



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
Π.Μ.Σ.: ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ - ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ
ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ UV (FPSE-HPLC-UV) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ
PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ**

ΖΟΡΜΠΑ ΕΙΡΗΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΘΗΝΑ, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παντερή Ειρήνη,	Καθηγήτρια (Επιβλέπουσα)
Λουκάς Ιωάννης,	Αναπλ. Καθηγητής
Ντότσικας Ιωάννης,	Αναπλ. Καθηγητής

"Η έγκριση της μεταπτυχιακής διατριβής ειδίκευσης από το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ, δεν υποδηλώνει την αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα." (Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης, του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας, του Τμήματος Φαρμακευτικής, του Ε.Κ.Π.Α. κατά τη διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2019/20 και στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Φαρμακευτική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας”.

Έτσι λοιπόν, άλλο ένα ταξίδι έφτασε στο τέλος του, ένα ταξίδι όμορφο, δύσκολο και σίγουρα επιμορφωτικό και αξέχαστο. Τα μαθήματα που πήρα είναι πολλά, όχι μόνο όσον αφορά την επιστήμη μου, που τόσο αγαπώ, αλλά και απλά καθημερινά μαθήματα που με έκαναν πιο δυνατή.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την επιβλέπουσα της διπλωματικής μου εργασίας, καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή για την ευκαιρία που μου έδωσε να συνεργαστώ μαζί της στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Την ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ αρχής και με επέλεξε στην ομάδα της καθώς και για τις συμβουλές και γνώσεις που μοιράστηκε μαζί μου σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου. Είμαι ευγνώμον για την εξαιρετική συνεργασία που είχαμε.

Επίσης, ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Λουκά για το χρόνο που αφιέρωσε στην αξιολόγηση της εργασίας αλλά και τον Αναπλ. Καθηγητή κ. Ιωάννη Ντότσικα τόσο για τη συμμετοχή του στην αξιολόγηση της εργασίας όσο και για το απεριόριστο ενδιαφέρον να μας μεταδώσει τις γνώσεις του στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών.

Επιπλέον, ευχαριστώ όλους τους διδάσκοντες του Π.Μ.Σ. Φαρμακευτική Ανάλυση- Έλεγχος Ποιότητας για τις γνώσεις και τα μαθήματα ζωής που μας έδωσαν.

Ευχαριστώ τους συμφοιτητές μου στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης που ήμασταν μαζί σ’ αυτό το ταξίδι.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένειά μου που με στηρίζει και με αγαπάει όλα αυτά τα χρόνια. Χωρίς αυτούς δε θα ήμουν ο άνθρωπος που είμαι σήμερα. Ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, τον αδερφό μου και το συνοδοιπόρο μου, που έκαναν πιο όμορφο αυτό το ταξίδι μου αυτά τα δύο χρόνια. Τους ευχαριστώ και τους αγαπώ πολύ!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ.....	3
1.1. Εισαγωγή	3
1.2. Είδη χρωματογραφικών κορυφών.....	4
1.2.1. Υγροχρωματογραφία Κατανομής (Partition chromatography)	4
1.2.2. Υγροχρωματογραφία προσρόφησης (Absorption Chromatography)	5
1.2.3. Χρωματογραφία ιοντοαλλαγής (Ion exchange chromatography)	7
1.2.4. Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography).....	9
1.2.5. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή διήθησης μέσω πηκτής (Size exclusion chromatography ή Gel filtration chromatography)	10
1.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC	11
1.3.1. Κινητή φάση	12
1.3.2. Σύστημα παροχής κινητής φάσης.....	12
1.3.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος.....	13
1.3.4. Χρωματογραφικές στήλες.....	14
1.3.5. Ανιχνευτές	14
1.3.6. Σύστημα καταγραφής αποτελεσμάτων-Λογισμικά	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ	19
2.1. Εισαγωγή	19
2.2. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών	20
2.3. Υγρό-υγρό εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE).....	20
2.4. Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE).....	22
2.5. Εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά.....	23
2.6. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase microextraction, SPME)	25
2.7. Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE). 26	
2.7.1. Stir FPSE.....	28
2.7.2. Δυναμική FPSE.....	28
2.7.3. Αυτοματοποιημένη FPSE	29

