαλύτερη (0,33) στην περίπτωση των HCHs. Αυτό πιθανότατα να οφείλεται στο ότι όταν αναλύουμε δείγματα τριχών μελετούμε το σύνολο της εξωτερικής εναπόθεσης και της εσωτερικής μόλυνσης. Έτσι η συσχέτιση δεν μπορεί να είναι τόσο μεγάλη όπως στην ανάλυση πλάσματος που μας δείχνει μόνο την εσωτερική μόλυνση. Στην ανάλυση τριχών πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν και η εξωτερική επιμόλυνση η οποία κάποιες φορές μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική.

**Πίνακας 7.3** Συγκεντρώσεις οργανοχλωριομένων (ng/g τριχών) και στατιστική αξιολόγηση για τεχνικές περιποίησης μαλλιών και επαγγελματική έκθεση σε εντομοκτόνα για Ελληνικά δείγματα

| | **PCBs** | **HCHs** | **DDTs** |
|---|---|---|---|
| | (ng/g hair) | | |
| **Βαμμένα μαλλιά (n=15)** | 4,9 | 40,6 | 101,5 |
| **Φυσικά μαλλιά (n=15)** | 9,2 | 52,3 | 149,1 |
| **p-value** | 0,513 | 0,053 | 0,314 |
| **εκτιθέμενοι (n=30)** | 7,1 | 46,6 | 125,9 |
| **Μη εκτιθέμενοι (n=5)** | n.a. | 11,6 | 80,4 |
| **p-value** | n.a. | 0,02 | 0,212 |
| | | $r^2$ | |
| **Ηλικιακή συσχέτιση** | 0,01 | 0,33 | 0,07 |

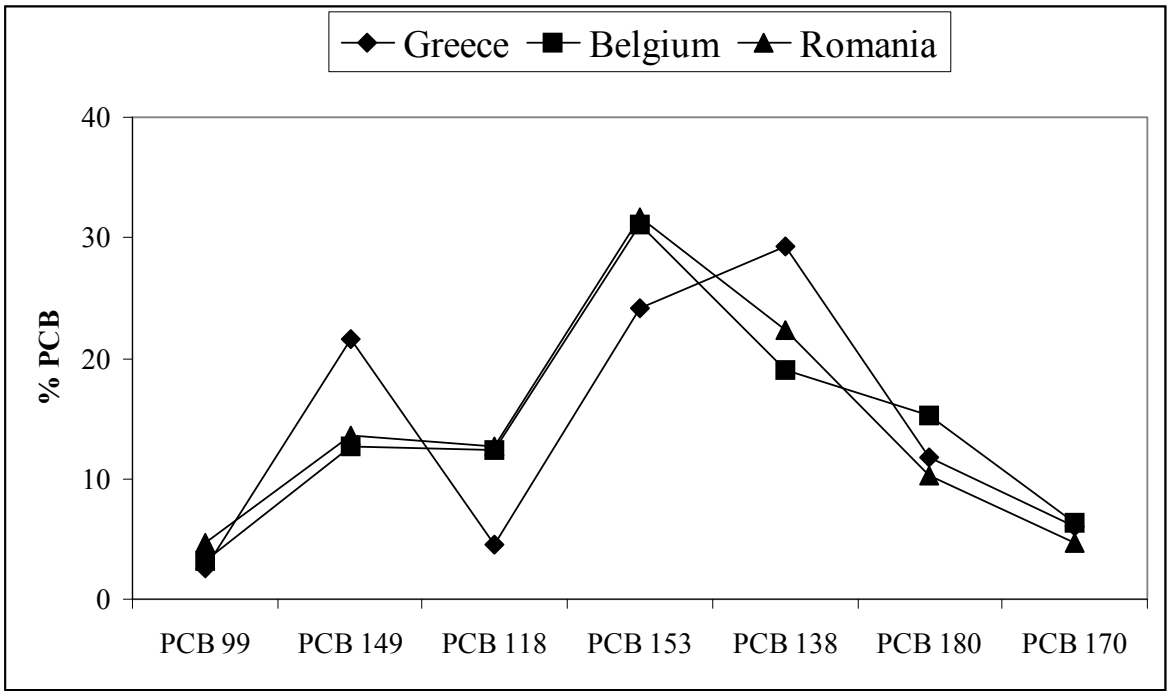
- στατιστικά σημαντικό όταν $p < 0,05$
- n.a.– μη διαθέσιμο

**Εικόνα 7.2**. Σχετική συνεισφορά των p,p',DDT, p,p'-DDE, γ-HCH και PCB 153 στη συνολική επιβάρυνση με DDTs, HCHs και PCBs στην Ελλάδα (GR), τη Ρουμανία (RO) και το Βέλγιο (BE).




*-n=30 για PCBs από την Ελλάδα

**Εικόνα 6 3**. Παρουσίαση των of PCB congeners στα δείγματα τριχών από τις τρεις χώρες

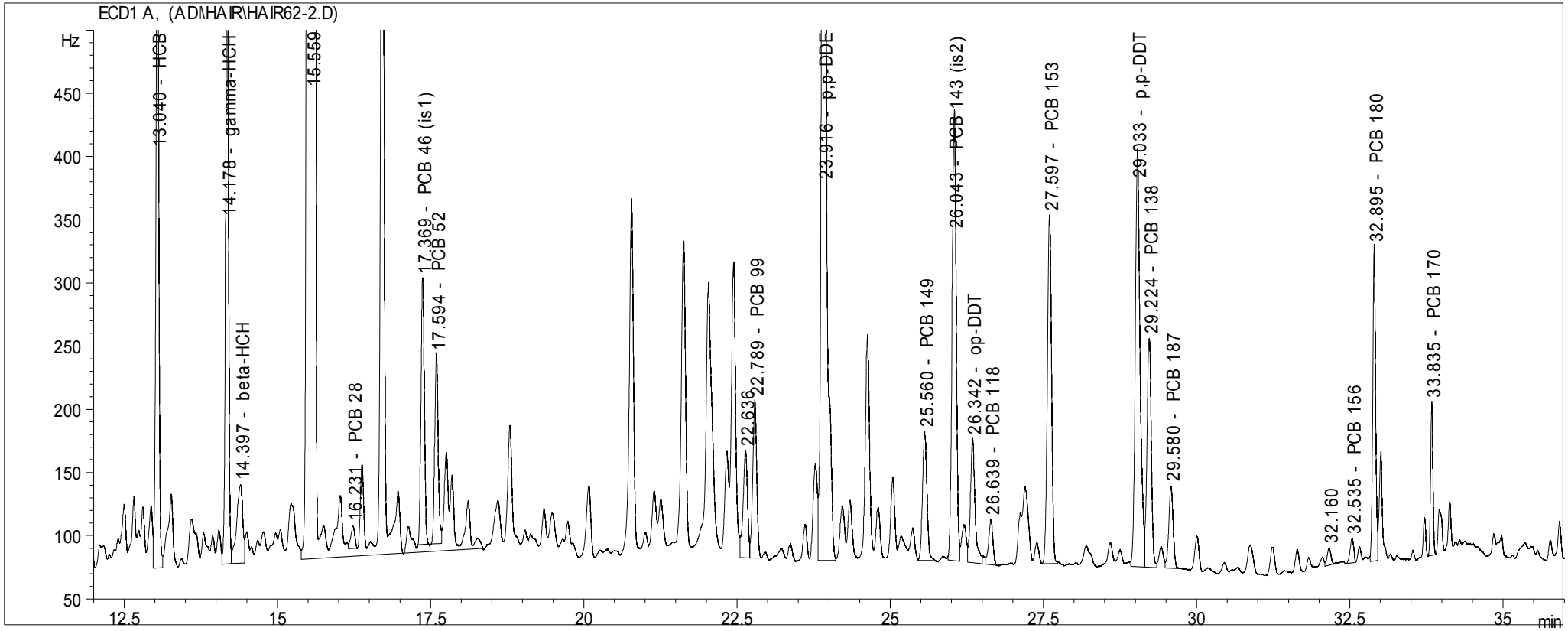


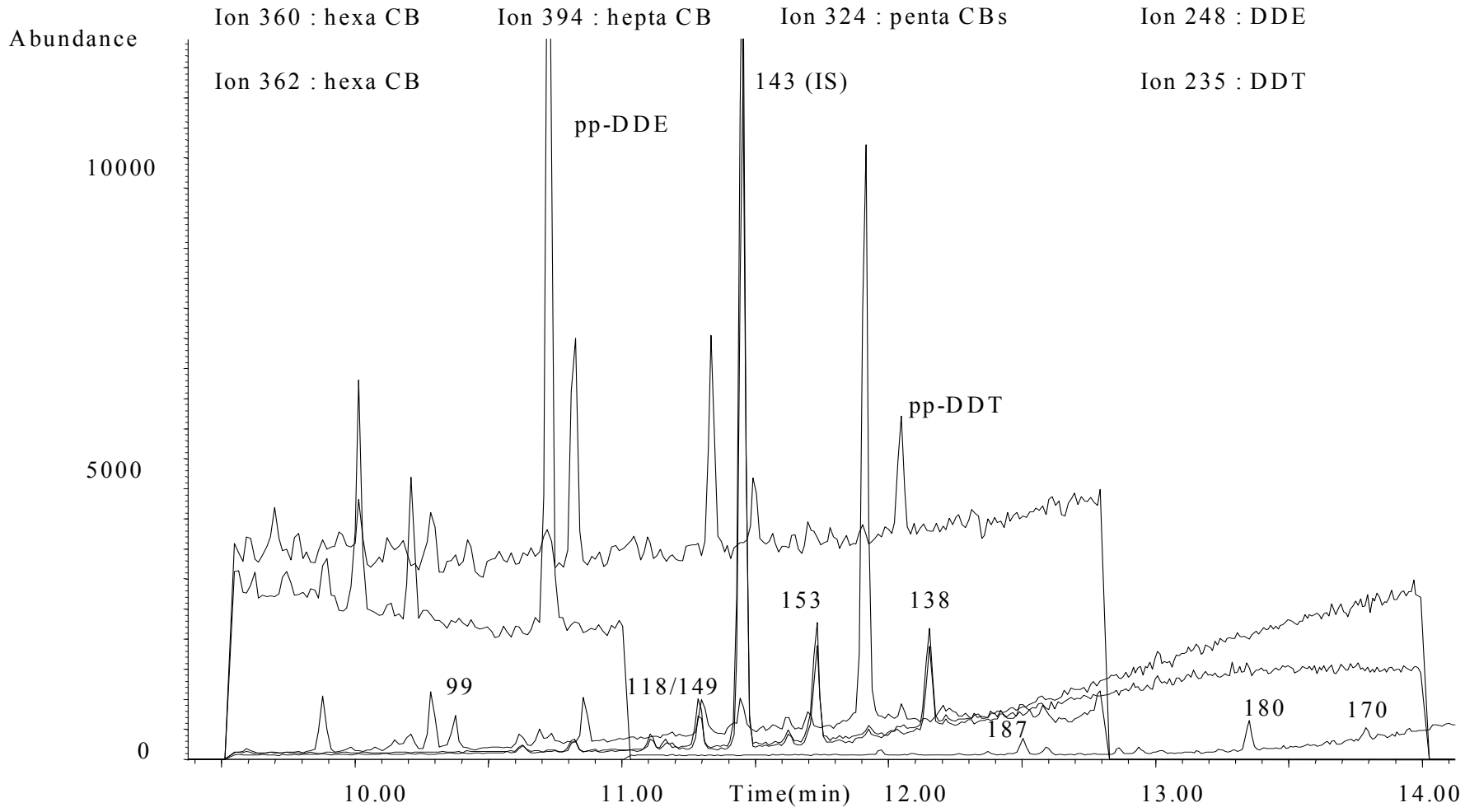
**Πίνακας 7.4.** Συγκεντρώσεις συγκεκριμένων POPs σε επιλεγμένα δείγματα τριχών από την Ρουμανία, το Βέλγιο και την Ελλάδα.

| No. δείγματος | Ηλικία (χρόνια) | Χώρα | HCHs (ng/g) | DDTs (ng/g) | PCBs* (ng/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 28 | Ρουμανία | 24,5 | 34,8 | 10,4 |
| 2 | 29 | Ρουμανία | 39,1 | 69,6 | 10,0 |
| 3 | 42 | Βέλγιο | 13,4 | 24,4 | 10,5 |
| 4 | 65 | Βέλγιο | 17,3 | 47,9 | 40,4 |
| 5 | 68 | Βέλγιο | 19,8 | 301,8 | 44,7 |
| 6 | 26 | Βέλγιο | 8,8 | 12,7 | 5,1 |
| 7 | 66 | Ελλάδα | 95,2 | 754,2 | < 2 |
| 8 | 41 | Ελλάδα | 58,7 | 191,5 | 4,4 |
| 9 | 53 | Ελλάδα | 53,1 | 101,2 | < 2 |
| 10 | 67 | Ελλάδα | 59,8 | 159,3 | < 2 |
| 11 | 49 | Ελλάδα | 81,5 | 169,8 | 17,2 |
| 12 | 42 | Ελλάδα | 49,7 | 180,6 | 17,6 |
| 13 | 57 | Ελλάδα | 53,9 | 136 | 10,4 |
| 14 | 53 | Ελλάδα | 79,5 | 116,5 | 12,9 |

*- Σύνολο των congeners 99, 149, 118, 153, 138, 180 and 170 (αρίθμησηIUPAC).

Εικόνα 7.4. **Χρωματογράφημα GC-ECD δείγματος τριχών από κάτοικο του Βελγίου**




Ion 360 : hexa CB
Ion 394 : hepta CB
Ion 324 : penta CBs
Ion 248 : DDE
Abundance
Ion 362 : hexa CB
143 (IS)
Ion 235 : DDT
pp-DDE
10000
pp-DDT
5000
153
138
99
118/149
180
170
187
0
10.00
11.00
Time(min)
12.00
13.00
14.00

## 7.2. Μελέτη τριχών από κατοίκους αστικών περιοχών του Λιβάνου και της Ελλάδας για την αξιολόγηση της επιβάρυνσης με περιβαλλοντικούς μολυντές μέσω της δίαιτας

### *7.2.1 Σκοπός της μελέτης*

Η χρήση του DDT απαγορεύτηκε στην Ελλάδα κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του ’70. Το ίδιο ισχύει και για το Λίβανο. Η χρήση του lindane και του εξαχλωροκυκλοεξανίου αντίθετα επιτρέπεται και στις δύο χώρες με αυστηρούς περιορισμούς και σε συγκεκριμένες καλλιέργειες. Στην παρούσα μελέτη αξιολογήθηκε η χρόνια έκθεση μέσω της διατροφής στις προαναφερόμενες ουσίες αστικών πληθυσμών των δυο παραμεσογείων κρατών.

### *7.2.2 Δείγματα τριχών*

Για την πραγματοποίηση της μελέτης συλλέχθηκαν δεκατέσσερα δείγματα τριχών κεφαλής από γυναίκες κατοίκους της Βηρυτού χωρίς καμία επαγγελματική έκθεση σε κανενός είδους φυτοφάρμακο, καθώς και ισάριθμα δείγματα από γυναίκες κατοίκους του Ηρακλείου Κρήτης, επίσης χωρίς έκθεση σε φυτοφάρμακα, τουλάχιστον επαγγελματική. Τα δείγματα προέρχονταν από το πίσω μέρος της κεφαλής. Τα δείγματα αναλύθηκαν στο εργαστήριο Τοξικολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης και στο Τοξικολογικό εργαστήριο της Ιατροδικαστικής υπηρεσίας Αθηνών.

### *7.2.3 Οργανολογία*

Χρησιμοποιήθηκε το σύστημα αέριας χρωματογραφίας GC-17A της Schimatzu (Kyoto, Japan) με ECD ανιχνευτή και εξοπλισμένο με 25m x 0,25mm x 0,25μm, HP-5 MS τριχοειδή στήλη. Ήλιο με σταθερή ροή 1,0 ml/min χρησιμοποιήθηκε σαν το φέρον αέριο, ενώ άζωτο με ροή 80 ml/min χρησιμοποιήθηκε σαν το make-up gas. Ένα μl εισήχθη στο σύστημα και αναλύθηκε κάτω από τις παρακάτω συνθήκες: Οι θερμοκρασίες του injector και του ανιχνευτή ήταν 270$^{o}$C και 320$^{o}$C, αντίστοιχα. Το πρόγραμμα θερμοκρασίας της στήλης ξεκινούσε από τους 90$^{o}$C σταθερό για 1 min, μετά με βήμα 15$^{o}$C/min ανέβαινε στους 180$^{o}$C, σταθερό για 1 min, μετά ανέβαινε στους 250$^{o}$C με βήμα 3$^{o}$C/min και τελικά με βήμα 25$^{o}$C/min στους 300$^{o}$C, όπου παρέμενε σταθερό για 6 min.

### *7.2.4 Αξιολόγηση μεθόδου*

Η συγκέντρωση που δίδεται για κάθε ένωση είναι η μέση τιμή τριών μετρήσεων ανά δείγμα. Η ταυτοποίηση των ενώσεων έγινε βάση του χρόνου έκλουσης (RRT) σε σχέση με αυτόν των εσωτερικών standard. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων έγινε διαιρώντας την επιφάνεια της κορυφής της υπό εξέταση ένωσης προς την επιφάνεια της κορυφής του πλησιέστερου εσωτερικού standard. Τα ευρισκόμενα πηλίκα παραστάθηκαν γραφικά με τον χ άξονα να έχει τις συγκεντρώσεις. Η ανάκτηση των εσωτερικών standards υπολογίστηκε διαιρώντας την επιφάνεια της κορυφής των standard προς αυτήν της κορυφής του standard ανάκτησης.

***Καμπύλες βαθμονόμησης***

Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης με πρότυπα διαλύματα των ενώσεων σε εξάνιο Οι καμπύλες βαθμονόμησης 4 σημείων κατασκευάστηκαν με μίγματα των ουσιών μας σε εξάνιο σε συγκεντρώσεις 0, 1, 10, 50ng/ml. Όλες οι καμπύλες είχαν καλή γραμμικότητα με $r^2$>0,99 για το αναμενόμενο εύρος των συγκεντρώσεων στα δείγματα.

***Ανάκτηση***

Η προτεινόμενη μέθοδος εκχύλισης ελέγχθηκε για την αποτελεσματικότητα της χρησιμοποιώντας φορτισμένα δείγματα. Οι ανακτήσεις των υπό διερεύνηση ουσιών υπολογίστηκαν αφού αφαιρέθηκαν οι τιμές των συγκεντρώσεων των ενδογενών ουσιών. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι αφού η μόλυνση με τις ουσίες αυτές είναι παγκόσμια, δεν υπάρχουν απολύτως τυφλά δείγματα. Οι υπολογιζόμενες ανακτήσεις ήταν όλες αποδεκτές και μεγαλύτερες του >85% με σχετική απόκλιση μικρότερη του 12. Η φόρτιση έγινε προσθέτοντας το διάλυμα των ενώσεων σε κομμένα μαλλιά. Ακολούθως προστέθηκε εξάνιο μέχρι το δείγμα να βυθιστεί τελείως σε αυτό και να έχουμε ένα ομοιογενές διάλυμα. Μετά από αυτό το εξάνιο αφέθηκε να εξατμιστεί εντελώς σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάκτηση υπολογίστηκε μετά την ανάλυση τριών διαφορετικών δειγμάτων για κάθε συγκέντρωση φόρτισης.

### *7.2.5 Αποτελέσματα*

Οι συγκεντρώσεις των ουσιών που ανιχνεύτηκαν στις τρίχες φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες που ακολουθούν. Οι συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν σε ng/g δείγματος.

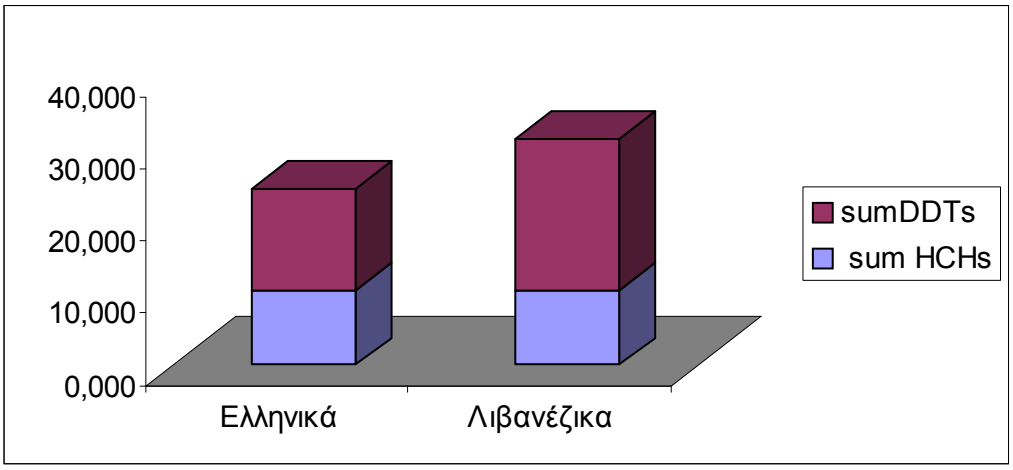
**Πίνακας 7.5** Συγκεντρώσεις οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων σε δείγματα τριχών προερχόμενα από κατοίκους της Βυρρητού ( L) και του Ηρακλείου (Ε).