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΕΣΤΕΡΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑ-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (PARABENS)	35
4.1. Εισαγωγή	35
4.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες	37
4.3. Πηγές έκθεσης σε parabens	39
4.3.1. Καλλυντικά	39
4.3.2. Φάρμακα	43
4.3.3. Τρόφιμα	45
4.3.4. Υδάτινοι πόροι	46
4.3.5. Εδάφη, ιζήματα και λάσπη	48
4.3.6. Σκόνη, αέρας	49
4.4. Μέθοδοι απομάκρυνσης και διάσπασης.....	51
4.4.1. Βιοδιάσπαση.	51
4.4.2. Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης.....	51
4.5. Φαρμακοκινητική	52
4.6. Τοξικολογία των parabens	57
4.6.1. Χρόνιες επιπτώσεις στο δέρμα	58
4.6.2. Οιστρογονικές και αντι-οιστρογονικές επιπτώσεις	59
4.6.3. Καρκίνος του μαστού	62
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ	
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	
ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ UV (FPSE-HPLC-UV) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ	
PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ	65
5.1. Εισαγωγή	65
5.2. Αρχή μεθόδου	66
5.3. Εξοπλισμός-Οργανολογία.....	66
5.3.1. Σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	66
5.3.2. Προκατεργασία δείγματος	67
5.3.3. Αντιδραστήρια – Διαλύτες.....	68

5.3.4.	Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας.....	68
5.4.	Βελτιστοποίηση χρωματογραφίας.....	71
5.4.1.	Επιλογή στατικής φάσης	71
5.4.2.	Επιλογή κινητής φάσης.....	76
5.4.3.	Βελτιστοποίηση Προκατεργασίας βιολογικού δείγματος με την διαδικασία FPSE..	88
5.5.	Τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης των προσδιοριζόμενων parabens από τον ανθρώπινο ορό του αίματος με την τεχνική προκατεργασίας FPSE.....	96
5.6.	Καμπύλες αναφοράς – έλεγχος γραμμικότητας.....	97
VI.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	100
VII.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	101

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ
ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ
ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ UV (FPSE-HPLC-UV) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ
PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ**

Ειρήνη Ζορμπά

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα parabens είναι εστέρες του p-υδροξύ-βενζοϊκού οξέος και χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά στα φάρμακα, στα καλλυντικά και στα τρόφιμα. Στα τέλη του 2000 οι ενώσεις αυτές άρχισαν να εγείρουν προβληματισμούς, καθώς βρέθηκε ότι έχουν οιστρογονική δράση, ενώ η ανίχνευσή τους σε όγκους ανθρώπινου μαστού πυροδότησε μια σειρά από αναφορές που έθεσαν σε αμφιβολία την ασφάλειά τους. Οι ενώσεις αυτές είναι ενδοκρινικοί διαταράκτες, καθώς μεταβάλλουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Έτσι λοιπόν, κρίνεται απαραίτητος ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων τους σε βιολογικά δείγματα. Στόχος της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η αξιολόγηση της μεθόδου υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για την ανάλυση των parabens και συγκεκριμένα των Methylparaben (MPB), Ethylparaben (EPB), Propylparaben (PPB), Iso-propylparaben (iPPB), Butylparaben (BPB) iso-butylparaben (iBPB) και benzylparaben (BzPB) σε βιολογικά δείγματα και συγκεκριμένα στον ανθρώπινο ορό. Για την προκατεργασία του ανθρώπινου ορού χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης της προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο, (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) , η οποία συνδυάζει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Αναπτύχθηκε η χρωματογραφική μέθοδος και καθορίστηκαν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που επιτρέπουν το χρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών αλλά και των υπολοίπων συστατικών του υλικού μήτρας, επιλέχθηκε η βέλτιστη κινητή και στατική φάση και οι κατάλληλες συνθήκες ανίχνευσης. Ακολούθως αναπτύχθηκε και βελτιστοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο με σκοπό να επιτευχθεί βέλτιστη ανάκτηση των αναλυτών και να μειωθούν οι παρεμποδίσσεις από το υλικό μήτρας.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ, ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ, ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΟΡΟΣ, PARABENS, FPSE.

DEVELOPMENT OF A FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTION HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD WITH UV DETECTION FOR THE ANALYSIS OF PARABENS IN HUMAN SERUM

Eirini Zormpa

ABSTRACT

Parabens are esters of p-hydroxy-benzoic acid and they are widely used as preservatives in medicines, cosmetics and food. In the late 2000s, these compounds began to raise concerns as they were found to have estrogenic action, and their detection in human breast tumors sparked a series of reports that cast doubt on their safety. These compounds are endocrine disruptors (EDCs), as they alter the function of the endocrine system. That is why it is necessary to study them further in biological samples.