| **Δείγμα** | **Συγκέντρωση στις τρίχες (ng/g)** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **aHBC** | **HBC** | **lindane** | **op dde** | **ppdde** | **op ddd** | **op ddt** | **pp ddt** |
| L1 | 1,47 | 3,11 | 5,82 | 2,20 | 1,12 | 1,00 | 0,11 | 1,33 |
| L2 | 1,16 | 3,75 | 4,58 | 3,10 | 8,43 | 3,50 | 10,06 | 2,99 |
| L3 | 1,15 | 3,41 | 6,00 | 2,20 | 1,09 | 0,91 | 0,12 | 1,40 |
| L4 | 3,15 | 3,26 | 4,71 | 4,06 | 14,64 | 3,33 | 10,13 | 12,15 |
| L5 | 1,25 | 3,50 | 5,51 | 2,09 | 2,41 | 1,60 | 1,15 | 3,23 |
| L6 | 3,21 | 3,59 | 4,70 | 4,06 | 15,64 | 4,29 | 10,18 | 11,76 |
| L8 | 2,99 | 2,85 | 4,28 | 1,78 | 5,49 | 0,93 | Μ.α | 0,77 |
| L9 | 2,72 | 3,00 | 2,81 | 11,42 | 3,64 | 3,60 | 0,72 | 3,87 |
| l13 | 3,15 | 3,61 | 4,70 | 4,06 | 14,63 | 3,29 | 10,18 | 12,77 |
| l15 | 1,24 | 3,50 | 5,46 | 2,08 | 2,39 | 1,58 | 1,15 | 3,22 |
| L16 | 1,15 | 3,61 | 4,70 | 4,06 | 14,64 | 3,29 | 8,18 | 10,77 |
| L17 | 1,24 | 3,50 | 5,46 | 2,08 | 2,39 | 1,58 | 1,15 | 3,22 |
| L19 | 1,25 | 3,50 | 5,51 | 2,09 | 2,41 | 1,60 | 1,15 | 3,23 |
| l22 | 1,35 | 3,12 | 5,94 | 2,19 | 1,11 | 0,92 | 0,13 | 1,42 |
| E1 | 1,51 | 1,75 | 9,11 | 4,00 | 6,22 | 0,555 | 1,35 | 1,15 |
| E2 | 2,51 | 7,30 | 4,82 | 3,91 | 5,00 | 1,38 | 2,83 | 1,73 |
| E4 | 0,12 | 3,96 | 6,02 | 5,28 | 7,39 | 0,900 | 2,15 | 0,12 |
| E5 | Μ.α. | 2,44 | 5,33 | 2,91 | 7,05 | 0,887 | 1,40 | Μ.α |
| E6 | 0,12 | 4,01 | 5,80 | 5,60 | 7,43 | 0,09 | 2,13 | 0,81 |
| E8 | 1,54 | 1,75 | 6,33 | 4,12 | 6,32 | 0,55 | 1,38 | 1,14 |
| E9 | 1,65 | 1,75 | 9,12 | 4,00 | 6,23 | 0,67 | 1,35 | 1,15 |
| E11 | 2,12 | 7,35 | 5,02 | 4,01 | 4,00 | 1,38 | 2,84 | 1,63 |
| E12 | 0,12 | 4,96 | 6,02 | 4,28 | 7,59 | 0,950 | 2,25 | 0,220 |
| E13 | 0,05 | 2,37 | 5,33 | 2,91 | 7,05 | 0,79 | 1,50 | Μ.α. |
| E15 | 0,12 | 3,01 | 4,80 | 4,60 | 8,43 | 0,09 | 2,13 | 0,91 |
| E17 | 1,84 | 1,75 | 4,33 | 4,12 | 6,32 | 0,55 | 1,38 | 1,15 |
| E18 | 0,12 | 3,01 | 4,80 | 4,60 | 8,43 | Μ.α. | 2,13 | 0,91 |
| E20 | 1,61 | 1,65 | 8,11 | 3,00 | 5,22 | 0,56 | 1,36 | 1,16 |

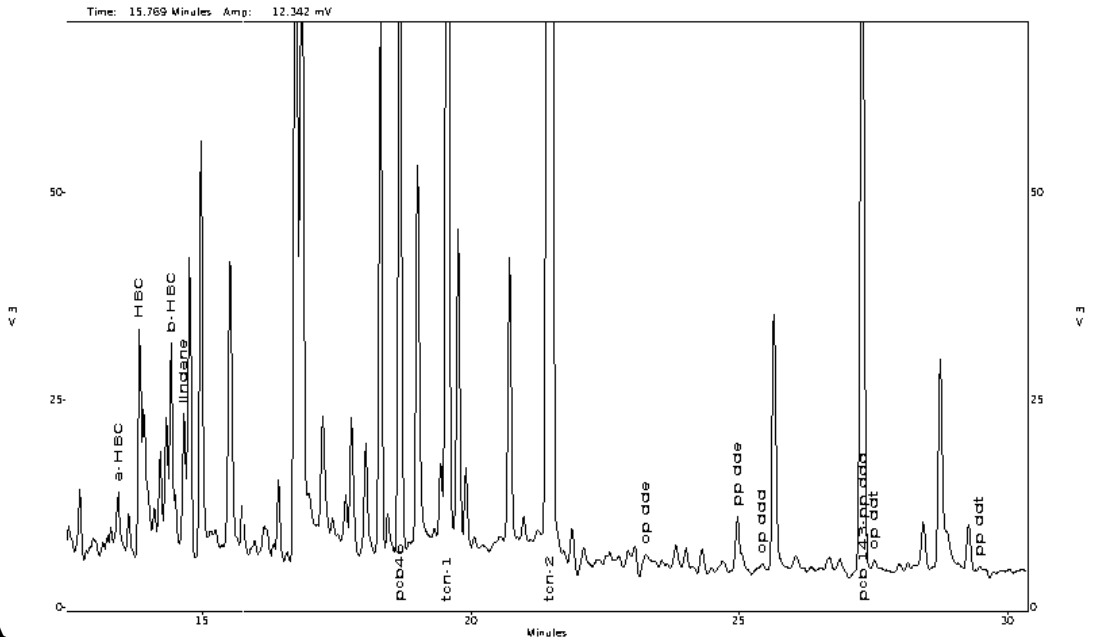
**Πίνακας 7.6**

Μέσες συγκεντρώσεις οργανοχλωριομένων στις τρίχες ± st.dev (ng/g).

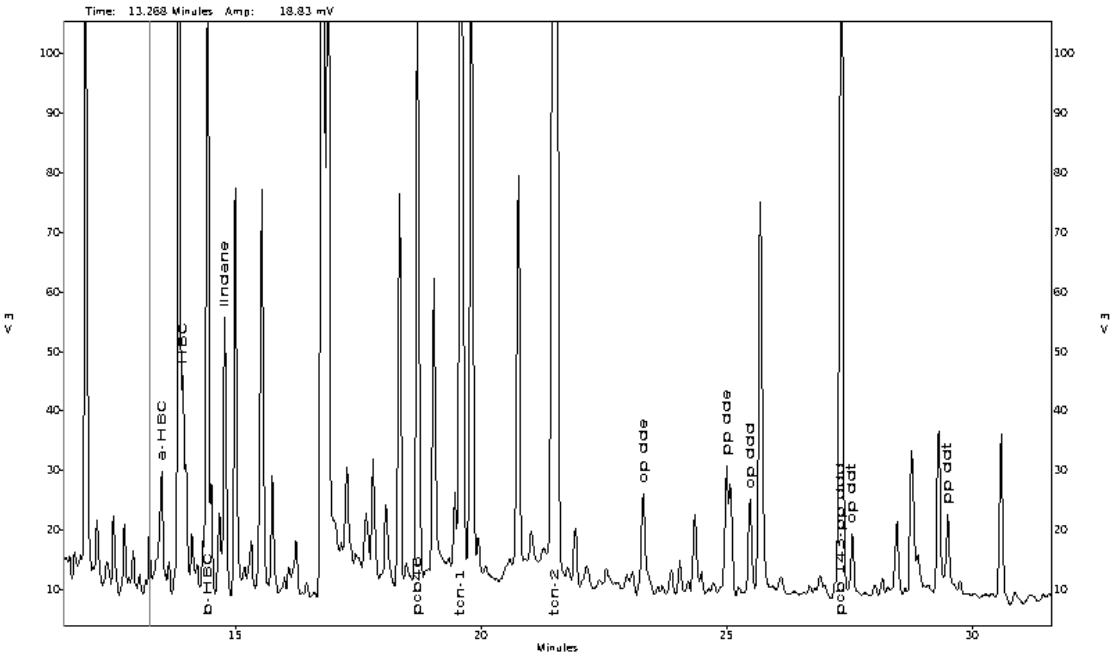
| Ομάδα | Ελληνικά | Λιβανέζικα | p |
|---|---|---|---|
| **a-HBC** | 0,96 ± 0,93 | 1,89 ± 0,90 | |
| **HBC** | 3,36 ± 1,96 | 3,38 ± 0,27 | |
| **lindane** | 6,07 ± 1,59 | 5,01 ± 0,85 | |
| **op dde** | 4,10 ± 0,80 | 3,39 ± 2,48 | |
| **ppdde** | 6,62 ± 1,27 | 6,43 ± 5,88 | |
| **op ddd** | 0,61 ± 0,48 | 2,25 ± 1,23 | |
| **op ddt** | 1,87 ± 0,55 | 3,89 ± 4,58 | |
| **pp ddt** | 0,91 ± 0,56 | 5,15 ± 4,52 | |
| **ΣΥΝΟΛΟ HCHs** | 10,39 ± | 10,28 ± | 0,920 |
| **ΣΥΝΟΛΟ DDTs** | 14,11 ± | 21,10 ± | 0,040 |




**Εικόνα 7.7:** Συνολική επιβάρυνση των δειγμάτων με ισομερή του εξαχλωροκυκλοεξανίου (HCHs) και του DDT (DDTs)




A




B

**Εικόνα 7.8** (Α) Εικόνα δείγματος τριχών από κάτοικο του Λιβάνου και (Β) Εικόνα φορτισμένου δείγματος τριχών**.**

### 7.2.6 Συζήτηση

Είναι προφανές ότι η συνολική μόλυνση με τις υπό ανάλυση οργανοχλωριομένες ενώσεις είναι πολύ μικρότερη από αυτήν που αναφέρεται στην προηγούμενη μελέτη. Τα επίπεδα των οργανοχλωριομένων που αναλύθηκαν στα δείγματα και των δύο χωρών κυμαίνονται σε επίπεδα δεκάδων ng/g δείγματος.

Ομοιάζουν τα επίπεδα που ανιχνεύτηκαν σε δείγματα τριχών από κατοίκους του Βελγίου και της Ρουμανίας. Τα λιβανέζικα δείγματα τριχών περιείχαν υψηλότερο φορτίο σε DDT από ότι τα Ελληνικά δείγματα, πιθανώς λόγω ενός πιο πρόσφατου περιορισμού στη χρήση του DDT ή της πιθανότητας να χρησιμοποιείται ακόμη από ορισμένους παραγωγούς παράνομα, λόγω περιορισμένου ελέγχου. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις HCH στα δείγματά μας, βρέθηκαν παρόμοια επίπεδα μόλυνσης και στις δυο χώρες. Αυτό δείχνει παρόμοια χρήση του εντομοκτόνου, πράγμα που δικαιολογείται από τις παρόμοιες κλιματολογικές και γεωλογικές συνθήκες που ευνοούν παρόμοιες καλλιέργειες και στις δύο χώρες.

# ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια της παρούσης διδακτορικής διατριβής, προκειμένου να διευρενηθεί η έκθεση σε φυτοφάρμακα όπως αυτή αποτυπώνεται στις τρίχες, χρησιμοποιήθηκαν ως μοντέλα ενώσεις που ανήκουν στις κατηγορίες των οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων και περιβαλλοντικών μολυντών. Ο κύριος στόχος ήταν να αποδειχτεί αν οι ουσίες αυτές συγκεντρώνονται στις τρίχες σε ανιχνεύσιμες ποσότητες και σε ποιο βαθμό είναι δυνατή η συσχέτιση της ανιχνευόμενης συγκέντρωσής τους με το ιστορικό έκθεσης του οργανισμού στις ουσίες αυτές.

Οι ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το diazinon σαν εκπρόσωπος της οικογένειας των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων και το methomyl σαν εκπρόσωπος της οικογένειας των καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Ακόμα, σαν εκπρόσωποι των οργανοχλωριομένων εντομοκτόνων μελετήθηκαν το DDT και οι μεταβολίτες του καθώς και το lindane και τα ισομερή του. Τέλος χρησιμοποιήθηκαν διάφορα PCBs σαν εκπρόσωποι των οργανοχλωριωμένων περιβαλλοντικών μολυντών.

Κατά τη μελέτη της εναπόθεσης του diazinon στις τρίχες, αναπτύχθηκαν τρεις αναλυτικές μέθοδοι βασισμένες σε αέρια χρωματογραφία συνδυασμένη με ανιχνευτή NPD και MS. Και οι τρεις μέθοδοι αποδείχτηκαν εκλεκτικές και ευαίσθητες στην ανίχνευση του diazinon στις τρίχες, σε επίπεδα εκατοντάδων pg/mg. Η μέθοδος με το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης ήταν η βασιζόμενη στην μέτρηση της ουσίας με GC-NPD, ενώ η ανάλυση με NCI GC-MS αποδείχτηκε η πιο εκλεκτική.

Με τη χορήγηση του εντομοκτόνου diazinon σε λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας και λευκούς αρουραίους Sprague Dawley, επιβεβαιώθηκε ότι το diazinon εναποτίθεται στις τρίχες όταν εισέλθει στην κυκλοφορία του αίματος, και μάλιστα η συγκέντρωση που ανιχνεύεται στις τρίχες είναι ανάλογη με τη δόση χορήγησης. Συγκρίνοντας τις ανιχνευόμενες συγκεντρώσεις στα δύο είδη, έγινε φανερό ότι το μεταβολικό τους προφίλ καθορίζει την ποσότητα του εντομοκτόνου που κυκλοφορεί στο αίμα και άρα την ποσότητα που ανιχνεύεται στις τρίχες. Για τα κουνέλια είναι γνωστό ότι μετατρέπουν το εντομοκτόνο στο πολύ τοξικό οξόνιο, γεγονός που από τη μια τα καθιστά πολύ ευάλωτα στην τοξικότητα του diazinon και από την άλλη μειώνει τη συγκέντρωση της μη μεταβολισμένης ουσίας στο αίμα και κατ'επέκταση

τη συγκέντρωση του εντομοκτόνου που ανιχνεύεται στις τρίχες. Οι αρουραίοι αντίθετα, δε μεταβολίζουν το diazinon με τον ίδιο τρόπο. Έτσι ενώ έλαβαν μικρότερη δόση από τα κουνέλια, η συγκέντρωση εντομοκτόνου που ανιχνεύτηκε στις τρίχες ήταν μεγαλύτερη. Μέσα στον ανθρώπινο πληθυσμό υπάρχουν άτομα που ανήκουν και στις δύο μεταβολικές κατηγορίες. Αυτό περιπλέκει την αξιολόγηση των ανιχνευόμενων συγκεντρώσεων και τη συσχέτιση τους με το ιστορικό έκθεσης του ανθρώπου.

Τα *in vitro* πειράματα έδειξαν ότι το diazinon δεσμεύεται στις τρίχες ακόμα και στην περίπτωση που η έκθεση είναι εξωτερική. Μάλιστα, καθοριστικό ρόλο στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση στις τρίχες παίζουν η συγκέντρωση του εντομοκτόνου στο μέσο έκθεσης και ο χρόνος έκθεσης. Το χρώμα των τριχών και κατ' επέκταση η περιεκτικότητά τους σε μελανίνη φαίνεται να παίζει δευτερεύοντα ρόλο στην ανιχνευόμενη συγκέντρωση. Σημαντικό ρόλο παίζουν και άλλα χαρακτηριστικά των τριχών, όπως η λιπαρότητα.

Κατά τη μελέτη εναπόθεσης του methomyl στις τρίχες πειραματόζωων και της μέτρησης των επιπέδων του με γνωστές μεθόδους, επιβεβαιώθηκε ότι είναι δυνατή η ανίχνευση του στις τρίχες. Μάλιστα σε αυτήν τη μελέτη πραγματοποιήθηκε τμηματική ανάλυση τριχών η οποία απέδειξε ότι το methomyl δεσμεύεται σε συγκεκριμένα σημεία στην τρίχα, και η διάχυση του στο υπόλοιπο στέλεχος είναι περιορισμένη. Έτσι, ειδικά για τις ανθρώπινες τρίχες είναι δυνατό να εξαχθεί ένα ακριβές ιστορικό έκθεσης, παραδεχόμενοι το γεγονός ότι η ανθρώπινη τρίχα μακραίνει περίπου ένα εκατοστό ανά μήνα.

Για τη μελέτη των οργανοχλωριομένων μολυντών χρησιμοποιήθηκαν ανθρώπινες τρίχες, προερχόμενες από κατοίκους της Ελλάδας, της Ρουμανίας, του Βελγίου και του Λιβάνου. Οι ενώσεις που εξετάστηκαν ήταν οι a-HCH, HCB, lindane (HCHs), o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD, p,p'-DDD, o,p'-DDT, p,p'-DDT (DDTs). Στη μελέτη της επιβάρυνσης των τριχών από Ελλάδα, Βέλγιο και Ρουμανία εξετάστηκαν επίσης διάφορα PCBs (congeners 99, 149, 118, 153, 138, 180 και 170, αρίθμηση κατά IUPAC). Η χρήση του εξαχλωροκυκλοεξανίου (HCHs) και του lindane πιο συγκεκριμένα επιτρέπεται σε αυστηρά καθορισμένες καλλιέργειες και κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες. Η επιβάρυνση των οργανισμών με HCB έχει διάφορες πηγές. Η επιβάρυνση με PCBs προέρχεται κυρίως από βιομηχανικές δραστηριότητες. Το κύριο συμπέρασμα ήταν ότι οι ουσίες που εξετάστηκαν ανιχνεύονται σε όλα τα δείγματα. Η επιβάρυνση που διαπιστώθηκε φάνηκε να είναι

ανάλογη με τον τόπο κατοικίας των ανθρώπων που πήραν μέρος στη μελέτη. Τα ελληνικά δείγματα κατοίκων αγροτικών περιοχών με επαγγελματική έκθεση σε φυτοφάρμακα ήταν περισσότερο επιβαρυμένα με DDTs και λιγότερο επιβαρυμένα με PCBs, ενώ η επιβάρυνση με ισομερή του εξαχλωροκυκλοεξανίου ήταν παρόμοια και στις τρεις χώρες. Συγκρίνοντας την επιβάρυνση των αστικών ελληνικών δειγμάτων με αυτή των δειγμάτων της Βυρητού είναι φανερό ότι η επιβάρυνση με DDTs είναι αισθητά χαμηλότερη από τα αγροτικά ελληνικά δείγματα και προσομοιάζει αυτή των δειγμάτων της Ρουμανίας. Γενικά γίνεται φανερή η καθυστέρηση στην απαγόρευση της χρήσης του DDT σε χώρες όπως η Ελλάδα, η Ρουμανία και ο Λίβανος συγκρινόμενες με το Βέλγιο. Η επιβάρυνση των τριχών με PCBs αντίστοιχα είναι μεγαλύτερη στα δείγματα του Βελγίου, μιας βιομηχανικής κατά κύριο λόγο χώρας.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έδειξε ότι οι τρίχες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν δείκτες χρόνιας έκθεσης σε φυτοφάρμακα, είναι ανάγκη όμως να γίνουν περισσότερες έρευνες και να επεκταθούν και σε άλλες κατηγορίες φυτοφαρμάκων.Επόμενο προτεινόμενο βήμα είναι η ανίχνευση μεταβολιτών των φαρμάκων που εξετάστηκαν τρίχες, καθώς και η δημιουργία τράπεζας αποτελεσμάτων για την καλύτερη στατιστική επεξεργασία και αξιολόγηση της χρόνιας έκθεσης σε φυτοφάρμακα.

Η δημιουργία μοντέλου έκθεσης με τη βοήθεια υπολογιστών το οποίο θα ελάμβανε υπόψιν όλες τις παραμέτρους που μελετήθηκαν και που επηρεάζουν σημαντικά την ανιχνευόμενη συγκέντρωση στις τρίχες, θα βοηθούσε στην καλύτερη αξιολόγηση της έκθεσης και θα βοηθούσε στην σύνδεση εμφανιζόμενων ασθενειών ή συγκεκριμένων γονοτύπων με την ανιχνευόμενη συγκέντρωση των εντομοκτόνων στις τρίχες.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ


Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2000. Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs). Atlanta, GA

Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR)/US Public Health Service, Toxicological Profile for 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, 4, 4'-DDD (Update). 1994. ATSDR. Atlanta, GA

Arrebola F.J., Martinez J.L. Vidal, Mateu-Sanchez M., Alvarez-Castellon F.J. Determination of 81 multiclasspesticides in fresh foodstuffs by a single injection analysis using gas chromatography- chemical ionization and electron ionization tandem mass spectrometry Analytica Chimica Acta 2003; 484: 167-180

Augustijn-Beckers, P. W. M., Hornsby, A. G. and Wauchope, R. D. SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database for Environmental Decisionmaking II. Additional Compounds. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1994; 137: 1-82, 5-21

Baez, H., Castro, M. M., Benavente, M. A., Kintz, P., Cirimele, V., Camargo, C. & Thomas, C. (2000) Drugs in prehistory: chemical analysis of ancient human hair. Forensic Science International, 108(3), 173-179

Ballesteros E., Parrado M.J. Continuous solid phase-extraction and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in natural and drinking waters Journal of Chromatography A 2004;1029:267-273

Baron R.L. Carbamate Insecticides.In Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes W.J. Jr and Laws E.R. Jr, Eds. Academic Press, New York, NY, 1991 pp. 3-6

Barr D.B., Barr J. R., Maggio V.L, Whitehead R.D., Sadowski M.A., Whyatt R.M. and L.L. Needham A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry Journal of Chromatography B 2002; 778: 99-111

Barr J. R., Maggio V.L., Barr D.B., Turner W.E., Sjödin A., Sandau C.D., Pirkle J.L., Needham L.L. and Patterson D.G. New high-resolution mass spectrometric approach for the measurement of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum Journal of Chromatography B, 2003; 794: 137-148

Bartsch, E. Diazinon II. Residues in plants, soil and water. Residue Rev. 1974; 51: 37-68, 5-59

Bravo R., Driskell W.J. Whitehead R.D., Needham L.L. Barr D.B. Quantitation of Dialkyl Phosphate Metabolites of Organophosphate Pesticides in Human Urine Using GC-MS-MS with Isotopic Internal Standards Journal of Analytical Toxicology, 2002; 26(5): 245-252

Buratti F.M., Volpe M.T., Meneguz A., Vittozzi L. and Testai E. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothionate pesticides by human liver microsomes Toxicology and Applied Pharmacology 2003; 186:143-154

Cirimele V., Kintz P., Ludes B, Evidence of pesticide exposure by hair analysis. Acta Clin. Belg. Suppl. 1999; 1: 59-63

Clauwaert, K.M., Van Bocxlaer, J.F., Lambert, W.E. & De Leenheer, A.P. Segmental analysis for cocaine and metabolites by HPLC in hair of suspected drug overdose cases. Forensic Science International 2000; 110(3): 157-166

Compston JE, *et al*. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. The Lancet 1999; 354: 1791-1792

Cone E.J. Mechanisms of Drug Incorporation into Hair. Therapeutic Drug Monotoring 1996; 18(4):438-443

Cone, E.J. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. Forensic Science International 2001; 121(1-2): 7-15

Costa L. G., Li W.F., Richter R.J., Shih D.M., Lusis A., Furlong C.E. The role of paraoxonase (PON 1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism Chemico-Biological Interactions 1999; 119-120: 429-438

Costa L.G. Current issues in organophosphate toxicology. Clinica Chimica Acta 2006; 366: 1-13

Costa L.G., Cole T. B., Vitalone A. and Furlong C. E. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity Clinica Chimica Acta, 2005; 352 (1-2): 37-47

Covaci A, Hura C, Schepens P, Analytical methodology for the determination of POPs in human milk. Chromatographia 2001; 54(3-4): 247-252

Covaci A., Schepens P. Chromatographic aspects of selected persistent organochlorine pollutants analysis in human hair. Chromatographia 2001; 53: 366-371

Dagan S. Comparison of gas chromatography-pulsed flame photometric detection -mass spectrometry, automated mass spectral deconvolution and identification system and gas chromatography -tandem mass spectrometry as tools for trace level detection and identification Journal of Chromatography A 2000; 868: 229-247

Das R., Steege A., Baron S., Beckman J., Harrison R. Pesticide-related illness among migrant farm workers in the United States Int J Occup Environm Health 2001; 7(4): 303-312

Dauberschmidt C., Wennig R. Organochlorine pollutants in human hair. J. Anal. Toxicol. 1998; 22: 610-611

Desi I., Nagymajtenyi L., Schulz H. and Nehez M. Epidemiological investigations and experimental model studies on exposure of pesticides. Toxicology Letters 1998; 96, 97:351-359

Dmitrovic J., Chan S.C. and Chan S.H.Y. Analysis of pesticides and PCB congeners in serum by GC/MS with SPE sample cleanup Toxicology Letters, 2002; 134: 253-258

Dolapsakis G., Vlachonikolis I.G., Varveris C., Tsatsakis A.M. Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete. Eur. J. Cancer 2001; 37: 1531-1536

Duggan A., Charnley G., Chen W., Chukwudebe A., Hawk R., Krieger R. I, Ross J. and Yarborough C. Di-alkyl phosphate biomonitoring data: assessing cumulative exposure to organophosphate pesticides Regulatory Toxicology and Pharmacology 2003; 37(3): 382-395

Dutta H.M., Meijer H.J.M, Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, Lepomis macrochirus: a microscopic analysis Environmental Pollution 2003; 125: 355-360

Ecobichon D.J. Toxic effects of pesticides, in Cacharett and Doull's Toxicology, The basic science of poisons 1991 (M.O. Amdur, J.Doull and C.D. Klaasen, Eds.) 4th edition, pp.565-622, Pergamon, New York

Ecobichon D.J. Pesticide u Ecobichon D.J. Pesticide use in the developing countries. Toxicology 2001; 160: 27-33

Ellenhorn MJ, Barceloux DG. Medical toxicology-diagnosis and treatment of human poisoning. Elsevier, New York, 1988

Enan E.E. El Sebae A.H. Enan O.H. El-Fici S. In-vivo interaction of some organophosphorus insecticides with different biochemical targets in white rats. J. Environ. Sci. Health B. 1982; 17(5):549-570

EPA 2006 http://www.epa.gov./pcb/pubs/effects html

Erickson M.D., Analytical Chemistry of PCBs, 2nd edition Boca Raton, CRC Lewis Publishers, 1997

European Council Directive96/59/EC of 16 Sept 1996. Official Journal L243, 24/09/1996, pp0031-0035

Gallo, M. A. and Lawryk, N. J. Organic phosphorus pesticides. In Handbook of Pesticide Toxicology. Hayes, W. J., Jr. and Laws, E. R., Jr., Eds. Academic Press, New York, NY, 1991.5-3

Garfitt S. J., Jones K., Mason H. J. and Cocker J. Exposure to the organophosphate diazinon: data from a human volunteer study with oral and dermal doses Toxicology Letters 2002; 134: 105-113

Giesy J.P., Kannan K., Blankenship A.L., Jones P.D. Dioxin like and non-dioxin like toxic effects of polychlorinated biphenyls: implications for risk assessment. Organohalogen compounds 1999; 43: 5-8

Gillepsie A.M. and Walters S.M. Rapid clean-up of fat extracts for organophosphorus pesticide residue determination using C18 solid-phase extraction cartridges Analytica Chimica Acta 1991; 245: 259-265

Giovanoli-Jakubezak and Berg. Measurement of mercury in human hair. Arch. Enironm. Health, 1974; 28: 239-144

Goldberger B.A., Caplan T., Marquire T., Cone E.J. Testing human hair for drug of abuse. III. Identification of heroin and 6-acetylmorphine as indicators of heroin use. J Anal Toxicol 1991; 15: 226-231

Goncalvez C., Alpendurada M.F. Solid-phase micro-extraction-gas chromatography-(tandem) mass spectrometry as a tool for pesticide residual analysis in water samples at high sensitivity and selectivity with confirmation capabilities. Journal of Chromatography A 2004; 1026: 239-250

Gosselin R.E., Smith R.P, Hodge H.C. Clinical Toxicology of Commercial Products 5th ed. Williams & Willkins, Baltimore, MD, 1984, pp 3-33

Gou Y., Eisert R., Pawliszyn J. Automated in-tube solid phase microextraction-high performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis Journal of Chromatography A 2000; 873: 137-147

Hamm JT, Hinton DE. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquatic Toxicology* 2000; **48:** 403-418

Handy R.D. Abd-El Samei H.A., Bayomy M.F.F. Mahran A.M. Abdeen A.M. El-Elaimy E.A. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells and lymphoid nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. Toxicology 2002; 172:13-34

Harkey, Anatomy and physiology of the hair Forensic Science International 1993; 63: 9-18

Harvey J., Jelinek A.G., Sherman H.: Metabolism of methomyl in tobacco, corn and cabbage. J.Agric. Food Chemistry 1973; 21:775-783

Hashimi A. A., Krishnan S.S., Jervis R.E. Human hair as a pollutant dosimeter. J. Radioanal. Nucl. Chem. 1992; 161: 171-180

Hatjian B.A., Mutch E., Williams F.M., Blain P.G., Edwards J.W. Cytogenetic response without changes in peripheral cholinesterase enzymes following exposure to a sheep dip containing diazinon *in vivo* and *in vitro* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2000; 472(1-2): 85-92

Hernandez F. Sancho J.V, Pozo O., Lara A., Pitarch E. Rapid direct determination of pesticides and metabolites in environmental water samples at sub µg/l level by on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry Journal of Chromatography A 2001: 939: 1-11

Hops. The biological basis for using hair and nail for analysis of trace elements. Sci Total Environ. 1977; 7: 71-89

Howard, P. H., Ed. 1991 Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Vol 3: Pesticides. Lewis Publishers, Chelsea, MI,.5-13

Hubbard D.L., Wilkins D.G. and Rollins D.E. The incorporation of cocaine and metabolites into hair: Effects of dose and hair pigmentation

IPCS The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000-2002

Jamal G.A. Neurological syndromes of organophosphorus compounds Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews 1997; 16(3):133-170

Johnson, W. W. and Finley, M. T. Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates. Resource Publication 137. U.S. Department of Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, DC, 1980

Jokanovic M. Biotransformation of organophosphorus compound.s Toxicology 2001; 166: 139-160

Kamel F. and. Hoppin J.A. Association of Pesticide Exposure with Neurologic Dysfunction and Disease Environ Health Perspect. 2004; 112(9): 950–958

Kappers W.A., Edwards R.J., Murray S. and Boobis A.R. Diazinon is activated by CYP2C19 in human liver Toxicology and Applied Pharmacology 2001; 177: 68-76

Khan, M. A. Q., Ed. Pesticides in Aquatic Environments. 1977 Plenum Press, NY pp. 5-69

Kidd, H. and James, D. R., Eds. The Agrochemicals Handbook, Third Edition. 1991 Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, (as updated) pp. 5-14

Kupfermann N., Schmoldt A., Steinhart A. Rapid and sensitive quantitative analysis of alkyl phosphates in urine after organophosphate poisoning. J Anal Toxicol. 2004; 28(4):242-8

La Du B.N., Aviram M., Billecke S., Nsvab M., Primo-Parmo S., Sorenson T.S. Standiford C., On the physiological role of paraoxonases Chemico-Biological Interactions 1999; 119-120: 379-388

Lambropoulou D. A., Albanis T. A. Headspace solid phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry for the rapid screening of organophosphorus insecticide residues in strawberries and cherries Journal of Chromatography A 2003; 993:197-203

Lambropoulou D. A., Sakkas V.A., Hela D. G., Albanis T.A. Applicaton of solid phase microextraction in the monitoring of priority pesticides in the Kalamas River Journal of Chromatography A 2002; 963: 107-116

Lambropoulou D.A.and Albanis T.A. Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters Journal of Chromatography A, 2001; 922: 243-255

Liu S. and Pleil J.D. Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated bi-phenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry analysis. J. Chromatog. B 2002; 769: 155-167

Lotti M., Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger R.I., editor. Handbook of pesticide Toxicology. San Diego: Academic Press; 2001p.1043-1085

Lu **C.,** Fenske R.A., Simcox N.J. and Kalman D Pesticide Exposure of Children in an Agricultural Community: Evidence of Household Proximity to Farmland and Take Home Exposure Pathways Environmental Research 2000; 84: 290-302

Mackness B. A., Durrington P.A., Povey A.B., Thomson S.B., Dippnal M.B.l, Mackness M.B. *et al* Paraoxonase and susceptibility to organophosphorus poisoning in farmers dipping sheep. Pharmacogenetics 2003; 13(2):81-88

Mahl, M. A., Hirsch, M. & Sugg, U. (2000) Verification of the drug history given by potential blood donors: results of drug screening that combines hair and urine analysis. *Transfusion,* 40(6), 637-641

Maroni M., Colosio C., FerioliA. And Fait A. Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Toxicology 2000; 143(1): 1-118

Matsuoka A., Hayashi M. and Ishidates M, Jr Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro* Mutation Research/Genetic Toxicology 1979; 66(3): 277-290

Mieczkowski T, Tsatsakis AM, Kruger M, Psillakis Th, The concentration of three antiseizure medications in hair: the effects of hair colour, controlling for dose and age. BMC Clin Pharmacol 2001

Mol H.G.J., van Dam R.C.J., Steijger O.M. Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent Journal of Chromatography A 2003; 1015: 119-127

Molina C., Grasso P., Benfenati E., Barcelo D. Automated sample preparation with extraction columns followed by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry Journal of Chromatography A 1996; 737: 47-58

Motoyama N., Dauterman W.C. Glutahione S-transferases: Their role in the metabolism of organophosphorous compounds. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1980; 114:306-312

Nakahara Y., Takahashi K., Shimanine M., Saiton A. Hair analysis for drugs of abuse. Arch Toxicol 1992; 66:66

Nakao T., Aozasa O., Ohta S., Miyata H. Assessment of human exposure to PCDDs, PCDFs, and co PCBs using hair as a human pollution indicator sample I: development of analytical method for human hair and evaluation for exposure assessment. Chemosphere 2002; 48: 885-896

Nasreddine L., Parent-Massin D. Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? Toxicology Letters 2002; 127: 29-41

NCI, 1979. Bioassay of diazinon for possible carcinogenicity. National Cancer Institute Technical Report Series No 137, National Institutes of Health, Public , Public Health Service, U.S Dept. of Health, Education and Welfare, Bethesda MD.NCI-CG-TR-137;DHEW/PUB/NIH-79-1392

Neishabiuri E.Z. Hassan Z.M., Azizi E., Ostad S.N. Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice. Toxicology 2004; 196: 173-1 79

Neuber K., Merkel G., Randow F.E. Indoor air pollution by lindane and DDT indicated by head hair samples of children. Toxicol. Let. 1999; 107: 189-192

Nogueira J.M.F., Sandra T., Sandra P. Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry Analytica Chimica Acta 2004; 505: 209-215

Oghami T., Nonaka S., Muryama F. *et al*. A comparative study on polychlorinated biphenyls (PCB) and polychlorinated quaterphenyls (PCQ) concentrations in subcutaneous fat tissue blood and hair of patients with Yusho in Nagasaki Perfecture. Fukukoa Acta Med. 1991; 80: 307-312

Peiris-John R.J., Ruberu D.K., Wickremasinghe A.R., van-der-Hoek W. Low level exposure to the organophosphate diazinon leads to restricitive lung dysfunction. Respiratory Medicine 2005; 99: 1319-1324

Piña-Guzmán B., Solís-Heredia M.J. and Quintanilla-Vega B. Diazinon alters sperm chromatin structure in mice by phosphorylating nuclear protamines Toxicology and Applied Pharmacology 2005; 202(2):189-198

Pogacnik L., Franko M. Detection of organophosphate and carbamate pesticides in vegetable samples by a photothermal sensor Biosensors and Bioelectronics 2003; 18:1-9

Quintana J., Marti I., Ventura F. Monitoring of pesticides in drinking and related waters in NE Spain with a multiresidue SPE-GC-MS method including an estimation of the uncertaintity of the analytical results Journal of Chromatography A 2001; 938:3-13

Ray D.E. and Richards P.G. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. Toxicol Lett. 2001; 120(1-3): 343-51

Richter E.D., Safi J. Pesticide Use, Exposure and Risk: A Joint Israeli Palestinian Perspective. Environmental Research 1997; 79:211-218

Ricossa, M. C., Bernini, M. & De Ferrari, F. (2000) Hair analysis for driving license in cocaine and heroin users. An epidemiological study. *Forensic Science International,* 107(1-3), 301-308

Rivier, L. (2000) Techniques for analytical testing of unconventional samples. Bailliere's Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*,* 14(1), 147-165

Rotenberg M., Shefi M., Dany S., Dore I., Tirosh M., Almog S. Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. Clin Chim Acta. 1995 31; 234(1-2): 11-21

Salameh P., Baldi I.Brochard P., and Abi Saleh B., Pesticides in Lebanon: a knowledge, attitude and practice study. Environmental Research 2004; 94:1-6

Sams G., Mason H.J., Rawbone R. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes Toxicology Letters 2000; 116:217-221

Schachterle S., Feigel C. Pesticide residue analysis in fresh produce by gas chromatography-tandem mass spectrometry Journal of Chromatography A 1996; 754: 411-422

Schramm K.-W., Hair: A matrix for non-invasive biomonitoring of organic chemicals in mammals. Bull. Environ. Cont. Toxicol. 1997; 59: 396-402

Schramm K.-W., Kuettner T., Weber S. and Lutzke K.. Dioxin hair analysis as monitoring pool. Chemosphere 1992; 24: 351-358

Seifert B., Becker B., Helm D., Krause C., Schulz C., Seiwert M. The German Environmental Survey 1990/1992 (GerES II): reference concentrations of selected environmental pollutants in blood, urine, hair, house dust, drinking water and indoor air. J. Expo Anal Environ Epidemiol 2000; 10 (6): 552-565

Slobodnik J., Oztekizan O., Lingerman H., Brinkman U.A. Solid-phase extraction of polar pesticides from environmental water samples on graphitized carbon and Empore-activated carbon disks and on-line coupling to octadecyl-bonded silica analytical columns. Journal of Chromatography A. 1996; 750(1-2): 227-238

Soleas G. J., Yan J., Hom K., Goldberg D.M. Multiresidue analysis of seventeen pesticides in wine by gas chromatography with mass selective detection Journal of Chromatography A 2000; 882: 205-212

Spiewak R. Pesticides as a cause of occupational skin diseases in farmers. Ann Agric Environm Med 2001; 8:1-5

Staub, C. (1993) Hair analysis: its importance for the diagnosis of poisoning associated with opiate addiction. Forensic Science International*,* 63(1-3), 69-75

Stephens R., Spurgeon A., Calvert I.A., Beach J, Levy L.S., Berry H.and Harrington J.M. Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. Lancet 1995; **345:** 1135–1139

Sterri S.H., Rognerud B., Fiskum S.E. Lyngaas S. Effect of toxogonin and P2S on the toxicity of carbamates and organophosphorus compounds. Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh) 1979; 45(1): 9-15

Stryer Biochemistry 3rd edition, F.H Freeman and company 1988 vol 1 p 198 (Greek edition).

Tagliaro F., De Battisti Z., Smith F.P., Marigo M. Death from heroin overdose: Findings from hair analysis. Lancet 1998; 351:1923-1925

Tan B.L.L.and Mohd M.A. Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer Talanta, 2003; 61(3,4): 385-391

Taylor, P. 1990. Anticholinesterase agents. In Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed. (A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies, and P. Taylor, Eds.), pp. 131–149. Pergamon Press, New York

The Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants (POPs) http://www.ciel.org 2004

Tomokuni K., Hasegawa T., Hirai Y. and Koga N. The tissue distribution of diazinon and the inhibition of cholinesterase activities in rats and mice receiving a single intraperitoneal dose of diazinon Toxicology 1985; 37(1-2):91-98

Tsatsakis A.M., Tsakalof A.K. Siatistas Y *et al*. Acute poisoning with carbamate pesticides: The Cretan experience. Science and Justice 1996; 36:769-775

Tsatsakis A M., Psillakis Th., Paritsis N. Phenytoin Concentration in Head Hair Sections: A Method to evaluate the History of Drug Use. J Clin Psychopharmacol. 2000; 20(5): 560-73

Tsatsakis A.M., Bertsias G.K., Mammas I.N. *et al*. Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2001; 66: 415-420

Tutudaki M., Dolapsakis G., Vlachonikolis I. and Tsatsakis A.M. Mammography and hair testing findings of populations occupationally exposed to currently used pesticides, in: Book of Abstracts, International Conference on Rural Health in Mediterranean and Balkan Countries (2002) 43

U.S. National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank, Bethesda MD 1995, pp. 3-9

U.S. Public Health Service. Hazardous Substance Data Bank. Washington, DC, 1995.5-9

Valor I., Molto J.C, Apraiz D, Font G.Matrix effects on solid phase microextraction of organophosphorus pesticides from water Journal of Chromatography A 1997; 767: 195-203

Van Leeuwven C.J. Risk Assessment of Chemicals: An Introduction 2000 Van Leeuwven C.J. and Hermens J.L.M. Eds. Kluwer Academic Publishers, p 1-17

Wang W.L., Cone E.J. Testing human hair for drug of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. Forensic Sci Int 1995; 70:39-51

Ware G.W. and Whitacre D.M. An Introduction to Insecticides. The Pesticide Book 2004 6th edition. Publ. Meister Pro Information Resources, Willoughby Ohio

Wauchope, R. D., Buttler, T. M., Hornsby A. G., Augustijn-Beckers, P. W. M. and Burt, J. P. SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 1992; 123: 1-157

Wilson J.A. and Clark A.G. The role of E3 Esterase, Glutathione S-transferases and other non oxidative mechanisms in resistance to diazinon and other organophosphate insecticides in Lucilia cuprina. Pesticide Biochemistry and Physiology 1996; 54:85-95

Wolfarm L.J. Human hair: A unique physicochemical composite. J. Am. Acad. Dermatol 2003; 48:S106-S114

World Health Organization (WHO). 1979. Environmental Health Criteria 9, DDT and its Derivatives. World Health Organization, Geneva

World Health Organization, 1989. Environmetal Health Criteria 83, DDT and its derivatives, environmental effects. World Health Organization, Geneva

**From:** Prof. Dr Aristidis M. Tsatsakis
Head of Toxicology Laboratory
Medical School
University of Crete,
Iraklion, 714 09, Crete,
P.O. Box 1393, GREECE.
Tel. 030 (081) 542098 or 394679
Fax: 030 (081) 542115 or 542098
*e-mail:* *tsatsak@edu.uch.gr*
*toxlab@hippocrates.med.uch.gr*

**To :** Editor, Dr Frederick W. Oehme
Veterinary and Human Toxicology
Comparative Toxicology Labs
Kansas State University
Manhattan, Kansas
66506 5606 USA
fax : 001 913 532 4481
Tel. : 001 913 532 4334

Dear Editor

Here is enclosed the manuscript titled *'Pesticides deposition in hair : Preliminary results of a model study of methomyl incorporation into hair of rabbits'* to be considered for publication in Veterinary and Human Toxicology.

The manuscript has been read and approved by all authors and contains no material that might lead to a conflict of interest on financial aspects.

I am looking forward to hearing from you soon.

Sincerely Yours

Aristidis Tsatsakis, PhD

# Pesticides deposition in hair : Preliminary results of a model study of methomyl incorporation into hair of rabbits

Tsatsakis AM, PhD[2], Tutudaki MI, MS[2], Tzatzarakis MN, BS[2], Psaroudakis K, DVM[1,2], Dolapsakis GP, MD[2], Michalodimitrakis MN, MD,JD[2].

*Department of Forensic Sciences[1], Laboratory of Toxicology[2], Medical School, University of Crete, Iraklion, Voutes 71409, Crete, GREECE.*

*Author for correspondence and reprints requests :*
Aristidis M Tsatsakis, PhD
Head of Toxicology Laboratory
University of Crete,
Iraklion, 714 09, Crete,
P.O. Box 1393,
GREECE
Tel. 030 (081) 394679
Fax: 030 (081) 542115 or 542098
*e-mail:* *tsatsak@edu.uch.gr*
*toxlab@med.uch.gr*

**Abstract**

The aim of this work was to study the incorporation of the pesticide methomyl (a carbamate insecticide) into the hair of New Zealand variety white rabbits. A total amount of 600 mg of methomyl was administered to the rabbits by drinking water over a period of four months. During the treatment period the activity of acetylcholinesterase in the serum was monitored. At the end of the treatment period, hair from the back of the rabbits were cut off and the methomyl concentration was measured using ELISA Rapid Assay kit and HPLC (High Pressure Liquid Chromatography). A decrease of acetylocholinesterase levels from reference values in rabbits serum during this period was observed. The analysis (HPLC) revealed that the first cm of hair from the top contained no methomyl. The second cm contained 0.9 ng/mg and the 3rd cm of hair contained approximately 3 ng/mg methomyl. Methomyl is incorporated in the rabbit hair and the process seems to be independent from the gender of the animal but dependent on the growth rate of the hair (according to the results of the sectional analysis).

## Introduction

Hair analysis has been shown to be a powerful tool for the detection and monitoring of several substances such as drugs of abuse like cocaine (1), opiates (2) and cannabinoids (3); psychoactive agents like carbamazepine, valproic acid, phenytoin (4,5,6) and haloperidol and heavy metals(7). The concentration of these substances in hair is usually expressed in ng/mg of hair. Hair, unlike short term indicators eg. body fluids, retains a substance that is incorporated into it for much longer periods since there is no active metabolism/excretion to remove drugs once deposited. There are only two removal mechanisms of chemicals in hair: replacement/cutting of hair with a time frame of months, and the slow hygienic removal of bound substances. Finally, specimen (hair) can be readily obtained without employing invasive methods.

It would be very useful to know whether several pesticides eg. carbamates to which a large number of people get exposed to occupationally, get incorporated into the hair shaft and to which extent.

A widely used pesticide is methomyl. It is a broad-spectrum carbamate insecticide marketed as an aqueous solution and in the solid form, under the trade name Lannate and Nudrin. Methomyl exerts its pesticidal action by the inhibition of cholinesterase activity. In plant tissues it rapidly degraded to carbon dioxide and acetonitrile (8), and the inhibition of acetyl cholinesterase activity in plant tissues decreases in parallel with methomyl degradation. Studies of methomyl metabolism in the rats, using radio-labelled carbamate, also showed rapid

degradation (9). The finding that methomyl is highly toxic when given orally ($LD_{50}$ 17mg/Kg, rats) in an acute dose, but has a low order of chronic oral toxicity is consistent with the metabolic studies reported (8,9). Methomyl has been proved to be very toxic to humans as well and it has often been used as the drug of choice in suicide attempts (10).

Carbamate pesticides in general are characterised by a broad spectrum of activity and high effectiveness. That's why they have an agricultural usage rate of some millions of kilos per year. That means that many people are exposed to them for long periods of time, receiving subacute doses that may not have very pronounced effects as in the case of acute poisonings but are still dangerous for health. The most important methods currently used for the determination of the levels of these pesticides in the body are: a) Measurement of acetyl cholinesterase activity in the serum and the red blood cells (11) and b) measurement of methomyl and methomyl metabolites in the serum and in the urine respectively (12).