The aim of this research was to develop and to evaluate a high-performance liquid chromatography method for the analysis of parabens and specifically of Methylparaben (MPB), Ethylparaben (EPB), Propylparaben (PPB), Iso-propylparaben (iPPB), Butylparaben (BPB) iso-butylparaben (iBPB) and benzylparaben (BzPB) in human serum. Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE), an innovative and promising technique was used to pre-treat the biological sample, which combines high selectivity and sensitivity. The ideal chromatographic method was developed as well as the optimal conditions that allowed the efficient separation of the analytes from matrix interferences. The optimal mobile and static phase and the appropriate detection conditions were selected. Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) was adapted and optimized to achieve optimal analyte recovery and reduce interference from the matrix material.

KEYWORDS: HPLC; BIOANALYSIS; HUMAN SERUM, PARABENS, FPSE.

ΚΑΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

1.1. Εισαγωγή

Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μια ομάδα ποικίλων αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό ενώσεων ενός σύνθετου μίγματος. Στην χρωματογραφία, το δείγμα διαλύεται σε μια κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Έπειτα, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μίας στατικής φάσης (stationary phase), η οποία είναι προσκολλημένη σε μια στήλη ή σε μια στερεά επιφάνεια. Οι δύο αυτές φάσεις επιλέγονται με τέτοιο τρόπο έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης σε διαφορετικό βαθμό, λόγω των διαφορών τους στην ευκινήσια, καθώς κάποια συστατικά συγκρατούνται ισχυρότερα από την στατική φάση και κινούνται αργά και άλλα το αντίθετο [1,2,3,4].

Η τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) χρησιμοποιείται στην ανάλυση μίγματος αναλυτών παρέχοντας άμεσα τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε αναλύτη χωριστά, ο οποίος διαθέτει τον δικό του χρόνο συγκράτησης και συνεπώς την δική του χαρακτηριστική κορυφή. Η ιδιότητα αυτή είναι πολύ σημαντική στην φαρμακευτική ανάλυση και στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων που περιέχουν τους αναλύτες, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, έχοντας ως αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να κατακτήσει την πρώτη θέση στις ενόργανες τεχνικές ανάλυσης.

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) έχει πολλά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. Αυτό συμβαίνει γιατί διαθέτει:

- ✓ Χαμηλά όρια ανίχνευσης
- ✓ Υψηλή ευαισθησία, ακρίβεια και επαναληψιμότητα
- ✓ Μικρό χρόνο ανάλυσης
- ✓ Απλότητα, ευκολία και ευελιξία εφαρμογής
- ✓ Δυνατότητα προσδιορισμού ενώσεων ευρέος φάσματος για διάφορους σκοπούς

1.2. Είδη χρωματογραφικών κορυφών

Οι χρωματογραφικές τεχνικές ανάλογα με το μηχανισμό αλληλεπίδρασης της στατικής φάσης με τους αναλύτες διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

1.2.1. Υγροχρωματογραφία Κατανομής (Partition chromatography)

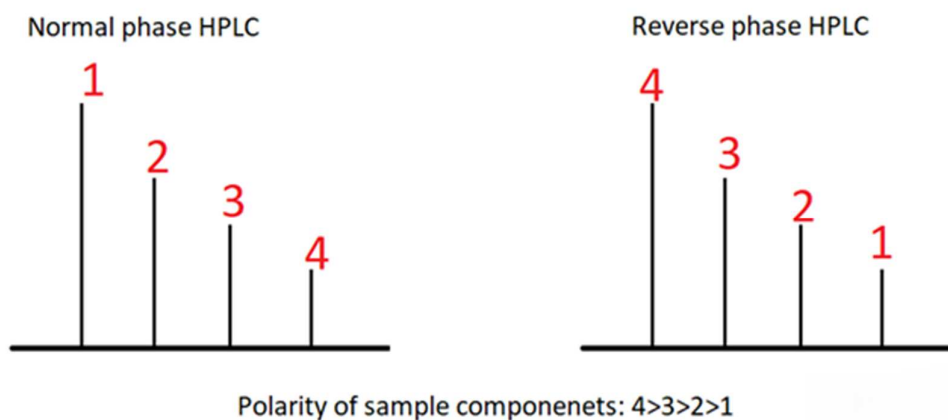
Η υγροχρωματογραφία κατανομής (Σχήμα 1.1 ⁵) είναι ο περισσότερο χρησιμοποιούμενος τύπος της HPLC, όπου η στατική φάση είναι ένα δεύτερο υγρό που δεν αναμιγνύεται με την υγρή κινητή φάση. Στους πρώτους τύπους της χρωματογραφίας κατανομής χρησιμοποιούνταν στήλες υγρού-υγρού, οι οποίες, στα σύγχρονα συστήματα LC, αντικαταστάθηκαν με στήλες υγρής-συνδεδεμένης-φάσης (liquid-bonded-phase).⁶ Στη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση κατακρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση, ενώ στη χρωματογραφία συνδεδεμένης-φάσης, η στατική φάση δεσμεύεται με χημικό δεσμό στην επιφάνεια του υλικού στήριξης, δημιουργώντας ένα σταθερότατο υλικό πλήρωσης αδιάλυτο στην κινητή φάση. Οι στήλες συνδεδεμένης φάσης είναι συμβατές με τεχνικές βαθμιδωτής έκλουσης.²

Με βάση την πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης, η χρωματογραφία κατανομής χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: στη χρωματογραφία κανονικής φάσης (NP-HPLC) και στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC). Στις πρώτες εργασίες της υγροχρωματογραφίας, χρησιμοποιήθηκαν στατικές φάσεις υψηλής πολικότητας, κατακρατούμενες σε σωματίδια πυριτίας (silica) ή αλουμίνας, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης, όπως το εξάνιο ή ισοπροπυλαιθέρας. Αυτός ο τύπος χρωματογραφίας ονομάζεται χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase chromatography). Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase chromatography), η στατική φάση είναι μη πολική, συνήθως ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή φάση είναι ένας πολικός διαλύτης (όπως νερό, μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή τετραϋδροφουράνιο).⁴

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, το λιγότερο πολικό συστατικό εκλύεται πρώτο. Αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης οδηγεί στην μείωση του χρόνου έκλουσης. Στην χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, πρώτο εκλύεται το πολικότερο συστατικό και με αύξηση της πολικότητας της κινητής ο χρόνος έκλουσης αυξάνεται. Έχει βρεθεί ότι το 75% των διαχωρισμών με HPLC πραγματοποιούνται με στήλες αντίστροφης φάσης. Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτών των διαχωρισμών είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί το νερό ως διαλύτης στην κινητή φάση. Το νερό είναι ένας φθηνός διαλύτης, μη τοξικός, διαπερατός από την υπεριώδη ακτινοβολία και συμβατός με βιολογικές ουσίες.^{3,5}



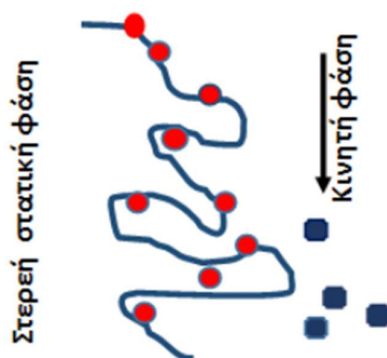
Σχήμα 1.1 : Χρωματογραφία κατανομής. Ο κόκκινος αναλύτης κατανέμεται ισχυρότερα στην στατική φάση σε σχέση με τον μπλε, άρα καθυστερεί να εξέλθει



Σχήμα 1.2 : Σχέση μεταξύ πολικότητας και χρόνου έκλουσης για χρωματογραφία κανονικής και αντίστροφης φάσης.⁷

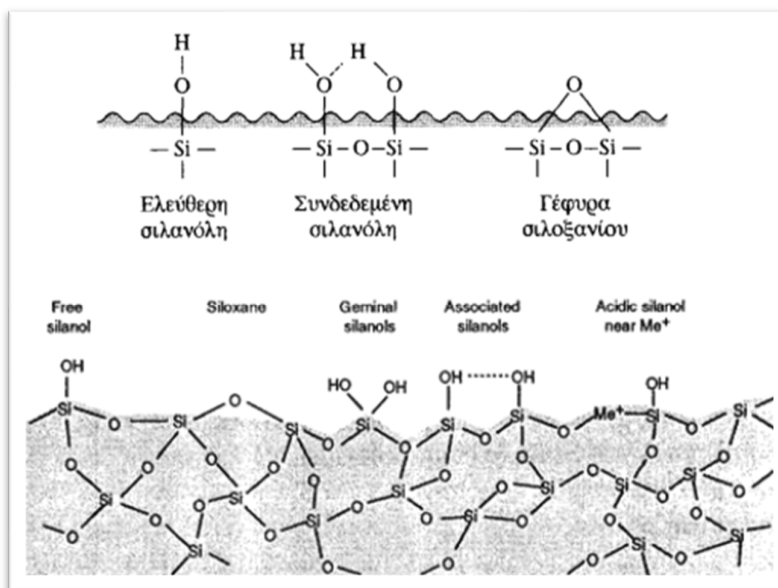
1.2.2. Υγροχρωματογραφία προσρόφησης (Absorption Chromatography)