Hair analysis would be a convenient method to monitor the levels of long term exposure without employing invasive techniques, thus providing one more tool in the attempt to prevent any long term toxic effects due to accumulation of pesticide in the body.

Even though acute pesticide poisonings due to ingestion or inhalation of these chemicals have been widely studied (12-15), cases of chronic pesticide exposure have been rarely investigated and documented.

Since no previous studies exist on the topic, a controlled dose study was designed in order to elucidate whether methomyl gets incorporated into the hair shaft through the bloodstream, whether it migrates through the hair shaft and whether the amount detected in the hair could give us some idea about the level of exposure (16). In order to answer the above questions, a pilot study with experimental animals (rabbits) was undertaken. The results of this experiment should provide us with useful clues in order to extrapolate the analysis of pesticides to humans.

## Materials and Methods

*Reagents*

Reagents and solvents used for HPLC were of chromatography grade, while all the rest were of analytical grade and were obtained from Sigma. Pure methomyl (99,5%) used for the preparation of internal standards were obtained from Ciba Geigy Hellas S.A., Anthousa 153 44 Athens. Acetylcholinesterase measurement kit was obtained from Boehringer Mannheim. Rapid assay ELISA kit was obtained from Ohmicron.

*Animals*

White rabbits of the New Zealand variety obtained from the rabbit farm run by the foundation for spastic children Agiou Spiridona, Kroussonas, Heraklion were used for this experiment. Before commencing the experiment the

rabbits underwent veterinary examination in order to determine that they were in good health. Precautionary they were administered 200 mg of tetracycline intramuscularly. In addition they were treated by Cebacil antiparasitic bath (active ingredient Boxin), they received an antihaemorrhagic vaccine and cocciodiostatic treatment with potassium trimethylprim and sulphochloropyridazine. During the experiment the rabbits received water containing the pesticide and ordinary rabbit feed at libitum.

*Animal treatment*

A group of rabbits was exposed to subacute doses of methomyl over a period of four months. Each dose consisted of 30 to 40 mg of methomyl dissolved in 1.5 l of water and was consumed by the rabbits in four days. The dosing was interrupted for two days when the animals showed signs of intoxication. The signs were a fall in the levels of cholinesterase which appeared in the serum analysis and lack of activity by the rabbits. Food and water consumption was unaffected. Thus the total amount of methomyl consumed by the animals during that period of four months was approximately 600 mg.

*Acetyl-cholinesterase analysis*

At the beginning of the experiment and at certain times during the treatment period the activity of Acetyl-cholinesterase was determined. A kit

from Boehringer Mannheim was used for this purpose. A blood sample was obtained from each animal and was centrifuged immediately in order to obtain the serum used in this analysis. The contents of bottle 1 (butyrylthiocholine iodide, phosphate buffer pH 7.7 and dithiobis(nitrobenzoate) in granular form) were dissolved in 3ml of redistilled water and were brought to assay temperature (37 $^{0}$C) 20 ìl of serum was added into the bottle, the contents were mixed and poured into a cuvette within the space of 30 sec. Then using a stopwatch the time (Dt) in seconds required for an absorbance increase of DA 0.100 at 405 nm was measured. The measurement was repeated 3 times and a mean value for (Dt) was obtained which was used to calculate the activity of acetyl cholinesterase in U/I. Reference values for humans are between 5.300-12.900 U/I. Reference values for the rabbits were determined to range between 300-600 U/I. The measurements of absorbance were performed against distilled water.

*Hair and blood collection*

During and at the end of the treatment period a patch of hair was cleared off from the back of the rabbit. The hair samples collected at the end of treatment were cut in three sections, 1 cm, 2 cm and 3 cm from the top and each section was analysed separately for pesticide content.

The hair samples were kept in plastic containers at room temperature and dry atmosphere until the analysis was performed. Blood was collected from the ear vein of the rabbits, using 1 ml syringes into vacutainer tubes and was stored

at -20 $^{0}$C until analysis.

*Pesticide extraction from hair*

This method was a modification of the one used by Cone et. al used for the extraction of cocaine from hair (1). In order to determine the pesticide content in the different hair segments, 50 mg of hair from each segment was weighed out and powdered in the Minibead cell disrupter (Biospec products Inc, Barkesville USA) as described below. Each sample was cut into smaller segments and transferred in the special polystyrene vials together with five glass beads (2.5 mm in diameter). The vials were cupped and placed in the homogenisator where they were left for five minutes at the highest speed. The powder obtained was transferred into clean test tubes and 2 ml of methanol was added to it. The mixture was vortexed and refluxed at 40 $^{o}$C for 18 h, in a paraffin bath. At the end of the refluxing period the samples were centrifuged and the clear supernatant was transferred into a clean test tube. Methanol was evaporated under a steam of Nitrogen at room temperature and the residue was resuspended in 2 ml of distilled water, the sample was re-extracted using SPE columns (12) in 1 ml of dichloromethane which was evaporated and the final residue was resuspended in 200 ìl of distilled water and was analysed using the ELISA Rapid Assay kit.

A standard curve of methomyl was also prepared in the following way: Blank hair (50 mg) were spiked with 0, 50, 250, 750, 2500 ng to give the

following fortified hair standards 0, 1, 5, 15, 50 ng/mg of methomyl. This sample sequence was treated in exactly the same way as the unknown samples.

*ELISA Assay*

The Rapid Assay kit from Ohmicron was used for this purpose. 200 ìl of sample, control or standard and 250 ìl of the methomyl enzyme conjugate were added to appropriately labelled test-tubes. The antibody coupled paramagnetic particles were mixed thoroughly and 500 ìl of this solution were added to each tube. The mixture was vortexed for 1-2 sec and incubated at room temperature for 30 min. The tubes were transferred to the Magnetic Separation Rack and were left to separate for 2 min. The liquid contents of the tubes were decanted and 1 ml of Washing solution was added to each tube. The tubes were left on the magnetic rack for 2 further min, the solution was decanted and the last step was repeated once more. The rack was removed from the separator and 0.5 ml of colour solution was added to each tube. The solution was vortexed for 1-2 sec and incubated at room temperature for 20 min. Stopping solution (0.5 ml) was added to each tube and the absorbance at 450 nm was measured

*HPLC Confirmation*

Hair samples weighing approximately 500 mg were refluxed as described above in 4 ml of methanol and after solvent evaporation were resuspended in 1 ml of distilled water. Methomyl was extracted from the aqueous phase using

solid phase extraction columns as described in (12). The residue was reconstituted in 50 ìl methanol and injected into the HPLC system. The HPLC used was a Spectra-Physics Model SP8810 solvent delivery system equipped with a Model 7125 Syringe Loading Sample Injector supplied with 10 ìl sample loop and Model SP 8450 Variable UV-Vis Detector set at 254 nm. A reversed phase HPLC procedure was carried out on Accus C8 column (J & W) with water : acetone (92.5 : 7.5 v/v) mobile phase eluted at the flow rate of 1 ml/min. The chromatograms were recorded and integrated using a Hewlett-Packard 3390A integrating recorder. Under these conditions methomyl retention time was 11.64 min. Water- methanol or water-acetonitrile eluent mixture with Supelco LC-8 or Spherisorb ODS-1 column were also successfully utilised for the chromatographic analysis of the extracts.

## Results

Acetyl cholinesterase measurements showed a decrease in the activity of the enzyme in the treated animals. (Figure 1). The values of the enzyme activity ranged from 240-390 U/I (mean value: 298) for the methomyl treated male rabbit and 240-400 U/I (mean value: 310) for the methomyl treated female

rabbit. The values for blank male were 250-580 U/I (mean value: 430) and for blank female were 270-600 U/I (mean value: 426).

Methomyl concentration in whole hair was measured by ELISA and was found to be zero, as expected in the control animals. In the treated male rabbit the hair mean concentration of methomyl was found to be 1.3 ng/mg. The mean concentration of methomyl in the hair of the female treated rabbit was found to be 1.4 ng/mg.

The concentration of methomyl in the blood of the animals was measured by HPLC and was 9.3 ng/ml for the male treated rabbit and 7.8 ng/ml for the treated female rabbit (Table 1). The results are the mean values of at least 6 determinations.

Sectional analysis of hair, carried out by ELISA and HPLC gave the following results: No methomyl was found in oldest segment of the hair shaft, the first cm from the top in both animals. The second cm from the top contained approximately 0.9 ng/mg hair methomyl. The third and most recent segment of hair contained approximately 3 ng/mg methomyl (Table 2).

## Discussion

Acetyl-cholinesterase measurements revealed a decrease in the normal levels of the enzyme during the dosing period but this was not accompanied by severe clinical signs. It is well known (10,14) that methomyl and the rest of

carbamates exert their toxic action by inhibiting acetyl cholinesterase activity hence the fall in the levels of this enzyme was expected (Figure 1).

As indicated by the results, no methomyl was detected in the top section of the hair shaft, more methomyl was present in the second section and the largest quantity was detected in the third section, the one nearest to the root. The same pattern was followed by the result s obtained from both methods used to analyse the hair samples (Table 2). This suggests that methomyl does get incorporated into the hair and it does not migrate along the hair shaft, otherwise the concentration of the pesticide would be constant in the three hair sections. As it can be seen though the oldest part of the hair, the one representing the period during which no dosing occurred is clear of methomyl while the largest concentration is found close to the root, in the newest segment of the hair and the one representing the period during which the largest dose of methomyl was present in the body, and more precisely in the blood stream. It also suggests that methomyl must bind to some component of the hair shaft, such as lipids or keratin and this is why it is unable to diffuse freely along the hair shaft (17).

Table 1 shows that only a small fraction of the pesticide that was present in the blood stream was incorporated in the hair shaft. This finding contradicts the results of previous studies with carbamazepine, phenytoin, haloperidol and chlorpromazine that indicated that the aforementioned drugs were being concentrated in the hair shaft in larger amounts than in the bloodstream (4, 6, 18, 19) This could be attributed to the fact that white rabbits were used in this

experiment. The absence of melanin reduced the binding sites available to methomyl (17). Animal studies examining the binding of chlorpromazine and ofloxacin in the hair of rabbits and guinea pigs respectively, revealed that more drug was incorporated in the coloured hair than in the white hair (17, 18, 19). That means that melanin must be a component that offers many binding sites to drugs. Human studies examining the incorporation of several drugs of abuse into Africoid, Caucasoid and Mongoloid hair, agreed with the animal studies. Hair with high melanin content (Africoid and Mongoloid) retain much larger drug quantities than more lightly coloured hair (17).

This was a controlled dose experiment. It was ensured that the only way of incorporation of methomyl in the hair shaft was through the blood stream, since methomyl was only present in the drinking water and not in the environment. The only way that external contamination could occur was if the rabbit licked itself, but this was avoided by obtaining the samples from a patch in the back of the rabbit.

This preliminary study is a part of our investigations concerning the possibility of monitoring the occupational index of exposure to pesticides using hair testing. Several factors should be considered before a safe extrapolation of the results to humans can be made. Occupational exposure occurs through several routes, two of the most important are through inhalation and direct disposition of the chemical on the hair.

Finally, the rate of growth and the frequency with which hair is replaced

should be considered, bearing in mind that it is significantly different in humans and in rabbits.

## References


1. Cone EJ, Darwin WD and Wang WL: The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. Forensic Sci Intern 63: 55-68, 1993.
2. Goldberger BA, Caplan YH, Maguire T and Cone EJ: Testing human hair for drugs of abuse III. Identification of heroin and 6-acetyl-morphine as indicators of heroin use. J Anal Toxicol 15: 226-231, 1991
3. Jurado C, Menendez M, Reppeto M, Kintz P, Cirimele V and Mangin P: Hair testing for cannabis in Spain and France: Is there a difference in consumption? J Anal Toxicol 20: 111-115, 1996.
4. Tsatsakis AM, Psillakis ThK, Tzatzarakis M, Kourtopoulos H and Paritsis N: Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment: A preliminary study. Clinica Chim Acta, in press.
5. Tsatsakis AM, Psillakis Th, Assithianakis P: Determination of CBZ and valproic acid in human head hair. Hospital Pharmacy Bulletin 3: 31-37, 1995 (in Greek).
6. Psillakis Th, Tsatsakis AM, Assithianakis P, Daskalakis I: Determination of phenytoin in human head hair. Chimica Chronika, New Series 25: 120, 1996.
7. Kintz P (Ed.) Drug testing in hair. CRC Press Inc, 2000 Corporate Blvd, Boca Raton pp. 1-290, 1996.
8. Harvey J, Jelinek AG and Sherman H: Metabolism of methomyl in tobacco,

corn and cabbage. J Agric Food Chem 21 (5): 775-783, 1973.

9. Harvey J, Jelinek AG and Sherman H: Metabolism of methomyl in the rat. J Agric Food Chem 21: 769-775, 1973.

10. Tsatsakis AM, Tsakalof AK, Siatitsas Y and Michalodimitrakis EN: Acute poisoning with carbamate pesticides: the Cretan experience. Science & Justice 36(1): 35-39, 1996.

11. Voss G and Sachsse K: Red Cell Plasma Cholinesterase Activities in Microsamples od Human and Animal Blood Determined Simultaneously by a Modified Acetylthiocholine/ DTNB Procedure. Toxicol Applied Pharmacol 16: 764-772, 1970.

12. Tsatsakis AM, Tsakalof AK and Michalodimitrakis EN: The analysis of methomyl, a carbamate pesticide, in post-mortem samples. Science & Justice 36(1): 41-45, 1996.

13. Tsatsakis AM, Perakis K, Koumantakis E: Experience with acute paraquat poisonings in Crete. Vet Human Toxicol 38(2): 113-117, 1996.

14. Tsatsakis AM, Aguridakis P, Michalodimitrakis MN, Tsakalov AK, Alegakis AK, Koumantakis E, Troulakis G: Experience with acute organophosphate poisonings in Crete. Vet Human Toxicol 38: 101-107, 1996.

15. Michalodimitrakis E, Tsatsakis AM, Christaki-Hampsas M, Trikilis N, Christodoulou P: Death following intentional methyl bromide poisoning: Toxicological data and literature review. Vet Human Toxicol 39(1): 30-34, 1997.

16. Tsatsakis AM, Tutudaki M, Tzatzarakis M, Psaroudakis K, Dolapsakis K and Lampsa K: Pesticides disposition in hair of rabbits. In: Proceed. 35th Intern. Meeting Forensic Toxicol, 1997, Padova, Italy.
17. Cone EJ, Joseph RE: The potential for bias in hair testing for drugs of abuse. In: Drug Testing in Hair, Kintz P (ed), CRC press, Boca Raton, p 69-93, 1996.
18. Uematsu T, Sato R, Fujimori O and Nakashima M: human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: a possible linkage of haloperidol excretion into hair with hair pigment. Arch Dermatol Res 282: 120, 1990.
19. Forrest IS, Otis LS, Serra MT, Skinner GC: Passage of $^{3}$H- chlorpromazine and $^{3}$H- deltatetrahydrocannabinol into the hair (fur) of various mammals. Proc West Pharmacol Sci 15: 83, 1972.

**Table 1**. **Methomyl (Me) concentration (Conc) in hair (ELISA) and blood samples (HPLC) of the rabbits.**

| Rabbit | Me Conc in hair, ng/mg | Me Conc in blood, ng/ml |
|---|---|---|
| Blank male rabbit | nd | nd |
| Me treated male rabbit | 1.1-1.8 (1.3) | 6.6-14.2 (9.3) |
| Blank female rabbit | nd | nd |
| Me treated female rabbit | 0.9-1.8 (1.4) | 5.9-10.3 (7.8) |

*Range and mean ( ) values of at least six determinations in different samples*

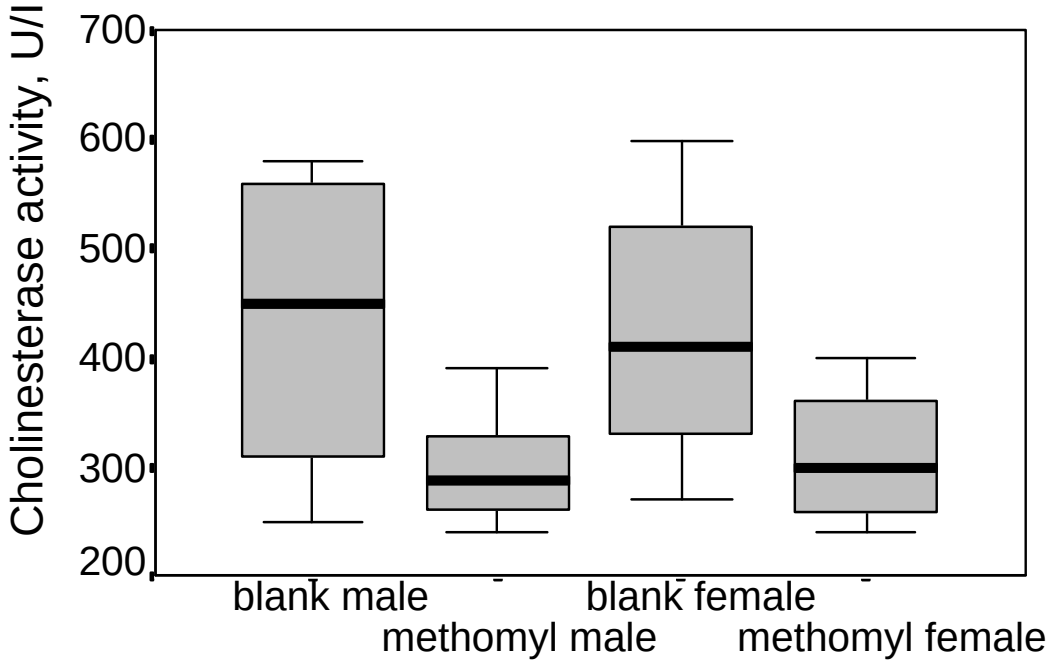
nd : not detected

**Table 2**. **Sectional analysis of rabbit hair, using ELISA assay and HPLC (*).**

| Rabbit | Methomyl concentration (ng/mg) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 cm from the top | | 2 cm from the top | | 3 cm from the top | |
| Blank male | nd | nd | nd | nd * | nd | nd * |
| Methomyl treated male | nd | nd | 0.7 | 0.9* | 3.5 | 3.2* |
| Blank female | nd | nd | nd | nd * | nd | nd * |
| Methomyl treated female | nd | nd | 1.1 | 0.9* | 3.1 | 3.6* |

*Mean values of at least six determinations.*
*nd : not detected*

**Figure 1.** Serum acetylcholinesterase activity measurements.



PERGAMON

Chemosphere 46 (2002) 413–418

CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphere

# Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants

Adrian Covaci [a,*], Maria Tutudaki [b], Aristidis M. Tsatsakis [b], Paul Schepens [a]

[a] *Toxicological Center, University of Antwerp, Universiteitsplein 1, B-2610 Wilrijk, Belgium*
[b] *Laboratory of Toxicology, Medical School, University of Crete, 71409 Voutes, Heraklion, Crete, Greece*

Received 3 November 2000; received in revised form 19 February 2001; accepted 26 February 2001

**Abstract**

Hair analysis was used for the assessment of exposure to organochlorine pollutants in specimens from Greece, Romania and Belgium. A simple method (using 3 N HCl as incubation reagent, liquid–liquid extraction with hexane/dichloromethane (DCM), alumina/acid silica clean-up and GC–ECD/GC–MS analysis) was used for screening of specimens. The highest organochlorine load (up to 148 ng/g hair for the sum of PCB, DDT and hexachlorocyclohexane (HCH) isomers) was found in samples from a group of Greek women with past occupational exposure to pesticides. DDTs were the main organochlorine pollutants in Greek samples (up to 70%), while in Belgian hair samples their contribution was reduced to 40%. PCB mean concentration was higher in Belgian specimens (up to 14 ng/g hair). Lindane (γ-HCH) was the main HCH isomer found in the samples (up to 82% in the Greek samples). Contribution of *p,p′*-DDT to the sum of DDTs was higher in Greek samples and indicates recent exposure to technical DDT. Similar PCB 153/sum PCBs ratios were found for each of the three countries suggesting similar sources of pollution with PCBs (mainly dietary). Artificially coloured hair samples were found to have lower, but not statistically significant concentrations of organochlorine pollutants than the non-coloured hair. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Organochlorine pesticides; PCBs; Hair; Gas chromatography

## 1. Introduction

Human monitoring of persistent organochlorine pollutants (POPs) has become increasingly important for exposure and risk assessment. Body fluids and tissues are commonly used to evaluate human exposure (Pauwels et al., 1999, 2000; Covaci et al., 2000). Due to its relatively high percentage of lipids (3.5–4%), hair has been identified as a suitable indicator for short- and long-term exposure to organochlorines (Schramm et al., 1992). Because each hair follicle is surrounded by a system of capillary blood vessels at the root (Spearman, 1977), the same information, as present in serum, is found in the hair (internal exposure). The external exposure is correlated with gaseous compounds solubilised on the excretions of the sebaceous glands, with which hair is coming in contact. The presence of non-persistent pollutants (e.g., low chlorinated PCBs or α-hexachlorocyclohexane) in higher concentration than in other body matrices can be attributed to external gaseous or particulate exposure (Zupancic-Kralj et al., 1992). Thus, it might be possible to differentiate between internal and external exposure by looking at the patterns of persistent and non-persistent congeners. There is little knowledge about the elimination kinetics in different body compartments. Available studies suggest a quasi-similar distribution of xenobiotics in different compartments (hair, blood, liver, abdominal fat and muscle), when normalised on lipid content (Klein et al., 1992).

* Corresponding author. Tel.: +32-3-8202704; fax: +32-3-820-2722.
*E-mail address:* covaci@uia.ua.ac.be (A. Covaci).

0045-6535/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0045-6535(01)00065-0

In comparison to traditional matrices, hair has received little attention for the analysis of organochlorine compounds (Schramm, 1997, 1999; Dauberschmidt and Wenning, 1998; Neuber et al., 1999). Recently, a comprehensive paper on POPs analysis in hair has been published (Covaci and Schepens, 2001) and different incubation and extraction methods were compared.

Because of easy and non-invasive sampling, hair can be an alternative matrix for the monitoring of endangered animal species or children. Moreover, hair analysis can be applied to any population group (when compared with human milk restricted to women in lactating period or adipose tissue available under surgery). However, there are some drawbacks of using hair in POP analysis. It is not a homogeneous sample and there is still to learn about excretion and distribution of POPs in hair. Finally, there is a great uncertainty for the comparison of concentrations found by different studies in different matrices.

The present paper aims to establish the assessment of exposure to selected organochlorine pollutants in humans from three different European countries (Greece, Romania and Belgium) by means of hair analysis.

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and materials

The organochlorine pesticides under investigation were α-, β-, γ-isomers of hexachlorocyclohexane (HCHs), *o,p′*-DDE, *o,p′*-DDD, *o,p′*-DDT, *p,p′*-DDE, *p,p′*-DDD and *p,p′*-DDT (expressed here as DDTs) and hexachlorobenzene (HCB). The following PCB congeners (IUPAC numbers) were targeted: 28, 52, 99, 101, 118, 138, 149, 153, 156, 170, 180 and 187. PCB 46, PCB 143 and ε-HCH were used as internal standards and 1,2,3,4-tetrachloronaphthalene (TCN) as a recovery standard. All individual standards at a concentration of 10 ng/μl in iso-octane were purchased from Dr. Ehrenstorfer Laboratories (Augsburg, Germany). Dilutions were made in iso-octane in order to cover the entire range of POPs expected in human hair. All solutions were stored at −20°C.