Η βασική αρχή της υγροχρωματογραφίας προσρόφησης στηρίζεται στην ιδιότητα ορισμένων ενώσεων να προσροφώνται στην επιφάνεια μιας στατικής φάσης, που λέγεται προσροφητικό μέσο. Η προσρόφηση οφείλεται σε διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων, κυρίως διπόλου-διπόλου, δεσμούς υδρογόνου και van der Waals. Τα προσροφητικά μέσα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι διάφορες χημικές ουσίες οι οποίες είναι αδιάλυτες στους διαλύτες της κινητής φάσης και χημικά αδρανείς προς τους αναλύτες.



Σχήμα 1.3: Σχηματική απεικόνιση της χρωματογραφίας προσρόφησης. Ο κόκκινος αναλύτης προσροφάται ισχυρότερα στην στατική φάση σε σχέση με τον μπλε, άρα καθυστερεί να εξέλθει.⁵

Στη χρωματογραφία προσρόφησης το 90% των στατικών φάσεων που χρησιμοποιούνται περιέχουν πηκτή πυριτίας, της οποίας η επιφάνεια μπορεί να φέρει ελεύθερες ομάδες -OH , ή συνδεδεμένες ή γέφυρες σιλοξανίου.



Σχήμα 1.4: Σχηματική δομή της επιφάνειας της πηκτής πυριτίας⁴

Ανάλογα με τις χρωματογραφικές συνθήκες, η πηκτή πυριτίας μπορεί να συμπεριφερθεί ως βάση, ως οξύ ή ως ουδέτερο μόριο. Οι στατικές αυτές φάσεις, χρησιμοποιούνται σε ένα περιορισμένο εύρος pH (2.0-7.5).

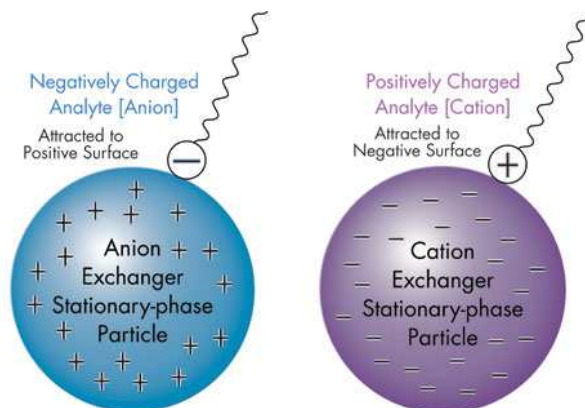
Η πηκτή πυριτία είναι διαθέσιμη στο εμπόριο με τις εξής παρασκευαστικές εταιρείες:

⇒ Zorbax, Nucleosil, και μερικοί τύποι Lichrospher είναι ασθενώς όξινες στατικές φάσεις pH (3.6-6.2).

⇒ Spherosil, Hypersil, Spherisorb, Lichrospher είναι ασθενώς βασικές στατικές φάσεις pH (7.0-8.1).

1.2.3. Χρωματογραφία ιοντοαλλαγής (Ion exchange chromatography)

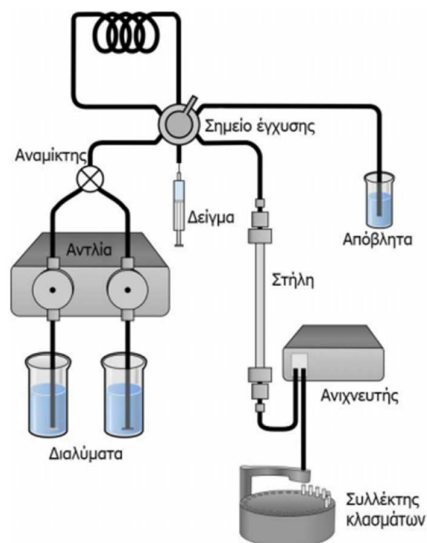
Η ανακάλυψη και η εξέλιξη της ιοντικής χρωματογραφίας είναι αποτέλεσμα της ανάπτυξης δύο διαφορετικών τομέων: α) των ιονανταλλακτικών ρητινών και β) της χρωματογραφίας. Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (Ion exchange chromatography) βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια και εφαρμόζεται για ιόντα ή ενώσεις που μπορούν να ιονίζονται, όπως οξέα και βάσεις αλλά και για ενώσεις που αντιδρούν με ιοντικές ομάδες όπως λιπίδια, πρωτεΐνες κ.α. Η στατική φάση είναι ένας ιοντοανταλλάκτης, δηλαδή ένα στερεό υπόστρωμα που συνδέεται ομοιοπολικά με χαρακτηριστικές ομάδες που είναι ιοντισμένες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο φορτίο του ιόντος της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης (δηλαδή ο διαλύτης που μεταβάλλει την πολικότητα) και η θερμοκρασία. Οι διαχωρισμοί που βασίζονται στην ανταλλαγή ιόντων λαμβάνουν χώρα, κυρίως, σε στήλες οι οποίες αποτελούνται από έναν ιοντοανταλλάκτη (π.χ. ρητίνη). Υπάρχουν δυο τύποι ιοντοανταλλάκτη: ο κατιοντοανταλλάκτης, ο οποίος φέρει αρνητικά φορτισμένες ομάδες, έλκοντας θετικά φορτισμένα ιόντα, και ο ανιοντοανταλλάκτης, ο οποίος φέρει θετικά φορτισμένες ομάδες έλκοντας αρνητικά φορτισμένα ιόντα. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες χρωματογραφίας τα μόρια ουσιών που είτε δεν έχουν φορτίο ή έχουν ομώνυμο φορτίο με τη ρητίνη θα εκλουσθούν πρώτα, ενώ τα μόρια ουσιών που έχουν φορτία αντίθετα μ' αυτά του ιοντοανταλλάκτη (ρητίνης) θα εκλουσθούν αργότερα. Οι ενώσεις που συγκρατήθηκαν στη στήλη θα εκλουσθούν με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης άλατος. Όσες ενώσεις συγκρατούνται ασθενώς θα εκλουσθούν πρώτα, ενώ όσες συγκρατούνται ισχυρά θα εκλουσθούν σε υψηλότερες συγκεντρώσεις άλατος.



Σχήμα 1.5: Στατικές φάσεις-ιοντοανταλλάκτες στην χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.⁸

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, εκτός από την ανάλυση φαρμακευτικών μορίων εφαρμόζεται κυρίως για τον διαχωρισμό και καθαρισμό πρωτεϊνών, πολυπεπτιδίων, νουκλεϊνικών οξέων, πολυνουκλεοτιδίων κ.λπ.

Ο εξοπλισμός μιας βασικής διάταξης χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής φαίνεται παρακάτω.

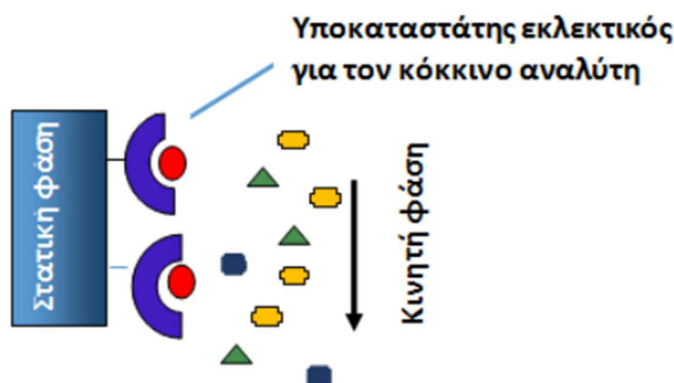


Σχήμα 1.6: Διάταξη χρωματογραφίας ιοντοανταλλαγής.⁹

1.2.4. Χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography)