Hexane, dichloromethane (DCM) and iso-octane were of pesticide grade (Merck, Darmstadt, Germany). All solvents were tested for interferences by concentration from 15 ml to 50 μl and analysis by GC-ECD. Hydrochloric acid 37%, concentrated sulphuric acid 95–97%, were analytical grade reagents (Merck). All aqueous reagent dilutions were done with Milli Q water. Anhydrous sodium sulphate for residue analysis, basic aluminium oxide 70–230 Mesh and silica gel 60–200 Mesh (Merck) were used after heating overnight at 120°C. Empty cartridges (1 ml) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

In July 1996, scalp hair strains from the back of the head were obtained from Greek women ($n = 30$) with past occupational (green houses, vineyards or open air plantations of olive) exposure to pesticides (total duration of the exposure between 2 and 35 years). In April 2000, scalp hair strains (back of the head) were obtained from apparently healthy individuals without known occupational exposure to pesticides living in Belgium ($n = 10$), Romania ($n = 2$) and Greece ($n = 5$).

### 2.2. Extraction method

Two hundred (200) mg cut hair (length of ~1 mm) from each sample were accurately weighted, spiked with 5 ng of internal standards (PCB 46 and PCB 143) and overnight incubated at 40°C in 2 ml of 3 N HCl. Liquid–liquid extraction with 2 × 3 ml hexane:DCM (4:1) was used. The combined fractions of organic solvent were purified on a cartridge filled from the bottom with 250 mg deactivated alumina (10% water), 500 mg of acidified silica and 250 mg anhydrous $Na_2SO_4$. The modified silica gel was prepared as follows: to 50 g silica gel, 27 ml concentrated sulphuric acid were added dropwise, while the mixture was stirred to ensure good homogeneity. The acidified silica was stirred for another 30 min following completion of acid addition.

The cartridge was pre-washed with 2 ml hexane: DCM (1:1, v/v) and 2 ml of hexane. The cartridge was eluted with 4 ml hexane. The final eluate was concentrated to approximately 50 μl under a gentle nitrogen stream, spiked with 5 ng recovery standard TCN and transferred to a vial.

### 2.3. Instrumentation

A Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) 6890 GC-μ ECD was equipped with a 25 m × 0.22 mm × 0.25 μm, HT-8 (SGE, Zulte, Belgium) 1,7-dicarba-closo-dodecarborane 8% phenyl methyl polysiloxane capillary column. Helium was used as a carrier gas at a constant flow of 1.0 ml/min and $Ar/CH_4$ (95:5) as make-up gas (40 ml/min). 2 μl were injected in pulsed splitless mode (pulse pressure = 20 psi, pulse time = 1 min) with the split outlet opened after 1 min. Injector and detector temperatures were set at 270°C and 320°C, respectively. The temperature program of the HT-8 column was set to 90°C for 1 min, then with 15°C/min to 180°C, kept for 1 min, then to 250°C by 3°C /min and further by 25°C/min to 20°C, kept for 6 min.

A Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) 6890 GC was connected via direct interface with a HP 5973 mass spectrometer. A 25 m × 0.25 mm × 0.25 μm, DB-1 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) methyl polysiloxane capillary column was used with helium as carrier gas at a constant flow of 1.0 ml/min. A Gerstel PTV injector with a multi baffled empty liner of 1.5 mm i.d. was kept

at 270°C. Two μl were injected in pulsed splitless mode (pulse pressure = 20 psi, pulse time = 1 min) with the split outlet opened after 1 min. Interface temperature was set at 285°C. The temperature program of the DB-1 column started from 90°C, kept for 1 min, then with 15°C/min to 275°C, kept 10 min.

The mass spectrometer acquisition parameters were: ion source 200°C, electron impact ionisation at 70 eV and electron multiplier voltage of 2000 V. Three ions (two from molecular ion cluster $M^+$ and $[M+2]^+$ and the $[M-70]^+$ ion) were monitored for each level of chlorination for PCBs or for each pesticide. Retention time, masses and relative abundance of the confirmation ions to the quantification ion were used as identification criteria. A deviation of ion ratios of less than ±20% from the theoretical value was considered acceptable.

### 2.4. Quality control/quality assurance

The concentration reported for each compound, was the average of values obtained from the two GC columns. Multi-level calibration curves were created for the quantification using standard solutions in iso-octane and good linearity ($r^2 > 0.999$) was achieved for the tested intervals which included the concentration range found in samples. The identification of POPs was based on their relative retention times (RRT) to the internal standard used for quantification. Compounds were quantified against the closest internal standard. Peak area ratios (POP response/internal standard response) were plotted against the concentrations of POPs. Recoveries of internal standards were monitored to ensure their maintenance at acceptable levels.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Method evaluation

The method used for the analysis of hair samples was previously evaluated (Covaci and Schepens, 2001). It was shown that overnight incubation at 40°C with hydrochloric acid results in cleaner chromatograms than incubations with bases, enzymes or other acids and gives the highest recoveries of internal standards and targeted compounds. Liquid extraction gave higher recoveries of internal standards when compared to solid-phase extraction, because after incubation in aqueous reagents, lipophilic compounds are not released in solution and thus, are not readily available for interaction with the sorbent. Combined clean-up on deactivated alumina and acid silica was shown to remove effectively lipids and other interferences from the extract. The chromatographic analysis was done on two capillary columns of different polarity. It was shown (Covaci and Schepens, 2001) that HT-8 or DB-1 columns offer less co-elutions of target analytes than the DB-5 (the most commonly used column in organochlorine analysis). Because of their complementarity (lower detection limits with ECD and increased selectivity with MS), both detectors were used for the analysis of real samples. Recoveries for all compounds from spiked hair were found acceptable

Table 1
Concentrations of organochlorine pollutants (ng/g hair) in hair samples from Greece, Romania and Belgium

| Compound (ng/g hair) | Greece ($n = 35$) | | Romania ($n = 2$) | | Belgium ($n = 10$) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mean ± SD (5–95%)[a] | Range | Mean | Range | Mean ± SD (5–95%) | Range |
| HCB | 0.5 ± 0.6 | Nd[b]–2.6 | 0.9 | Nd–1.3 | 0.9 ± 0.6 | Nd–3.3 |
| α-HCH | 1.4 ± 1.2 | Nd–5.2 | 3.5 | 2.4–4.6 | 1.5 ± 1.2 | Nd–2.8 |
| β-HCH | 6.1 ± 4.7 | Nd–16.3 | 12.0 | 11.7–12.3 | 3.5 ± 1.9 | 1.7–7.7 |
| γ-HCH | 33.8 ± 17.0 | 18–73.7 | 16.3 | 9.8–22.8 | 9.6 ± 10.5 | 2.7–36.6 |
| ∑ HCH | 40.8 ± 14.7 | 21.8–95.2 | 31.8 | 24.5–39.1 | 14.7 ± 10.9 | 6.0–40.8 |
| *o,p′*-DDE | 20.2 ± 23.1 | Nd–453.1 | Nd | Nd | Nd | Nd |
| *p,p′*-DDE | 37.6 ± 13.4 | 18–127.4 | 37.5 | 23.6–51.4 | 10.5 ± 7.9 | 2.1–278.7 |
| *p,p′*-DDD | 4.2 ± 3.7 | Nd–17.3 | Nd | Nd | 2.3 ± 1.6 | Nd–5.8 |
| *o,p′*-DDT | 5.9 ± 3.6 | Nd–14.4 | 3.8 | 3.4–4.2 | 2.2 ± 1.0 | Nd–3.6 |
| *p,p′*-DDT | 22.0 ± 12.2 | 5–43.6 | 7.9 | 4.8–11 | 5.9 ± 4.3 | 2.4–13.6 |
| ∑ DDTs | 101 ± 41.4 | 12.3–754.2 | 52.2 | 34.8–69.6 | 18.8 ± 12.5 | 8.7–301.8 |
| ∑ PCBs[c] | 5.2 ± 5.9 | Nd–17.6 | 10.2 | 10.0–10.4 | 13.7 ± 18.1 | Nd–44.7 |

[a] Percentile range.
[b] Nd – not detected.
[c] Sum of PCB 99, 118, 138, 149, 153, 170 and 180.

(>85%) with a relative standard deviation of less than 12%. Detection limits were calculated for each target analyte and ranged between 0.3 and 2 ng/g hair (Covaci and Schepens, 2001). A good agreement between organochlorine concentrations from powdered and cut hair was observed and thus, cut hair (with less laborious sample preparation) was preferred for routine analysis. Reagent blanks were run for interference check and no significant peak (higher than detection limit) was found at retention time of target compounds. Blank human hair was not available because of obvious internal exposure. The method is very simple, miniaturised (up to 15 ml of organic solvent) and efficient (up to 50 samples/analyst can be achieved in one day).

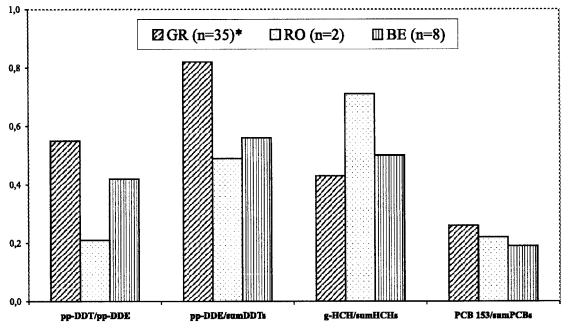



Fig. 2. Relative contribution of $p,p'$-DDT, $p,p'$-DDE, γ-HCH and PCB 153 to the total sum of DDTs, HCHs and PCBs. (*$n = 30$ for PCBs from Greece.)

## 4. Comparison of profiles and concentrations of selected POPs in different European countries

The assessment of contamination with organochlorine compounds in samples from different European countries (Belgium, Greece and Romania) was done by analysis of scalp hair samples. For PCB 28, 101 and $o,p'$-DDD all measurements were under the detection limit. For PCB 52, 99, 118, 149, 156 and 187, HCB, α-HCH, β-HCH, $o,p'$-DDE, $o,p'$-DDT and $p,p'$-DDD, some measurements were above the detection limit. For calculation of means, concentrations under the detection limit were set to 0.

It can be seen that DDTs (sum of DDT isomers) were the major chlorinated contaminants in human hair (Table 1). DDTs and HCHs (sum of α-, β-and γ-HCH) values were higher in Greek specimens, probably due to a more recent restriction on pesticide usage, while PCBs concentrations were higher in Belgian specimens, due to a higher degree of industrialisation (Table 1). The organochlorine load of Greek hair specimens was mainly composed of pesticides (>95%), while Belgium hair specimens contained 29% PCBs (Fig. 1). Interestingly, the HCHs percentages were almost similar in all three countries (28%, 34% and 31% for Greek, Romanian and Belgian hair samples, respectively).

Mean $p,p'$-DDT/$p,p'$-DDE ratio was higher in Greece than in other countries (Fig. 2). This can be explained by possibly recent use of technical DDT (containing $p,p'$- and $o,p'$-DDT). This hypothesis is supported by the presence in some Greek samples of concentrations up to 453 ng/g hair of $o,p'$-DDE, a metabolite of $o,p'$-DDT, with shorter lifetime than the $p,p'$-isomer. Higher $p,p'$-DDE/sum DDTs ratios (up to 0.71 in Romanian hair) suggest past exposure to DDT.

Lindane (γ-HCH) was the major HCH isomer present in hair samples (up to 82% of total HCHs for the Greek specimens). The γ-HCH/sum HCHs ratio gives an idea of the exposure time and of the HCH mixtures used. Thus, the high ratio in Greek specimens can be explained by a recent usage of pure lindane, while lower ratios (as found in Romanian and Belgian samples) indicate past exposures and use of technical lindane (with high percentage of the less persistent isomer, α-HCH). Additionally, β-HCH, the most persistent HCH isomer, indicates the exposure time to HCHs. A high β-HCH/sum HCHs ratio (0.4 and 0.3 for Romanian and Belgian

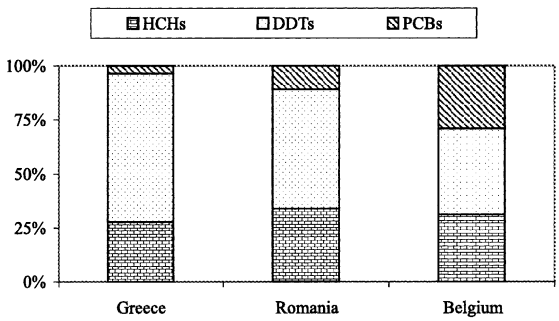



Fig. 1. Relative contribution of PCBs, HCHs and DDTs to the total organochlorine load in the three countries.

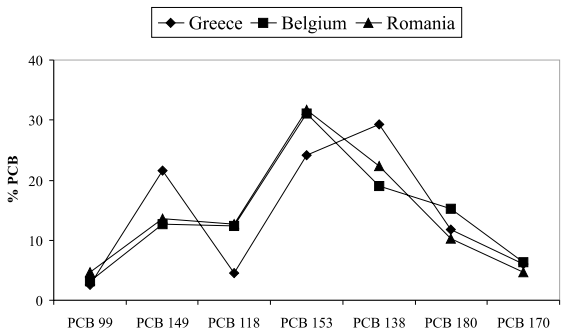



Fig. 3. Profiles of PCB congeners in hair samples from the three European countries.

Table 2
Concentrations of organochlorine pollutants (ng/g hair) and statistical comparison for hair treatment and exposure to pesticides in Greek specimens[a]

| | PCBs (ng/g hair) | HCHs (ng/g hair) | DDTs (ng/g hair) |
|---|---|---|---|
| Coloured hair ($n = 15$) | 4.9 | 40.6 | 101.5 |
| Non-coloured hair ($n = 15$) | 9.2 | 52.3 | 149.1 |
| *P*-value | 0.513 | 0.053 | 0.314 |
| Exposed ($n = 30$) | 7.1 | 46.6 | 125.9 |
| Non-exposed ($n = 5$) | n.a. | 11.6 | 80.4 |
| *P*-value | n.a. | 0.02 | 0.212 |
| | $r^2$ | | |
| Age-dependency | 0.01 | 0.33 | 0.07 |

[a] Significant at $P < 0.05$; n.a. – not available.

specimens, respectively) indicates past exposure to technical lindane.

The similar PCB 153/sum PCBs ratios in all 3 countries (Fig. 2) indicated the same pattern and source of pollution with PCBs (mainly dietary exposure). However, the lower ratio for Belgian samples (0.19 vs 0.26 in Greek specimens) was due the quantification of a higher number of congeners following the presence of higher PCB concentrations in the samples (Table 1). It can be observed (Fig. 3) that PCB profiles for Belgian and Romanian specimens are almost similar, but slightly different from the profile in Greek samples. Differences are more pronounced for PCB 118 and 149 because of some measurements under the detection limit in the Greek samples.

### 4.1. Samples from Greece

Hair treatment was evaluated for samples from Greece (obtained from persons occupationally exposed to pesticides) for which information on hair colour was available. Concentrations of investigated compounds in specimens of artificially coloured hair were lower (though not significantly) for all compounds (Table 2), suggesting that the structural integrity of hair is altered due to treatment. Adsorptive properties of hair are reduced by the treatment and compounds cannot be adsorbed or, when adsorbed, are easily released from the matrix. It might be possible that some compounds are degradated during hair colouring process (which in general involves oxidation with hydrogen peroxide in basic medium).

In the same samples, HCHs were found to be significantly higher ($P < 0.05$) in persons exposed to pesticides when compared with non-exposed persons. No significant difference between the two groups was found for DDTs. No correlation between occupational exposure time and concentrations of HCHs or DDTs was found for the same group. However, no information was available upon which types of pesticides have been used. No correlation was found between concentrations of DDTs or HCHs in hair of Greek women and cancer (4 specimens out of 30).

The correlation between age and concentration of contaminants was very weak (Table 2). The highest correlation coefficient was found for HCHs (0.33). This is probably due to the fact that, when analyzing hair, the sum of internal and external exposure is measured. Thus, correlation cannot be as strong as in the case of, for example, serum analysis, which only gives a measure of internal exposure. In case of hair analysis, one should take in account the eventually high contribution of external exposure from diffuse sources.

## 5. Conclusions

A simple method (using 3 N HCl as incubation reagent, liquid–liquid extraction with hexane and DCM, alumina/acid silica clean-up and GC–ECD/GC–MS analysis) was used for the analysis of real human hair samples. Greek samples contained the highest load of organochlorines and recent contamination with technical DDT and pure lindane was suggested. Hair analysis can be used with success for the assessment of human exposure to organochlorines.

## References

Covaci, A., Pauwels, A., Schepens, P., 2000. Determination of selected persistent organochlorine pollutants in human serum by solid-phase disk extraction and dual-column capillary gas chromatography with electron capture detection. Int. J. Environ. Anal. Chem. 76 (3), 167–178.

Covaci, A., Schepens, P., 2001. Chromatographic aspects of selected persistent organochlorine pollutants analysis in human hair. Chromatographia, in press.

Dauberschmidt, C., Wenning, R., 1998. Organochlorine pollutants in human hair. J. Anal. Toxicol. 22, 610–611.

Klein, U., Drochner, W., Forschner, E., Johannes, B., 1992. Concentrations of PCBs in hair, blood, tissue and excretions of chronically contaminated cows, heifers and calfs. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 99 (6), 242–248.

Neuber, K., Merkel, G., Randow, F.F.E., 1999. Indoor air pollution by lindane and DDT indicated by head hair samples of children. Toxicol. Lett. 107, 189–192.

Pauwels, A., Covaci, A., Delbeke, L., Punjabi, U., Schepens, P., 1999. The relation between levels of selected PCB congeners in human serum and follicular fluid. Chemosphere 39 (14), 2433–2441.

Pauwels, A., Covaci, A., Weyler, J., Delbeke, L., Dhont, M., DeSutter, P., D'Hooghe, T., Schepens, P., 2000. Comparison of persistent organic pollutant residues in serum and adipose tissue in a female population in Belgium, 1996–1998. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 39 (2), 265–270.

Schramm, K.W., Kuettner, T., Weber, S., Lutzke, K., 1992. Dioxin hair analysis as monitoring pool. Chemosphere 24 (3), 351–358.

Schramm, K.W., 1997. Hair: a matrix for non-invasive biomonitoring of organic chemicals in mammals. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59, 396–402.

Schramm, K.W., 1999. Biomonitoring ausgewählter organischer Chemikalien mit Haaren, Herbert Utz Verlag, München, 1999.

Spearman, R.I.C., 1977. Biochemistry of hair formation. In: Jarrett, A. (Ed.), The Physiology and Pathophysiology of the Skin. Academic Press, London, United Kingdom, pp. 1302–1305.

Zupancic-Kralj, L., Jan, J., Marsel, J., 1992. Assessment of PCBs in human/poultry fat and in hair/plumage from a contaminated area. Chemosphere 25 (12), 1861–1867.

**Human & Experimental Toxicology** (2003) **00:** 1–6
www.hetjournal.com

# Hair analysis used to assess chronic exposure to the organophosphate diazinon: a model study with rabbits

Maria Tutudaki*,[1], Andreas K Tsakalof[2] and Aristidis M Tsatsakis[1]

[1]*Lab of Toxicology, Medical School, University of Crete, Voutes, Heraklion, 714 09 Crete, Greece;*
[2]*'Ormylia' Art Diagnosis Centre, Sacred Convent for Annunciation, 63071 Ormylia, Chalkidiki, Greece*

**The main purpose of the present study was to determine whether hair analysis would be a suitable method to assess chronic exposure of rabbits to the pesticide diazinon. A controlled study was designed, in which white rabbits of the New Zealand variety were systemically exposed to two dosage levels (15 mg/kg per day and 8 mg/kg per day) of the pesticide, through their drinking water, for a period of 4 months. Hair samples from the back of the rabbits were removed before commencing the experiment and at the end of the dosing period. Parallel experiments with spiked hair were carried out in order to design a simple and efficient method of extraction of diazinon from hair. The hair was pulverized in a ball mill homogenizer, incubated in methanol at 37°C overnight, liquid–liquid extracted with ethyl acetate and measured by chromatography techniques (GC-NPD and GC-MS) for confirmation. The concentration of the diazinon in the hair of the exposed animals ranged from 0.11 to 0.26 ng/mg hair. It was concluded that there is a relationship between the administered dose and the detected pesticide concentration in hair. Finally, it seems that hair analysis may be used to investigate chronic exposure to the pesticide.** *Human & Experimental Toxicology* (2003) **00,** *1–6*

**Key words:** chronic exposure; diazinon; GC-NPD; GC-MS; hair

UNCORRECTED PROOF

## Introduction

Diazinon, first produced commercially in 1952,[1] is still a widely used organophosphate pesticide. It is used to control a wide variety of suckling and leaf eating insects. It is used on rice, fruit trees, sugarcane, corn, tobacco, potatoes, as well as horticultural plants. It is also an ingredient in pet strips and a domestic pest control agent. Finally, it is used to control ectoparasites on livestock. Therefore, there is the potential for exposure to a large proportion of the population, with the most heavily exposed being those working in agriculture[2–4] and the chemical industry.[5] Although there is a tendency for the use of organophosphate pesticides in Europe to be reduced, pesticide abuse is a serious problem in Crete. Many cases of pesticide poisonings, due to acute and subacute exposure, have been reported.[6–9] Diazinon is one of the most popular organophosphates in Crete, used to control insects in cultivations, livestock and in houses. As a result, quite a large number of people, not only farmers, are exposed to it.

Diazinon exerts its action by the phosphorylation of acetyl cholinesterase, resulting in inhibition of the enzyme, acetylcholine accumulation and altered cholinergic neurotransmission.[10] Although diazinon itself is not a potent enzyme inhibitor, in animals and humans it is metabolized by cytochrome P450,[11] to form diazoxon, a compound that is a very strong enzyme inhibitor.[12] The acute toxicity of diazinon is not very high but chronic exposure to the compound, even at very low levels, may cause a series of adverse effects.[13,14] Several studies have indicated that it may be mutagenic, or cause developmental toxicity in various animal species.[15] All the above indicate the necessity of an easy, non-invasive method of assessing chronic exposure to the pesticide.

Hair, unlike short-term indicators, e.g., body fluids, retains an incorporated substance for long periods since there is no active metabolism/excretion to remove it once it is deposited. Segmental hair analysis has been successfully used to assess chronic exposure to various chemicals, such as

*Correspondence: Aristidis M Tsatsakis, Laboratory of Toxicology, Medical School, University of Crete, Voutes, Heraklion, 714 09 Crete, Greece
E-mail: aris@med.uoc.gr

Received 9 April 2002; revised 29 November 2002; accepted 29 November 2002

© Arnold 2003

10.1191/0960327103ht334oa

drugs of abuse,[16–18] pharmaceuticals,[19–21] heavy metals and so on. Very recently it has been shown that several environmental pollutants, such as organochlorine pesticides and PCBs, can be detected in hair.[22] A study has indicated that methomyl may also be detected in hair.[23] The aim of the present work is to design and evaluate a simple method of extraction and analysis of diazinon from hair, which will assist in determining whether diazinon does accumulate in hair in measurable quantities. Rabbits were used as the animal model that would show whether diazinon accumulates in hair.