Η χρωματογραφία συγγένειας (Affinity chromatography) βασίζεται στην ομοιοπολική σύνδεση ενός αντιδραστήριου, το οποίο καλείται υποκαταστάτης συγγένειας (affinity ligand), με ένα στέρεο υλικό στήριξης. Τα αντισώματα, οι αναστολείς ενζύμων ή άλλα μόρια τα οποία συνδέονται αντιστρεπτά και εκλεκτικά με διάφορους αναλύτες σε ένα δείγμα αποτελούν τους τυπικούς υποκαταστάτες συγγένειας. Το δείγμα διέρχεται μέσω της στήλης και κατακρατούνται μόνο εκείνα τα μόρια τα οποία συνδέονται εκλεκτικά με τον υποκαταστάτη συγγένειας. Τα υπόλοιπα μόρια απομακρύνονται από τη στήλη με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Έστερα, αφού έχουν απομακρυνθεί τα ανεπιθύμητα μόρια, οι αναλύτες που κατακρατούνται, μπορούν να εκλουσθούν με αλλαγή των συνθηκών της κινητής φάσης. Στη χρωματογραφία συγγένειας η στατική φάση είναι ένα στερεό υλικό, όπως αгарόζη ή υάλινα πορώδη σφαιρίδια, στην επιφάνεια των οποίων έχει ακινητοποιηθεί ο υποκαταστάτης συγγένειας. Η κινητή φάση εκτελεί δύο ξεχωριστές λειτουργίες. Αρχικά, υποστηρίζει την ισχυρή σύνδεση των μορίων του αναλύτη και στη συνέχεια αφού απομακρυνθούν οι ανεπιθύμητες ουσίες του δείγματος, πρέπει ο διαλύτης να εξασθενήσει ή να εξαφανίσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του αναλύτη και υποκαταστάτη για να εκλουσθεί και ο αναλύτης. Οι μεταβολές που μπορούν να εφαρμοσθούν, αφορούν την μεταβολή του pH ή της ιοντικής ισχύος για την διαφοροποίηση των συνθηκών έκλουσης.

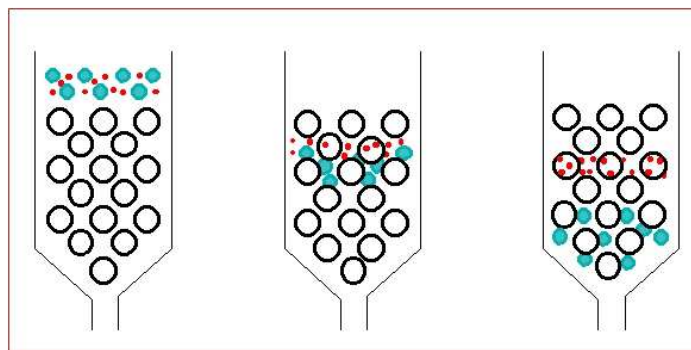
Η χρωματογραφία συγγένειας έχει το μεγάλο πλεονέκτημα της εξαιρετικής εξειδίκευσης και γι' αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται κυρίως για την ταχεία απομόνωση βιομορίων κατά την παρασκευαστική διεργασία.



Σχήμα 1.7: Χρωματογραφία χημικής συγγένειας. Ο κόκκινος αναλύτης δεσμεύεται από τη στατική φάση στην οποία υπάρχει ακινητοποιημένος υποκαταστάτης με εκλεκτική συγγένεια για τον κόκκινο αναλύτη. Έτσι, καθυστερεί να εξέλθει σε σχέση με τους υπόλοιπους.⁵

1.2.5. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή διήθησης μέσω πηκτής (Size exclusion chromatography ή Gel filtration chromatography)

Η χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών ή χρωματογραφία διήθησης μέσω πηκτής είναι μία τεχνική ιδιαίτερα κατάλληλη για διαχωρισμούς ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους. Στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών τα υλικά πλήρωσης αποτελούνται από μικρά σωματίδια (~10μm) πυριτίας ή πολυμερούς, που περιέχουν ένα δίκτυο ομοιόμορφων πόρων μέσω των οποίων διαχέονται μόρια διαλύτη και διαλυμένων σωματιδίων. Τα μόρια όσο βρίσκονται στους πόρους είναι παγιδευμένα και απομακρύνονται από την κινητή φάση που ρέει. Ο μέσος χρόνος παραμονής στους πόρους εξαρτάται από το πραγματικό μέγεθος των μορίων του αναλύτη. Τα μόρια τα οποία έχουν μεγαλύτερο μέγεθος από το μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης δεν κατακρατούνται και είναι εκείνα που θα εκλουσθούν πρώτα από τη στήλη. Τα μόρια που έχουν διάμετρο σημαντικά μικρότερη από τους πόρους, μπορούν να διεισδύσουν ή να διαπεράσουν στο λαβυρινθώδες περιβάλλον τους με αποτέλεσμα να παγιδευτούν για μεγαλύτερο χρόνο εντός της στήλης και έτσι να εκλουσθούν τελευταία. Επιπλέον, υπάρχουν μόρια ενδιάμεσου μεγέθους των οποίων ο μέσος όρος διείσδυσης στους πόρους του υλικού πλήρωσης της στήλης εξαρτάται από τη διάμετρο τους. Η ομάδα των μορίων αυτών υφίσταται κλασμάτωση η οποία σχετίζεται με το μέγεθος των μορίων και με το σχήμα τους. Ο διαχωρισμός αποκλεισμού μεγεθών διαφέρει από τις υπόλοιπες τεχνικές καθώς δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση μεταξύ του αναλύτη και στατικής φάσης. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε μείωση της απόδοσης της στήλης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι (αντίθετα με τους άλλους τύπους χρωματογραφίας) στη χρωματογραφία αποκλεισμού μεγεθών υπάρχει ένα ανώτερο όριο χρόνου κατακράτησης, και αυτό συμβαίνει γιατί καμία ουσία δεν μπορεί να παραμείνει εντός της στήλης περισσότερο από αυτές, που διαπερνούν πλήρως τους πόρους στις στατικές φάσεις.