## Materials and methods

*Animals*

Three groups of white rabbits of the New Zealand variety were used for the experiment. Each group consisted of five rabbits. One was used as a control and the others received two different dosages of the pesticide in their water. The high dosage group received approximately 15 mg/kg per day and the low dosage group received 8 mg/kg per day, contained in about 100 mL of water, for a period of 4 months. Before commencing the experiment they were treated for internal and external parasites and they received antihaemorrhagic vaccine. They were kept in a 12-hour dark/light cycle and they were fed with rabbit pellets *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Veterinary Administration Office of Heraklion, Ministry of Agriculture and conformed to the National and EU directions for the care and treatment of laboratory animals

*Sample collection*

At the end of the dosing period, hair was removed from the back of the rabbits, rinsed in methanol, dried and stored at room temperature until analysis. Blood was collected from the ear veins into vacutainer tubes using 1-mL syringes and, after centrifugation, the serum was analysed immediately and then stored at $-20°C$.

*Reagents*

All solvents used were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and were supplied by Merck (New Jersey, USA). The pesticides diazinon and fenthion were of analytical grade and a generous donation of Ciba Geigy Hellas S.A. (Anthousa, 153 44 Greece).

*Serum cholinesterase measurements*

The activity of acetyl cholinesterase was determined at the beginning and at the end of the dosing period, using a kit from Roche (Basil, Switzerland). Blood samples were centrifuged immediately in order to obtain serum and the instructions of the kit were followed precisely. The activity was determined spectrophotometrically at 405 nm (Jasco 7800 Model, UV/Visible spectrophotometer, Tokyo, Japan). Reference values for humans range between 5300 and 12 900 U/I. Reference values for the rabbits ranged between 404 and 500 U/I. Absorbance measurements were performed against distilled water. Student's $t$-test was applied for the statistical analysis of the results. The results were considered as significantly different when the $P$-value was smaller than 0.05.

*Diazinon extraction from hair*

The efficiency of the extraction methods was tested on fortified hair. Three methods were applied for the extraction of diazinon from hair.[22] Acidic and basic hydrolysis proved to be very harsh for the pesticide and as a result it could not be detected in any of the chromatograms. Methanolic extraction of the pesticide from hair proved to be the most suitable.

Initially, 100 mg of hair was weighed and pulverized in a ball mill homogenizer. The powder was transferred in a test tube with 2 mL of methanol together with the internal standard (2 ng/mg final concentration fenthion) and was incubated at 37°C overnight. The supernatant was transferred to a clean test tube and methanol was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. The residue was resuspended in 2 mL of HPLC grade water and liquid–liquid extraction followed with 3 mL of ethyl acetate twice. The organic phase was transferred to a clean test tube and evaporated to dryness under nitrogen. The residue was resuspended in 50 μL of ethyl acetate and analysed by gas chromatography–nitrogen phosphorus detector (GC-NPD) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS).

*GC-NPD analysis*

One microlitre of the test solution was injected in the splitless mode, in a Carlo Erba GC 6000 Vega Series 2 instrument (Milan, Italy), which was coupled to an NPD and was equipped with a DB-1 30 m × 0.32 mm capillary column (J&W Scientific, Folsom, USA). The conditions of analysis were as follows. Column temperature started at 180°C, where it remained for 3 min. Then it increased up to 230°C at a rate of 5°C/min, steady for 5 min and finally it increased up to 265°C, at a rate of 10°C/min, where it remained for 15 min. The injector temperature was set at 250°C and the detector temperature was set at 290°C. Helium with a flow rate of 2.1 mL/min was used as a carrier gas. Under

UNCORRECTED PROOF

these conditions, diazinon eluted at time $t = 25.49$ min, and fenthion eluted at time $t = 33.57$ min. The diazinon hair concentrations were compared by Student's $t$-test. The difference was significant when the $P$-value was smaller than 0.05.

*GC-MS analysis*

Electron ionization mass spectrometric analysis of hair extracts was performed on a Finnigan Mat GCQ system (Austin, USA) equipped with a AT-5 MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) capillary column supplied by Alltech (Deerfield, USA). Pure helium with a velocity of 20 cm/s was used as a carrier gas. One microlitre of the solution was injected into the system in the splitless mode and was analysed under the following conditions: the column temperature was initially held at 180°C for 3 min, raised to 230°C at 10°C/min, held for 2 min, and was finally raised to 300°C, at 20°C/min, where it remained stable for 2 min. The injector temperature was 200°C. The transfer line temperature was set at 275°C. The mass spectrometer acquisition parameters were: ion source 200°C, electron impact ionization at 70 eV and electron multiplier voltage of 1200 V. The mass spectrometer was operated at the selected ion-monitoring mode and programmed for the detection of $m/z$ 179 and 304 for diazinon, and 278 for fenthion. Under these conditions diazinon eluted at time $t = 16.14$ min, and fenthion which was used as the internal standard eluted at time $t = 18.63$ min.

*Recovery experiments*

The recovery evaluation of the extraction method was performed on spiked hair. It was experimentally determined at two concentration levels. The pesticide was added to 100 mg of blank hair, to the final concentrations of 0.6 and 1 ng/mg hair. In the first case the pesticide and the internal standard were added at the beginning of the extraction procedure, while in the second the hair was treated in an identical manner to the first but the analytes were added in the last step. The extracts were analysed by GC-NPD analysis. The ratio of the area of the analyte to that of the internal standard was calculated for each concentration point of the two groups. Then the ratio given for the first group was divided by that of the corresponding concentration given by the second group in order to determine the recovery ratio, which was then multiplied by 100 in order to find the percentage recovery.[24]

Quantification of the pesticide was done by GC-NPD. GC-MS analysis was only performed on selected samples for confirmation. An eight-level calibration curve was prepared using methanolic standard solutions in order to evaluate the method. The curve was linear between the concentrations 0.1 and 1 ng/mg (Figure 1).

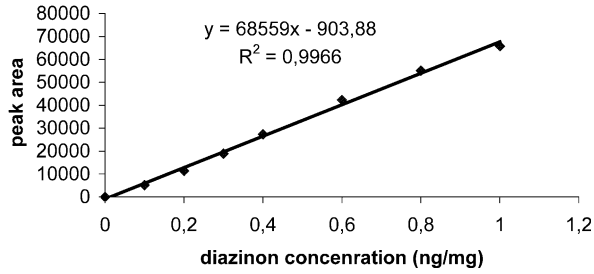



**Figure 1** Diazinon GC-NPD calibration curve

## Results

The results depicted in Table 1 show that acetyl cholinesterase activity was 468 ± 118 I/U in the control group, 401 ± 48 I/U in the low-dose treatment group and 245 ± 68 I/U in the high-dose treatment group. The activity of the enzyme was significantly decreased in both treated groups.

Hair analysis was performed using GC-NPD (Table 2, Figure 2) for quantification and GC-MS for confirmation (Figure 3). Each sample was measured in triplicate. Blank samples from the untreated animals were run to ensure lack of interference.

The recovery of the target compounds with the employed method was estimated as 69%. The standard curve prepared for the sample quantification was linear between the concentrations 0.1 and

**Table 1** Blood acetyl cholinesterase measurements, performed at the end of the dosing period

| *Group* | *Rabbit* | *Blood acetyl cholinesterase I/U* | *Group mean values* | *t-test P-value*[a] |
|---|---|---|---|---|
| Untreated | 1 | 490 ± 2 | 468 ± 118 | |
| | 2 | 501 ± 6 | | |
| | 3 | 445 ± 5 | | |
| | 4 | 404 ± 3 | | |
| | 5 | 500 ± 10 | | |
| Low dose | 1 | 460 ± 8 | 401 ± 48 | 0.046 |
| | 2 | 388 ± 7 | | |
| | 3 | 333 ± 4 | | |
| | 4 | 427 ± 6 | | |
| | 5 | 397 ± 3 | | |
| High dose | 1 | 280 ± 2 | 245 ± 68 | 0.04 |
| | 2 | 430 ± 3 | | |
| | 3 | 168 ± 4 | | |
| | 4 | 220 ± 2 | | |
| | 5 | 127 ± 5 | | |

[a] Significance levels estimated for high- and low-dose groups compared with the untreated group; $n = 5$. The values given are the mean of three measurements. The group values are the mean of group measurements.

UNCORRECTED PROOF

**Table 2** Diazinon hair concentrations, at the end of dosing period, measured by GC-NPD

| *Rabbit* | *Hair concentration ng/mg hair ± SD by GC-NPD* | *Group mean value ± SD* | *t-test P-value*[a] |
|---|---|---|---|
| Untreated 1–5 | 0–0 | 0 | |
| Low dose 1 | 0.14 ± 0.03 | | |
| 2 | 0.16 ± 0.04 | | |
| 3 | 0.24 ± 0.04 | 0.17 ± 0.05 | |
| 4 | 0.11 ± 0.03 | | 0.023 |
| 5 | 0.18 ± 0.05 | | |
| High dose 1 | 0.21 ± 0.02 | | |
| 2 | 0.23 ± 0.05 | | |
| 3 | 0.26 ± 0.04 | 0.23 ± 0.02 | |
| 4 | 0.24 ± 0.03 | | |
| 5 | 0.22 ± 0.02 | | |

[a] Significance levels estimated between the high and low dose groups, $n = 5$. The values given are the mean of three measurements per sample.

**Figure 2** GC-NPD chromatogram of diazinon hair extract from high dose treated animal 1 spiked with fenthion. Retention time for diazinon was 25.45 min and for fenthion 33.57 min.

1 ng/mg, had a value of $R^2 = 0.9966$ and the equation describing the line was $y = 68559x - 903.88$, where y = diazinon peak areas and x = diazinon concentration (Figure 1). The limit of quantification was 0.05 ng/mg for the NPD measurements.

The concentration of diazinon in the hair of the exposed rabbits, measured by GC-NPD, ranged between 0.11 and 0.26 ng/mg hair. In the low-dose treatment group, the mean concentration measured was 0.17 ± 0.05 ng/mg hair, while in the high-dose treatment group it was 0.23 ± 0.02 ng/mg hair.

## Discussion

Diazinon exerts its pesticidal action mainly through the inhibition of the enzyme acetylcholinesterase. Blood acetylcholinesterase activity measurements were an indication of the intoxication of the treated animals. As indicated by the results, the activity of the enzyme in both treatment groups was significantly decreased and the decrease was related to the administered dose. There is some indication that apart from the effects on the target enzyme, chronic exposure to low levels of diazinon may result in series of adverse effects such as reduced bone formation.[25] As a result a method that is suitable to measure chronic exposure to the pesticide is necessary.

In recent years hair has been a matrix that is extensively studied in order to assess chronic exposure to various chemicals, the best studied being drugs of abuse. A literature research has revealed that apart from a study about methomyl disposition in rabbit hair performed in our lab,[23] the disposition of organophosphate or carbamate pesticides in hair of subjects systemically exposed has not been studied at all. On the other hand a lot of work has been done to measure the concentration of heavy metals like mercury[26]and pesticides such as lindane[27] or environmental pollutants like PCBs[22] in hair.

The main aim of the present work was to determine whether diazinon can be detected in the hair after chronic exposure and if there is a relationship between the diazinon dose administered for a certain time period and the pesticide concentration measured in hair. Since a literature search revealed no analytical method to measure the pesticide in hair, it was necessary to establish and evaluate a simple method by which diazinon may be extracted from hair and measured reliably. Hair samples were removed from the back of the rabbits and analysed as a total. Three methods were applied for the extraction of diazinon in hair. The pesticide proved to be unstable in acidic and alkaline hair hydrolysis. As a result no peak was detected in the chromatograms. Also prolonged incubation at 40°C or more decreased the recovery of the analytes of interest. The described method of extraction proved to be easy and reliable enough, giving a mean recovery of 69%. It takes advantage of the great solubility of diazinon in organic solvents such as methanol and ethylacetate. Methanol is very efficient to extract the compounds of interest from the hair matrix without destroying them. During the liquid–liquid extraction step, most of it moves from the aqueous phase to the ethylacetate phase. It has to be pointed out though that due to the lack of reference material, it could not be verified whether we had an efficient extraction of the trapped compound from the hair or just a method that does not destroy the compounds of interest once present in solution.

Quantitative analysis was facilitated by the use of GC-NPD, a very selective detector of compounds that contain nitrogen and phosphorus; as a result the chromatograms were almost free of interference peaks.

As can be seen from the results, diazinon can be detected in hair samples of the exposed animals.

UNCORRECTED PROOF

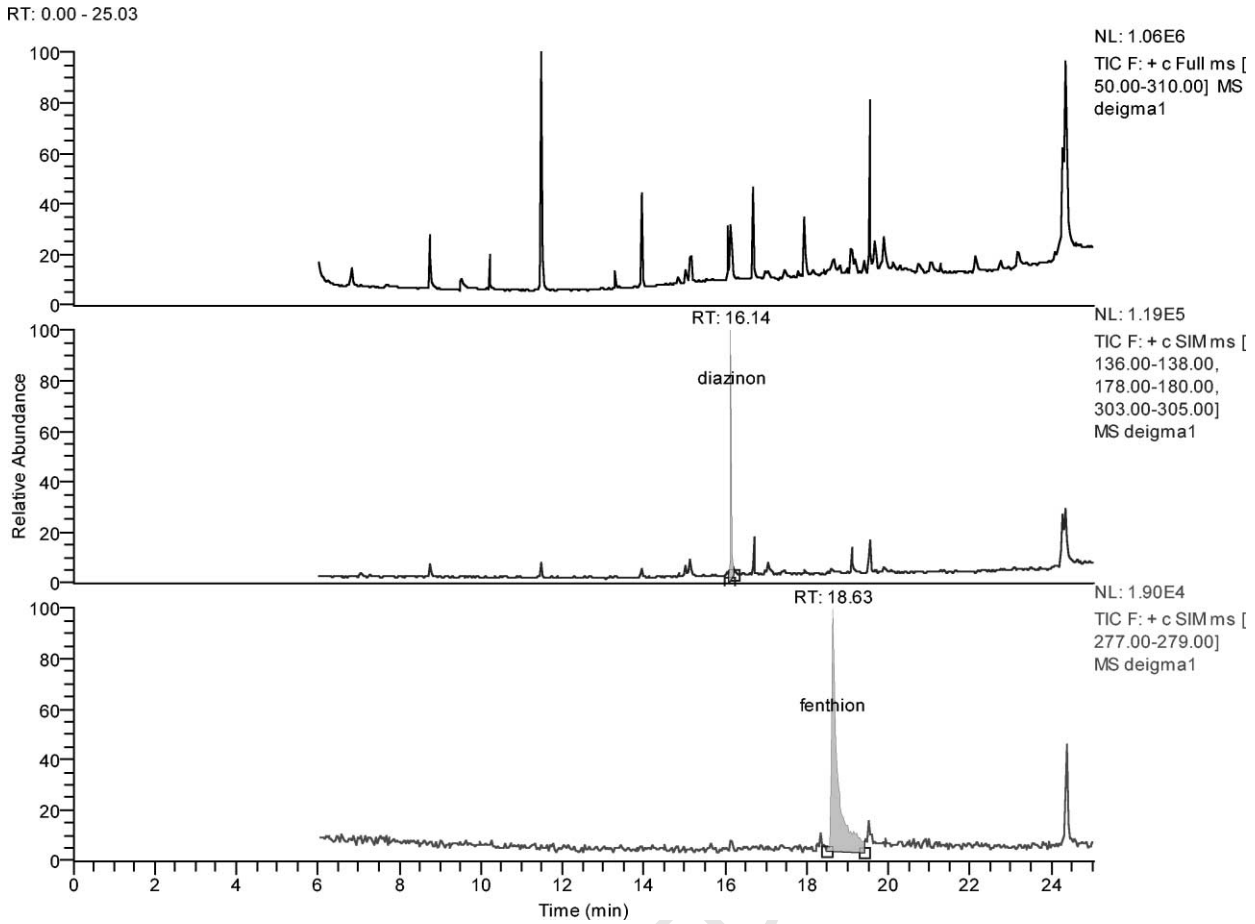



**Figure 3** GC-MS chromatogram (full scan and SIM mode) of the diazinon hair extract from high dose treated animal 1, spiked with fenthion

Also the results indicate that the concentration in hair is related to the administered dose. In this experiment white animals were used. The generally low concentrations of the trapped pesticide in hair could be attributed to the absence of melanin. Melanin of the hair is known to be a binding site for the trapped drugs. Therefore, it would be very interesting to examine the effect that hair colour may exert on the concentration of the measured compound, since previous studies with other compounds have indicated that the colour of hair influences the amount of the bound drug.[24,28]

Overall, our report supports the idea of using hair testing as a marker for the exposure history of an individual to organophosphate pesticides. Of course various issues such as the effect of hair growth rate or the effect of hair colour on the concentration of the drug in hair must be clarified before quantitative assessment of exposure to pesticides using hair can be discussed.

UNCORRECTED

## References

1 Martin H ed. *The pesticide manual*, first edition. Droitwitch: BCPC, 1968.
2 Ecobichon DJ. Pesticide use in the developing countries. *Toxicology* 2001; **160**: 27–33.
3 Watterson AE. Regulating pesticides in the UK: A case of risk management problems relating to the organophosphate diazinon. *Toxicol Lett* 1999; **107**: 241–48.
4 Dolapsakis G, Vlachonikolis IG, Varveris C, Tsatsakis AM. Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete. *Eur J Cancer* 2001; **37:** 1531–36.
5 Hayes AL, Wise RA, Weir FW. Assessment of occupational exposure to organophosphates in pest-control operators. *Am Ind Hyg Assoc J* 1980; **41**: 568–75.
6 Tsatsakis AM. Experiences with acute organophosphate poisonings in Crete. *Vet Hum Toxicol* 1996; **38**: 101–107.
7 Tsatsakis AM, Tsakalof AK, Siatitsas Y, Michalodimitrakis EN. Acute poisoning with carbamate pesticides:

the Cretan experience. *Sci Justice* 1996; **36**: 35–39.

8 Tsatsakis AM, Manousakis A, Anastasaki M. Clinical and toxicological data in fenthion and omethoate acute poisoning. *J Environ Sci Health* 1998; **B33**: 657–70.

9 Tsatsakis AM *et al.* Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption. *Bull Environ Contam Toxicol* 2001; **66**: 415–20.

10 Holmsted B. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol Rev* 1959; **11**: 567–688.

11 Sams C, Mason HJ, Rawbone R. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicol Lett* 2000; **116**: 217–21.

12 Gallo MA, Lawryk NJ. Organic phosphorus pesticides. In Hayes WJ, Laws ER eds. *Handbook of pesticide toxicology*. New York: Academic Press, 1991.

13 Seifert J, Pwenim T. Alteration of mice L-tryptophan metabolism by the organophosphorus acid triester diazinon. *Biochem Pharmacol* 1992; **44**: 2243–50.

14 IPCS. *Diazinon: environmental health criteria*, volume 198. Geneva: WHO, 1998.

15 Hamm JT, Hinton DE. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat Toxicol* 2000; **48**: 403–18.

16 Cone EJ, Darwin WD, Wang WL. The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. *Forensic Sci Int* 1993; **63**: 55–68.

17 Goldberger BA, Caplan YH, Maguire T, Cone EJ. Testing human hair for drugs of abuse III. Identification of heroin and 6-acetyl-morphine as indicators of heroin use. *J Anal Toxicol* 1991; **15**: 226–31.

18 Jurado C *et al*. Hair testing for cannabis in Spain and France: is there a difference in consumption? *J Anal Toxicol* 1996; **20**: 111–15.

19 Tsatsakis AM *et al*. Carbamazepine levels in the hair of patients under long-term treatment. A preliminary study. *Clin Chim Acta* 1997; **263**: 187–95.

20 Psillakis Th *et al.* Carbamazepine levels in head hair of patients under long-term treatment: a method to evaluate the history of drug use. *J Clin Pharmacol* 1999; **39**: 55–67.

21 Tsatsakis AM, Psilakis Th, Paritsis N. Phenytoin concentration in head hair sections: a method to evaluate the history of drug use. *J Clin Psychopharmacol* 2000; **20**: 560–73.

22 Covaci A, Tutudaki M, Tsatsakis AM, Schepens P. Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants *Chemosphere* 2002; **46**: 413–18.

23 Tsatsakis AM *et al.* Pesticides disposition in hair: Preliminary results of a model study using rabbits. *Vet Hum Toxicol* 1998; **40**: 200–203.

24 Slawson MH, Wilkins DG, Rollins DE. The incorporation of drugs into hair: relationship of hair color and melanin concentration to phencyclidine incorporation. *J Anal Toxicol* 1998; **22**: 406–13.

25 Compston JE *et al*. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. *Lancet* 1999; **354**: 1791–92.

26 Dolbec J *et al.* Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Sci Total Environ* **271**: 87–97.

27 Neuber K, Merkel G, Randow FE. Indoor air pollution by lindane and DDT indicated by head hair samples of children. *Toxicol Lett* 1999; **107**: 189–92.

28 Uematsu T, Sato R, Fujimori O, Nakashima M. Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: a possible linkage of haloperidol excretion into hair with hair pigment. *Arch Dermatol Res* 1990; **282**: 120–23.

UNCORRECTED PROOF

# Pesticide Hair Analysis: Development of a GC–NCI–MS Method to Assess Chronic Exposure to Diazinon in Rats

**Maria Tutudaki** and **Aristidis M. Tsatsakis***

*Centre of Toxicology Science and Research, Medical School, University of Crete, Voutes, Heraklion, 714 09 Crete, Greece.*

## Abstract

**The present study aimed to improve the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) method, already developed in our laboratory, for trace analysis of diazinon in hair. Furthermore it aimed to compare the disposition of the pesticide in the hair of two different animal species, one susceptible to diazinon toxicity and one resistant, under identical experimental conditions. Sprague Dawley rats were systemically exposed to two dose levels (6 mg/kg/day and 3 mg/kg/day) of the pesticide, through their drinking water, for a period of one and a half months. Hair samples from the back of the rats were removed before commencing the experiment and at the end of the dosing period. Diazinon was selectively isolated from pulverized hair, sample or spiked, by stepwise consequent extractions with methanol and ethyl acetate and quantified by gas chromatography–negative chemical ionisation–mass spectrometry. It was found that the concentration of diazinon in the hair of exposed animals was dose dependent and was found to be 0.24 ± 0.01 ng/mg (*n* = 5) and 0.53 ± 0.05 ng/mg (*n* = 5) for the low and high dosage, respectively. The concentration in both dose groups was much higher than the corresponding rabbit hair (rabbits were exposed to the pesticide under similar experimental conditions) as previously reported. Our results strongly point to the possibility of using hair analysis for low-level exposure monitoring to diazinon.**

## Introduction

Diazinon is still a widely used organophosphate pesticide and one of the most popular ones in Crete. It is classified in toxicity class II, moderately toxic (1). Diazinon is used to control cockroaches, silverfish, ants, and fleas in residential and non-food service buildings. It is also used on home gardens and farms to control a wide variety of suckling and leaf-eating insects. There is the potential of exposure to a large proportion of the population, the most prone to exposure being those working in the agriculture and chemical industry (2–5).

Diazinon exerts its action by the phosphorylation of acetyl cholinesterase (resulting in inhibition of the enzyme), acetylcholine accumulation, and altered cholinergic neurotransmission (6). Although it is not a potent enzyme inhibitor itself, in animals, including humans, it is biotransformed by cytochrome P450 (7) to diazoxon, a very strong enzyme inhibitor (8). The acute toxicity of diazinon is not very high, but chronic exposure to the compound (even at very low levels) may cause a series of adverse effects (9,10). Studies have indicated that it may be mutagenic, or cause developmental toxicity in various animal species (11) The enzyme paraoxonase I is thought to play a protective role against low levels chronic exposure to organophosphates, including diazinon, by hydrolyzing diazoxon (12,13). All the above indicate the necessity of an easy, non-invasive method of assessing chronic exposure to the pesticide.

Segmental hair analysis has been successfully used to assess chronic exposure to various chemicals such as drugs of abuse (14), pharmaceuticals (15), heavy metals (16), etc. It has been shown that several environmental pollutants such as organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls can be detected in hair (17). A study has indicated that methomyl may also be detected in hair (18). There were two main goals of the present study. The first was to improve the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analytical method already developed in this laboratory for the trace analysis of diazinon in hair. The second was to compare the disposition of the pesticide in hair of two different animal species, one susceptible to diazinon toxicity (19) and one resistant, under identical experimental conditions. Sprague Dawley rats were used as the pesticide resistant animal model.

## Experimental

### Animals

Three groups of Sprague Dawley rats were used for the experiment. Each group consisted of 5 rats. One was used as a control, and the others received two different doses of the pesticide in their water. The high-dose group received approximately 6 mg/kg/day and the low-dose group received 3 mg/kg/day, contained in approximately 20 mL water, for a period of 45 days. The selected doses were at least 10 times less

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: aris@med.uoc.gr.

Reproduction (photocopying) of editorial content of this journal is prohibited without publisher's permission.

than the literature reported $LD_{50}$. The animals were kept in a 12-h dark/light cycle and were fed with food pellets ad libitum.

The experimental protocol was approved by the Veterinary Administration Office of Heraklion, Ministry of Agriculture and conformed to the National and E.U. directions for the care and treatment of laboratory animals.

### Sample collection

Hair was removed from the back of the rats at the beginning of the dosing period and at the end of it, rinsed in water and methanol (to exclude external contamination), dried at 40°C for 30 min (in order to remove the solvent residues), and stored in sealed plastic containers at room temperature until analysis.

### Reagents

All solvents used were of high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and were supplied by Merck. The pesticides diazinon and fenthion were of analytical grade and a generous donation of Ciba Geigy Hellas S.A. (Anthousa, Greece) and Bayer Hellas (Akakion 54A, Polydroso, Attiki, Greece).

## Methods

### Diazinon extraction from hair

Initially, 50 mg of hair was weighed out and pulverized in a ball mill homogeniser (Bioblock Scientific). The powder was transferred in a test-tube with 2 mL of methanol together with the internal standard (10 ng/mg final concentration fenthion) and was sonicated in an ultrasonic bath for 6 h. The samples were then centrifuged, and the supernatant was transferred to a clean test-tube through a sartorius filter. Methanol was evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. The residue was resuspended in 2 mL of HPLC-grade water, liquid–liquid extraction followed, with 3 mL of ethyl acetate twice. The combined organic phases were transferred to a clean test-tube, evaporated to a final of volume of 50 µL and analyzed by GC–MS.

### GC–negative chemical ionization (NCI)-MS analysis

GC–NCI–MS analysis of hair extracts was performed on a Finnigan Matt GCQ ion trap system equipped with a DB-5 MSITD (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) capillary column. Pure helium with a velocity of 20 cm/sec was used as a carrier gas. One microliter of the solution was injected into the system in the splitless mode and was analysed under the following conditions: the column temperature was initially held at 110°C for 4 min, raised to 200°C at 10°C/min, held for 3 min, and was finally raised to 300°C at 20°C/min, where it remained stable for 2 min. The injector temperature was 200°C. The transfer line temperature was set at 275°C. The MS acquisition parameters were: ion source 200°C, electron impact (EI) ionization at 70 eV, and electron multiplier voltage of 1200 V. The MS was operated at the selected-ion monitoring (SIM) mode and programmed for the detection of *m/z* 169 for diazinon and 263 for fenthion. The total cycle time was approximately 30 min. Methane was used as the ionizing gas. Under these conditions, diazinon eluted at time t = 16.12 ± 0.02 min, and fenthion, which was used as the internal standard, eluted at time t = 18.57 ± 0.04 min.

### Method Validation

*Extraction Recovery.* The recovery evaluation of the extraction method was performed on spiked hair. It was experimentally determined at two concentration levels. The pesticide was added to 50 mg of blank hair to the final concentrations of 0.60 and 1.00 ng/mg hair. In the first case, the pesticide and the internal standard were added at the beginning of the extraction procedure, while in the second the hair was treated in an identical manner to the first but the analytes were added in the last step. The ratio of the area of the analyte to that of the internal standard was calculated for each concentration point of the two groups. Then the ratio given for the first group was divided by the corresponding one of the second group in order to determine the recovery ratio, which was then multiplied by 100 in order to find the percentage recovery.

*Linearity.* A 6 level calibration curve was prepared using hair samples spiked with known concentrations of diazinon and internal standard. The curve was linear between the concentrations 0.0 and 1.0 ng/mg (Figure 1).

*Method stability evaluation.* Sensitivity and reproducibility were evaluated in the SIM mode in spiked hair samples, at two concentration levels, 0.6 ng/mg and 1 ng/mg hair. Within-day and between-days standard deviations are presented in Table I. Within-day variation was estimated by injecting the

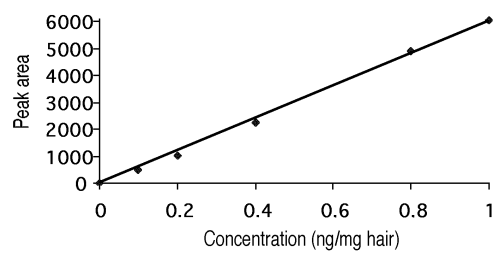



**Figure 1.** Diazinon calibration curve.

**Table I. Extraction and GC–NCI–MS Analysis Method Validation Parameters**

| Concentration (ng/mg) | Recovery (%) | Quantitation limit ng/mg | $R^2$ coefficient | Accuracy and precision Mean concentration (ng/mg) ± SD* (conc.) *n* = 4 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Within-day | Between-day |
| 1.0 | 73 | 0.1 | 0.9976 | 1.0 ± 0.14 | 0.95 ± 0.12 |
| 0.6 | 65 | 0.1 | 0.9976 | 0.6 ± 0.09 | 0.50 ± 0.09 |

* SD = standard deviation.

same sample four times during one working day. Between-day variation was estimated using the same sample during four consecutive days.

## Results

Each sample was measured in triplicate, and the concentrations reported are the mean values of three measurements ± the standard deviation. Blank samples from the untreated animals were run to ensure lack of interference.

The recovery of the target compounds with the employed method was 69.0 ± 4.0 %. The standard curve prepared for the sample quantification was linear between the concentrations 0.00 to 1.00 ng/mg and approached an excellent fitting ($R^2$ = 0.9976) (Figure 1). The limit of quantification (LOQ) was 0.1 ng/mg

A picture of the analytical results is presented in Figures 2 and 3. Figure 2 exhibits the chromatogram obtained from the hair sample of low dose animal 1, in NCI mode. Figure 3 exhibits the results from the analysis of the same hair sample in EI mode.

The concentration of diazinon in the hair of the exposed rats ranged between 0.23–0.61 ng/mg hair. In the low-dose treatment group, the mean concentration measured was 0.24 ± 0.01 ng/mg hair, while in the high-dose treatment group it was 0.53 ± 0.05 ng/mg hair (Table II).

Difference of pesticide concentrations between the high- and low-dose groups was estimated using an independent sample t-test (2-sided). The estimated difference was statistically significant [t = –12,01, degrees of freedom (df) = 8, $p < 0.001$]. One-sample t-test was also used to compare the concentrations of low-dose exposure rats versus controls. Results showed that there is a statistically significant difference (t = 66,68, df = 4, $p < 0.001$).

This verified that diazinon concentration in hair was dose related. Consequently diazinon quantification in hair can be employed for exposure assessment.

## Discussion

Diazinon is a very effective and widely used pesticide. It exerts its pesticidal action mainly through the inhibition of the enzyme acetyl cholinesterase and is reported to induce intermediate syndrome in humans (6). There is strong indication that several other important enzymes such as fatty acid amide hydrolase, an enzyme regulating the activity of endogenous

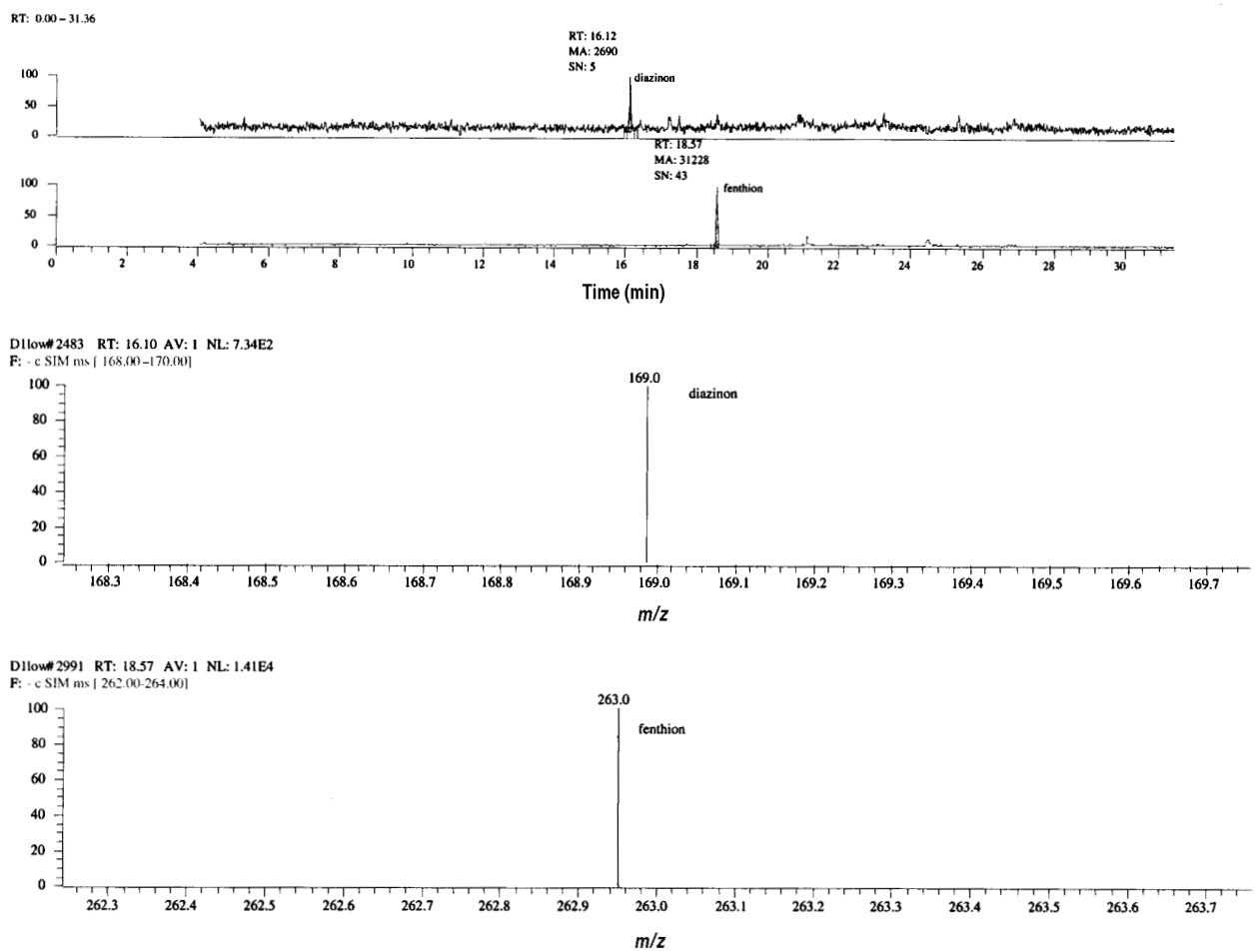



**Figure 2.** GC–MS chromatogram of real hair sample coming from low dose rat 2 in NCI mode.

compounds involved in sleep induction and analgesia, is affected by diazinon and other organophosphates (20).

Chronic exposure to low levels of diazinon may result in a series of other adverse effects such as reduced bone formation (21) or alterations in the immune system (22). These findings indicate the necessity of low level chronic diazinon exposure monitoring. Hair is a matrix that has been excessively studied for the assessment of chronic exposure to several substances (23,24).

The main objectives of the present study were to develop a sensitive and selective method for the analysis of diazinon in hair and to compare the results obtained in this experiment to those obtained from a previous study in rabbits (19). This should give an indication of the effect of metabolic species differences on the concentration of the pesticide detected in hair. In both experiments white animals were used.

No segmental analysis was performed because of the way hair grows in rats. When the rats were shaved, the hair did not grow back in the normal way. Long hair appeared that condensed gradually. They were shaved again when the hair grew back to normal.

At the end of the dosing period, which coincided with the time needed for the hair to fully grow back, hair was removed again and analyzed as described.

GC–NCI–MS analysis in the SIM mode (Figure 2) proved to be much more sensitive than GC–EI-MS analysis in the SIM mode (Figure 3). Both figures show the chromatogram ob-

**Table II. Diazinon Concentration in the Hair of the Exposed Rats**

| Sample | Diazinon concentration ng/mg Hair | Group Mean ng/mg Hair ± SD* |
|---|---|---|
| *Control group* | *0* | *0*† |
| Low dose rat 1 | 0.24 | |
| Rat 2 | 0.25 | |
| Rat 3 | 0.25 | 0.24 ± 0.01‡ |
| Rat 4 | 0.24 | |
| Rat 5 | 0.23 | |
| High dose 1 | 0.61 | |
| Rat 2 | 0.53 | |
| Rat 3 | 0.47 | 0.53 ± 0.05 |
| Rat 4 | 0.50 | |
| Rat 5 | 0.55 | |

* SD = standard deviation.
† $p < 0.001$. *p*-Value estimated by comparing low dose rat group to control rat group, using an one sample *t*-test.
‡ $p < 0.001$. *p*-Value estimated by comparing low and high dose group rats using an independent sample *t*-test.

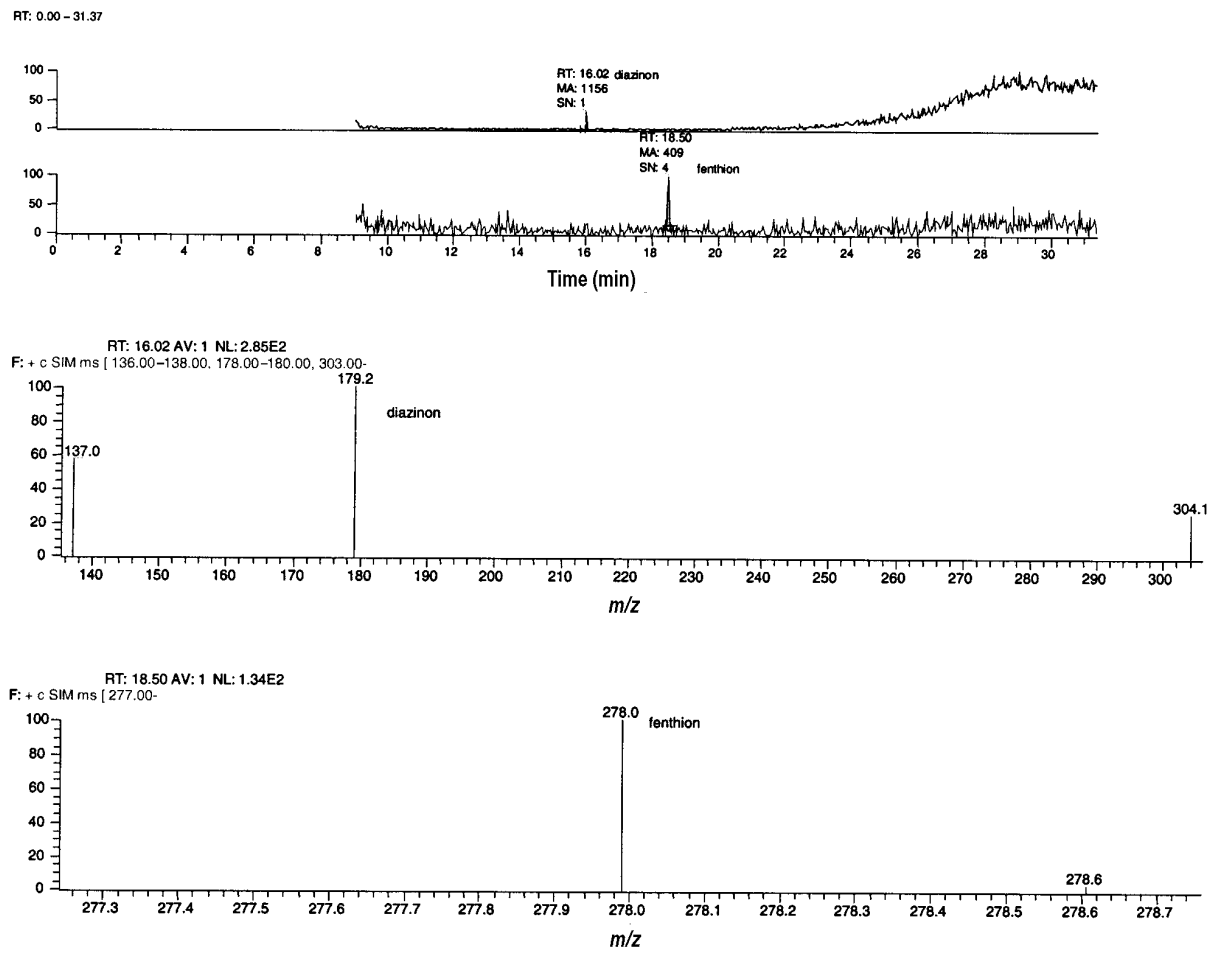



**Figure 3.** GC–MS chromatogram of real hair sample coming from low dose rat 2 in EI mode.

tained from hair sample of low-dose animal 1. The difference probably arises because of the higher fractionation that occurs in the EI mode and although it may not be so impressive, it is critical when quantification close to LOQ. is required. The problem we faced here was that no libraries exist for this mode of analysis. This was overcome by running high concentrations (µg/mL) of standard solutions in full scan. The masses obtained from each peak were used in the SIM mode.

The concentrations detected in the hair of the treated animals ranged from 0.23 to 0.25 ng/mg (mean value 0.24 ng/mg hair) for the low-dose group, and 0.47–0.61 (mean value 0.53 ng/mg hair) for the high-dose group. When those values were compared to those obtained in a similar study that used rabbits, it was evident that much higher concentrations of the pesticide were measured in the hair of the rats, although they received only one third of the rabbit dose. Rabbits received 15 and 8 mg/kg body weight of the pesticide daily. The mean concentration for the low group in the study of rabbits was 0.17 ng/mg hair while for the high dose group it was 0.23 ng/mg hair. Because white animals were used in both studies, this difference may be attributed to the interspecies variation in the pesticide metabolizing enzymes. Rabbits are known to be more effective than rats at biotransforming diazinon to diazoxon. As a result, rats are quite resistant to diazinon ($LD_{50}$ = 300 mg/kg body weight) while rabbits are more susceptible ($LD_{50}$ = 130 mg/kg body weight).

In conclusion, our results strongly point to the possibility of using hair analysis for low-level exposure monitoring to diazinon. Before extrapolating the results to other species and humans, factors such as metabolic differences and the effect that hair color may have on the concentration of the detected pesticide in hair need to be studied.

## Acknowledgments

The authors would like to express their gratidude to Thanasis Alegakis PhD for his valuable assistance in revising the article. This work has been supported by a grant from the General Secretariat for Science and Technology of Greek Ministry of Energy and Technology (EPET II, PEP).

## References

1. IPCS. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard, and Guidelines to Classification 2000-2002*. WHO, Geneva, Switzerland, 2002.
2. D.J. Ecobichon. Pesticide use in the developing countries. *Toxicology* **160:** 27–33 (2001).
3. A.E Watterson. Regulating pesticides in the UK: A case of risk management problems relating to the organophosphate diazinon. *Toxicol. Lett.* **107:** 241–248 (1999).
4. A.M. Tsatsakis. Experiences with acute organophosphate poisonings in Crete. *Vet. Hum. Toxicol.* **38:** 101–107 (1996).
5. A.L. Hayes, R.A. Wise, and F.W. Weir. Assessment of occupational exposure to organophosphates in pest-control operators. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **41(8):** 568–575 (1980).
6. B. Holmsted. Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. *Pharmacol. Rev.* **11:** 567–688 (1959).
7. C. Sams, H.J. Mason, and R. Rawbone. Evidence for the activation of organophosphate pesticides by cytochromes P450 3A4 and 2D6 in human liver microsomes. *Toxicol. Lett.* **116:** 217–221 (2000).
8. M.A. Gallo and N.J. Lawryk. "Organic phosphorus pesticides". In *Handbook of Pesticide Toxicology*, W.J. Hayes and E.R. Laws, Eds. Academic press, New York, NY, 1991.
9. J. Seifert and T. Pwenim. Alteration of mice L-tryptophan metabolism by the organophosphorus acid triester diazinon. *Biochem. Pharmacol.* **44(11):** 2243–2250 (1992).
10. IPCS. *Diazinon: Environmental Health Criteria **198***. WHO, Geneva, Switzerland, 1998.
11. J.T. Hamm and D.E. Hinton. The role of development and duration of exposure to the embryotoxicity of diazinon. *Aquat. Toxicol.* **48:** 403–418 (2000).
12. B.N. La Du, M. Aviram, S. Billecke, M. Navab, S. Primo-Parmo, R.C. Sorenson, and T.J. Standiford. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem. Biol. Interact.* **119-120:** 379–388 (1999).
13. L.G. Costa, W.F. Li, R.J. Richter, D.M. Shih, A. Lusis, and C.E. Furlong. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem. Biol. Interact.* **119-120:** 429–438 (1999).
14. B.A. Goldberger, Y.H. Caplan, T. Maguire, and E.J. Cone. Testing human hair for drugs of abuse III. Identification of heroin and 6-acetyl-morphine as indicators of heroin use. *J. Anal. Toxicol.* **15:** 226–231 (1991).
15. T. Psillakis, A.M. Tsatsakis, P. Christodoulou, M. Michalodimitrakis, N. Paritsis, and E. Helidonis. Carbamazepine levels in head hair of patients under long-term treatment: a method to evaluate the history of drug use. *J. Clin. Pharmacol.* **39(1):** 55–67 (1999).
16. J. Dolbec, D. Mergler, F. Larribe, M. Roulet, and M. Lucotte. Sequential analysis of hair mercury levels in relation to fish diet of an Amazonian population, Brazil. *Sci. Total Environ.* **271:** 87–97 (2001).
17. A. Covaci, M. Tutudaki, A.M. Tsatsakis, and P. Schepens. Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants. *Chemosphere* **46:** 413–418 (2002).
18. A.M. Tsatsakis, M.I. Tutudaki, M.N. Tzatzarakis, K. Psaroudakis, G. Dolapsakis, and M.N. Michalodimitrakis. Pesticides disposition in hair: Preliminary results of a model study using rabbits. *Vet. Hum. Toxicol.* **40(4):** 200–203 (1998).
19. M. Tutudaki, A.K. Tsakalof, and A.M. Tsatsakis. Hair analysis used to assess chronic exposure to the organophosphate diazinon: a model study with rabbits. *Hum. Exp. Toxicol.* **22:** 159–164 (2003).
20. G.B. Quistad, S.E. Sparks, and J.E. Casida. Fatty acid amide hydrolase inhibition by neurotoxic organophosphorus pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **173:** 48–55 (2001).
21. J.E. Compston, S. Vedi, A.B. Stephen, S. Bord, A.R. Lyons, S.J Hodges, and B.E. Scammell. Reduced bone formation after exposure to organophosphates. *Lancet* **354:** 1791–1792 (1999).
22. R.D. Handy, H.A. Abd-El Samei, M.F.F. Bayomy, A.M. Mahran, A.M. Abdeen, and E.A. El-Elaimy. Chronic diazinon exposure: pathologies of spleen, thymus, blood cells, and lymph nodes are modulated by dietary protein or lipid in the mouse. *Toxicology* **172:** 13–34 (2002).
23. K. Neuber, G. Merkel, and F.E. Randow. Indoors air pollution by lindane and DDT indicated by head hair samples of children. *Toxicol. Lett.* **107:** 189–192 (1999).
24. T. Uematsu, R. Sato, O. Fujimori, and M. Nakashima. Human scalp hair as evidence of individual dosage history of haloperidol: a possible linkage of haloperidol excretion into hair with hair pigment. *Arch. Dermatol. Res.* **282:** 120–123 (1990).

Manuscript recieved June 13, 2003
Revison recieved March, 17 2005

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®

Forensic Science International xxx (2004) xxx–xxx

Forensic Science International

www.elsevier.com/locate/forsciint

# Progress in pesticide and POPs hair analysis for the assessment of exposure

Aristidis Tsatsakis*, Maria Tutudaki

*Department of Medicine, Centre of Toxicological Sciences and Research, School of Health Sciences, University of Crete, Voutes Heraklion, 71409 Crete, Greece*

**Abstract**

The present paper reviews the work that has been done in the field of pesticide and persistent organic pollutants (POPs) hair analysis during the last 15 years. It summarizes the compounds of interest, the methods of analyte extraction from the hair matrix, the analytical techniques employed and the results obtained. The most widely studied POPs are the polychlorinated dibenzodioxins (PCDDs), the dibenzofurans (PCDFs) the co-planar biphenyls (co-PCBs) and total biphenyls (PCBs). The most widely studied pesticides are the organochlorine ones, like the hexachlorocyclohexanes and the DDTs, which nowadays are only found as environmental pollutants, some organophosphates, selected pyrethroids and the carbamate methomyl. The most widely applied technique was gas chromatography (GC) coupled to mass spectrometry (MS). Other detectors like the ECD in the case of organochlorine analysis and the NPD in the case of organophosphate analysis were also used. The presented data concern human and animal studies. The levels of DDTs detected in hair were between 19 and 400 ng/g, of co-PCBs 0.27 and 0.45 ng/g, of total PCBs 5–13 ng/g of PCDDs and PCDFs 0.1–10 pg/g of lindane 20–400 ng/g of HCHs 14–40 ng/g of diazinon 110–520 ng/g and of methomyl 900–1800 ng/g. These results strongly support the possibility of using hair as a suitable indicator for the assessment of long-term exposure to POPs and pesticides.
© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Pesticides; Organochlorines; Hair analysis; Chromatography; Mass spectrometry

## 1. Introduction

Hair analysis has been successfully used to assess chronic exposure to various chemicals. Some of the classes of chemicals that hair analysis has already given valuable information concerning exposure evaluation include drugs of abuse, medicines and environmental pollutants like heavy metals.

Quite recently the idea of using hair analysis for assessing exposure to persistent organic pollutants (POPs) like dioxins [1,2], organochlorine pesticides and PCBs [3–6] and currently used pesticides [7–10] is being explored. The earliest studies were devoted to dioxins and PCBs [11–14]. Progress in the gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) analysis has contributed a great deal to analyse trace amounts of chemicals in a complex matrix like hair.

All researchers agree that despite the difficulties faced in analysis, hair is a very convenient to obtain biological specimen. It can be collected from people over wide ranges of age, sex, residential area, eating habits and working environments. Moreover, there is no need of special apparatus for sampling of human hair.

## 2. Analysed compounds

A search in the literature has revealed that the most studied compounds are organochlorine pollutants and pesticides belonging to the families of organophosphates, carbamates and pyrethroids. More specifically, work has been done on polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), co-planar polychlorinated biphenyls (co-PCBs), total PCBs, lindane, DDTs,

* Corresponding author. Tel.: +30 2810 394679; fax: +30 2810 542098.
*E-mail addresses:* aris@med.uoc.gr, tsatsaka@uoc.gr (A. Tsatsakis).

0379-0738/$ – see front matter © 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.forsciint.2004.04.036

diazinon, aldrin, chlorpyrifos, malathion, dieldrin, permethrin, cyhalothrin and methomyl. All these compounds are a cause of concern due to their high persistence in the environment in the food chain and in human tissues. Most researchers have concentrated on developing analytical methods and conducting simple pilot studies, in this way examining some of the parameters that may affect the concentration of the studied compounds in hair.

## 3. Extraction methods and recovery studies (Table 1)

A variety of extraction methods have been applied. These include acidic hydrolysis, soxhlet extraction, extraction under reflux and solvent extraction of the analytes from the solid matrix.

Schramm [1], in one of his works concerning organochlorine disposition in hair, studied external exposure of hair to the mixture of dioxins Clophen A 40. Initially Soxhlet extraction with toluene for 24 h was employed. The raw extract was further purified by a multicolumn chromatography method, including silica, activated alumina, sulphuric acid coated silica gel and lastly deactivated florisil.

Nakao et al. [2] used quite a complicated method to analyse PCDDs, PCDFs, and co-PCBs. They also examined a number of parameters, washing frequency with a commercial shampoo, various alkaline hair degradation conditions, extraction time, and presence of impurities Initially hair was extracted with 200 ml toluene for 4 h under reflux. The extract was further purified on a multilayer column containing $Na_2SO_4$, acidified silica and basic silica. The eluate was separated to three fractions by HPLC and the third fraction was analysed by GC–MS.

Neuber et al. [3] analysed the substances DDT and lindane coming from a wood preservative, in hair of preschool children. The hair was dissolved by sulphuric acid (7.1 M) at 80 °C for 1 h. The analytes of interest were then isolated by liquid–liquid extraction (LLE), using cyclohexane and the sample was analysed by GC–MS.

Liu and Pleil [4] developed a method for analysing 34 different pesticides in hair. These included organochlorines, organophosphates and pyrethroids. These were found in dirt and dog hair. The method of choice for the extraction of the analytes from the matrix was liquid–liquid extraction either with hexane alone or with hexane: ethyl acetate (4:1,v/v).

Covaci and Schepens [5] after trying several methods of extraction concluded that the simplest and most efficient one was acidic (3 N HCl) dissolution of hair matrix at 40 °C, overnight. Further cleanup included LLE with hexane:dichloromethane (4:1, v/v) and passing through acidified silica. In this work the hair content of DDTs, PCBs and HCHs in samples coming from three countries was examined [6].

Cirimele et al. [7] used a very simple extraction method to measure pesticides in hair of people working in vineyards. The method employed consisted of methanolic extraction of hair, evaporation of solvent, resolution of the residue in methanol and analysis.

Tutudaki and co-workers used a relatively simple methanolic extraction method for isolation of the organophosphate diazinon [8,9], and the carbamate methomyl [10]. The method included incubation of powdered hair in methanol at 40 °C for 6 h in an ultrasonic bath. When the sample was analysed by GC, it was further purified by liquid–liquid extraction with ethyl acetate. In the case of methomyl, methanol was evaporated; the residue was resuspended in water and analysed either by HPLC or ELISA.

Recovery efficiency studies of extraction method are mentioned in selected articles. Most of the methods claim to have a recovery between 35 and 120% (Table 1). Recovery depended on the lipophilicity of each compound, the type of extraction and the extraction time, as Nakao and co-workers and Liu and Pleil concluded.

## 4. Analytical methods (Table 2)

The method of choice for the analysis of such complicated samples seems to be gas chromatography coupled either to mass spectrometer or electron capture detector (ECD). The ECD detector offers great sensitivity and selectivity in the analysis of organochlorine compounds. For the detection of organophosphates nitrogen phosphorus detector (NPD) may also be utilized (Table 2).

The columns used are very critical for the efficient separation of the compounds of interest. Most researchers used a 30 m long column. The analytical methods had to be efficient enough to detect the analytes at the pg/g level (Table 2). The sample was injected in the splittless mode, and in one paper cold on large volume injection was used in order to improve sensitivity [4].

The injector temperature was between 200 and 250 °C, while Helium was used as the carrier gas. In one case the NPD detector was a very sensitive and selective detector, for a compound like diazinon that has two nitrogens and one phosphorus atom in the molecule [8]. Carbamates are thermally labile molecules hence gas chromatography was not a suitable analytical method. Instead ELISA and HPLC with UV detector were employed [10].

## 5. Results (Table 3)

Some of the studies used human hair samples and some were conducted on experimental animals. Liu and Pleil [4] used dog hair for the pesticide studies. Tutudaki and co-workers [8–10] used rats and rabbits to study the disposition of diazinon in hair when the animals were exposed to the compound through their drinking water. The analyte levels detected in the various hair samples are summarized in Table 3. The levels of DDTs detected in hair were between 19 and 400 ng/g, of PCBS 5 and 13 ng/g of PCDDs and

Table 1
Analytes of interest, sample preparation method and recovery

| Compounds | Sample preparation method | Recovery (%) | Author–reference |
|---|---|---|---|
| PCBs (clophen) PCDDs, PCDFs co-PCBs | Soxhlet extraction, multicolumn cleaning | – | Schramm and co-workers [1,11] |
| PCDDs, PCDFs, and co-PCBs | Reflux with toluene, multilayer silica gel column cleaning, further cleanup by HPLC | | Nakao et al. [2] |
| DDT, lindane | Acid Hydrolysis, LLE | | Neuber et a. [3] |
| PCBs, DDTs, Diazinon, permethrin, chlorpyriphos, Malathion | LLE with hexane or hexane:ethyl acetate (4:1, v/v) | 35–128 depending on cpd. | Liu and Pleil [4] |
| PCBs, DDTs HCHs | Various extraction methods | ≥85 | Covaci and Schepens [5] |
| PCBs, DDTs HCHs | Acid hydrolysis | ≥85 | Covaci et al. [6] |
| Pesticides | Methanolic extraction | – | Cirimele et al. [7] |
| Diazinon | Methanolic extraction, LLE with ethyl acetate | 69 | Tutudaki et al. [8] |
| Diazinon | Methanolic extraction, LLE with ethyl acetate | 71 | Tutudaki and Tsatsakis [9] |
| Methomyl | Methanolic extraction | – | Tsatsakis et al. [10] |

PCDFs 0.1–10 pg/g of lindane 120–400 ng/g of HCHs 14–40 ng/g of diazinon 110–520 ng/g and of methomyl 900–1800 ng/g. With the exception of the studies concerning PCDDs and PCDFs, in which the reported analyte levels are in pg/g range, the rest of the analytes of interest were detected in the ng/g range.

## 6. Discussion

Human and environmental monitoring of organic chemicals has become increasingly important for exposure and risk assessment. Body fluids and tissues are commonly used to evaluate human exposure. Hair is increasingly used as a suitable indicator for long and short-term exposure to various chemicals.

Pesticide levels in hair were also measured in cases of acute poisonings of greenhouse sprayers [15].

Quantitative extraction of the analytes from the hair matrix is maybe the most important step in the hair analysis procedure. This is a difficult task since hair is rich in lipophilic substances that interfere with analysis. Many extraction and purification methods have been tried, some of which were quite elaborate and time consuming.

Organochlorine pesticides are quite stable and thus can withstand drastic extraction procedures like acidic or alkaline hydrolysis. Other, more labile pesticides like organophosphates, carbamates and pyrethroids, which decompose in the aforementioned conditions were extracted from hair by methanolic or other solvent extraction.

Many parameters may affect the extraction efficiency. These include time of incubation in the extraction medium,

Table 2
Analytical conditions

| Compounds | Analysis method | Column used | Injection mode | Reference |
|---|---|---|---|---|
| PCDD and PCDF, PCBs | HRGC–HRMS, EI or NCI | $Rt_x$ –2330 (60 × 0.25 × 0.25), DB5 MS (60 × 0.25 × 0.1) | Splitless | [1] |
| 4 and 6 chlorPCDD/Fs 7 and 8 chlorPCDDs/Fs | HRGC–HRMS | SP2331 (60 × 0.32 × 0.20) J&W DB5 (30 × 0.32 × 0.25) | Splitless | [2] |
| Lindane and DDTs | EI GC–MS | CP SIL 5CB (30 × 0.25 × 0.25) | Splitless | [3] |
| PCBs, OCPs, OPPs, Pyrethroids | EI GC–MS (SIM mode) | pre column: (10 × 0.53), $Rt_x$ –CLpest. (30 × 0.25 × 0.25) | Large volume injection | [4] |
| PCBs, HCHs, DDTs | EI GC–MS and GC-ECD | DB1 (25 × 0.25 × 0.25)s, HT8 (25 × 0.22 × 0.25) | Splittless | [5,6] |
| 15 pesticides | EI GC–MS and NCI GC–MS | | Splittless | [7] |
| Diazinon | EI GC–MS and GC-NPD | AT 5 MS (30 × 0.25 × 0.25), DB1 (30 × 0.32 × 0.25) | Splittless | [8] |
| Diazinon | NCI GC–MS | AT 5 MS (30 × 0.25 × 0.25) | Splittless | [9] |
| Methomyl | ELISA and HPLC–UV | LC8 column | – | [10,15] |

ARTICLE IN PRESS



Table 3
Limits of detections (LODs) and compound levels in actual hair samples

| Compounds | Levels | LOD | Reference |
|---|---|---|---|
| PDDDs and PCDFs | 0.1–10 pg/g | – | [1] |
| PCDDs | 0.481–1.95 pg/g | 0.088–0.12 pg/g | [2] |
| PCDFs | 0.403–1.51 pg/g | 0.088–0.12 pg/g | [2] |
| co-PCBs | 0.25–0.38 pg/g | 0.25 pg/g | [2] |
| DDT | 50–400 ng/g | 50 ng/g | [3] |
| Lindane | 120–400 ng/g | 120 ng/g | [3] |
| Diazinon | 20 ng/g | 25–50 pg | [4] |
| Permethrin | 100 ng/g | | [4] |
| Chlorpyriphos | 33–700 ng/g | | [4] |
| Malathion | 7–24 ng/g | | [4] |
| PCBs | 5.2–13.7 ng/g | 0.5 ng/g | [5,6] |
| DDTs | 18.8 | 1 ng/g | [5] |
| HCHs | 14 | 1 ng/g | [5] |
| Diazinon | 110–260 ng/g | 50 ng/g | [8] |
| Diazinon | 240–520 ng/g | 50 ng/g | [9] |
| Methomyl | 900–1800 ng/g | – | [10,15] |

washing the sample before the beginning of the extraction procedure, or pH of the extraction system [1,2,5].

Further purification of the sample was achieved either by passing the extract on multilayer SPE cartridges or by LLE extraction. In one paper [7] no further cleaning of the sample is done at all, for the fear of loosing the volatile analytes.

The method of choice for the analysis in most of the reviewed articles is GC–MS in either EI or NCI detecting mode. Selected ion monitoring (SIM) mode was used for the quantitative determination of the analytes of interest. In the case of organochlorine compounds the use of ECD detector increased sensitivity, something that was also true for the case of organophosphates and the use of an NPD detector.

One of the problems researchers faced was the co elution of several compounds and this was specifically true for some PCBs. The choice of the column used for separation was another critical parameter for the success of the analytical method. Six different columns were tried by Covaci and Schepens [5] to reach the conclusion that at least two different columns of different polarity are needed to separate these compounds efficiently. It was also concluded that the least coelutions were offered by the DB-1 column and not by the DB-5, which is most widely used in most labs. Analysis time and temperature program was another crucial parameter that had to be optimized for a successful analysis. Most of the analyses were about 30 min or more.

Finally even though most researchers injected one microliter of sample in the splittless mode, cold on large volume injection was also used in an attempt to increase sensitivity [4].

The difficulties that researchers faced in the development of such analytical methods may be easily demonstrated if the levels of drugs and other compounds that are routinely detected in hair are compared to the levels of pesticides reported (Table 3).

As already pointed out, most researchers concentrated on developing the analytical methods and conducted pilot studies to in order to reach some first conclusions that give clues about the importance of hair in human risk assessment.

Interestingly enough most of the researchers that have worked on PCDDs, PSDFs and co-PCBs reach to the conclusion that hair analysis for the above compounds is very useful for risk assessment. The concentration of some of studied compounds reflected the total body burden [1,2]. Also it was concluded that PCDD, PCDF, and nco-PCBs levels in hair reflected those in the environment. Schramm suggests that future work should focus on the partition between blood, tissues and hair for different exposure scenarios to characterize cohorts epidemiologically [1,11]. He points out that experiments and results from different types of hair will rule out intra and inter-species relationships. Finally hair monitoring will provide an ethically acceptable cheap and easily applicable monitoring system for human and animal samples, especially for protected animals [1].

Hair analysis was also useful for monitoring indoor air pollution by lindane and DDT content from wood preservatives, according to Neuber et al. [3]. Lindane and DDT were detected in several hair samples and the possible pollution sources were either wood preservatives used in timbered roofs or furniture imported from the developing countries.

Covaci et al. [6] compared the organochlorine content of hair samples from Greece, Romania and Belgium. They concluded that hair samples from Greece contained the highest load of organochlorines and there was indication of relatively recent contamination with DDT and pure lindane. Interestingly enough the levels of PCBs were much higher in the Belgian samples than those from Greece or Romania, while the Greek samples contained more DDTs.

Cirimele et al. [7] probably detected some failure to maintain safety measures during the spraying of vineyards. Pesticides were identified and some were quantified in the hair samples of sprayers.

Finally in some work conducted in the Center of Toxicological Sciences and Research of the University of Crete the disposition of diazinon, methomyl and other pesticides [unpublished results] in hair of rats and rabbits was examined, when the animals were exposed to these chemicals through their drinking water [8–10]. It was concluded that the concentration was related to the dose administered. Also there were some indications on effect of the metabolic profile of the animal on the detected pesticide hair concentration. Of course several other parameters like the fact that some animals sweat and some do not may have also played a role in the detected concentration.

Active ingredients of pesticide formulations were identified in hair samples of women exposed to currently used pesticide during their work in greenhouses [16,17].

Overall all researchers agree that hair analysis may be a very helpful tool for human and environmental risk assessment, provided several parameters are standardized. This of course implies lots of work and co-operation of all the researchers in the field so that databases that may be accessible from anyone interested in the topic are created.

## References

[1] K.-W. Schramm, Hair: a matrix for non-invasive biomonitoring of organic chemicals in mammals, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59 (1997) 396–402.

[2] T. Nakao, O. Aozasa, S. Ohta, H. Miyata, Assessment of human exposure to PCDDs, PCDFs, and co PCBs using hair as a human pollution indicator sample I: development of analytical method for human hair and evaluation for exposure assessment, Chemosphere 48 (2002) 885–896.

[3] K. Neuber, G. Merkel, F.E. Randow, Indoor air pollution by lindane and DDT indicated by head hair samples of children, Toxicol. Lett. 107 (1999) 189–192.

[4] S. Liu, J.D. Pleil, Human blood and environmental media screening method for pesticides and polychlorinated biphenyl compounds using liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry analysis, J. Chromatogr. B 769 (2002) 155–167.

[5] A. Covaci, P. Schepens, Chromatographic aspects of selected persistent organochlorine pollutants analysis in human hair, Chromatographia 53 (2001) 366.

[6] A. Covaci, M. Tutudaki, A.M. Tsatsakis, P. Schepens, Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants, Chemosphere 46 (2002) 413–418.

[7] V. Cirimele, P. Kintz, B. Ludes, Evidence of pesticide exposure by hair analysis, Acta Clin. Belg. Suppl. 1 (1999) 59–63.

[8] M. Tutudaki, A. Tsakalof, A.M. Tsatsakis, Hair analysis used to assess chronic exposure to the organophosphate diazinon: a model study with rabbits, Hum. Exp. Toxicol. 22 (2003) 159–164.

[9] M. Tutudaki, A.M. Tsatsakis, Pesticide hair analysis: development of a GC–NCI–MS method to assess chronic exposure to diazinon in rats, J. Anal. Toxicol. (2004) in press.

[10] A.M. Tsatsakis, M. Tutudaki, M. Tzatzarakis et al., Pesticide disposition in hair: preliminary results of a model study of methomyl incorporation into rabbit hair, Vet. Hum. Toxicol. 40 (1998) 200–203.

[11] K.-W. Schramm, T. Kuettner, S. Weber, K. Lutzke, Dioxin hair analysis as monitoring pool, Chemosphere 24 (1992) 351–358.

[12] A.A. Hashimi, S.S. Krishnan, R.E. Jervis, Human hair as a pollutant dosimeter, J. Radioanal. Nucl. Chem. 161 (1992) 171–180.

[13] T. Oghami, S. Nonaka, F. Muryama et al., A comparative study on polychlorinated biphenyls (PCB) and polychlorinated quaterphenyls (PCQ) concentrations in subcutaneous fat tissue blood and hair of patients with Yusho in Nagasaki Perfecture, Fukukoa Acta Med. 80 (1991) 307–312.

[14] C. Dauberschmidt, R. Wennig, Organochlorine pollutants in human hair, J. Anal. Toxicol. 22 (1998) 610–611.

[15] A.M. Tsatsakis, G.K. Bertsias, I.N. Mammas et al., Acute fatal poisoning by methomyl caused by inhalation and transdermal absorption, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 66 (2001) 415–420.

[16] G. Dopapsakis, I.G. Vlachonikolis, C. Varveris, A.M. Tsatsakis, Mammographic findings and occupational exposure to pesticides currently in use on Crete, Eur. J. Cancer 37 (2001) 1531–1536.

[17] M. Tutudaki, G. Dolapsakis, I. Vlachonikolis, A.M. Tsatsakis, Mammography and hair testing findings of populations occupationally exposed to currently used pesticides, in: Book of Abstracts, International Conference on Rural Health in Mediterranean and Balkan Countries, 2002, p. 43.