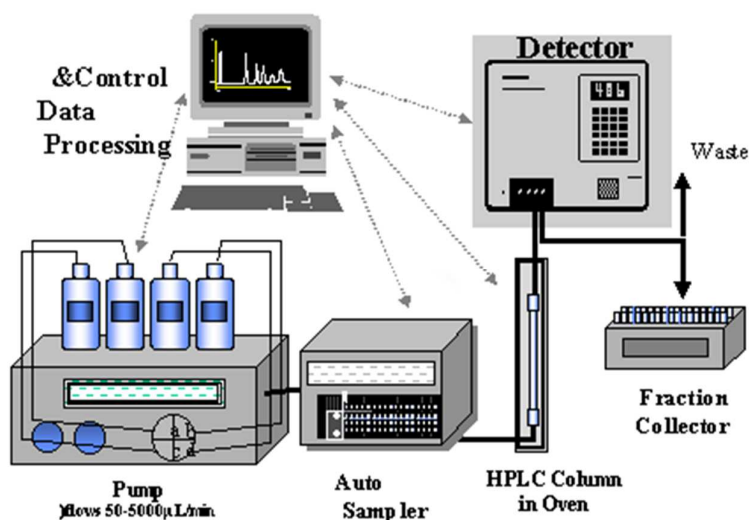
Σχήμα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση χρωματογραφίας αποκλεισμού μεγεθών.¹⁰

1.3. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC ^{2,4}

Ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC αποτελείται από τα εξής τμήματα:

- Περιέκτες διαλυτών
- Σύστημα παροχής κινητής φάσης
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Αναλυτική στήλη
- Ανιχνευτής
- Σύστημα συλλογής, καταγραφής και αποθήκευσης αποτελεσμάτων

Στο σχήμα 1.9 απεικονίζεται μια τυπική διάταξη ενός συστήματος HPLC



Σχήμα 1.9: Τυπική διάταξη ενός συστήματος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.¹¹

1.3.1. Κινητή φάση

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται πρέπει να διαθέτουν τις παρακάτω ιδιότητες^{2,4,6}:

- ✓ Μη πτητικότητα
- ✓ Χαμηλό ιξώδες και πίεση επαναφοράς
- ✓ Σταθερότητα
- ✓ Χαμηλή τοξικότητα
- ✓ Μη απορρόφηση στο UV
- ✓ Υψηλή καθαρότητα και χρήση ειδική για HPLC
- ✓ Χαμηλό κόστος αγοράς

1.3.2. Σύστημα παροχής κινητής φάσης

Ένα σύγχρονο σύστημα υγροχρωματογραφίας είναι εφοδιασμένο με τα δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών, τα διάφορα φίλτρα, τον θάλαμο ανάμιξης των διαλυτών και μια αντλία υψηλής πίεσης. Τα δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών είναι ειδικές φιάλες που αποθηκεύουν την κινητή φάση του συστήματος, καλυμμένες με ένα πώμα. Η κινητή φάση αποτελείται από αναμίξιμους διαλύτες διαφορετικής πολικότητας ή με διαλύματα διαφορετικού pH, ιοντικής ισχύος ή συγκέντρωσης κάποιου άλατος, το οποίο εξαρτάται από το είδος του χρωματογραφικού διαχωρισμού που απαιτείται. Ένα πολύ βασικό κριτήριο είναι η υψηλού βαθμού καθαρότητα των διαλυτών καθώς και η απαέρωση τους πριν εισαχθούν στη στήλη. Οι φιάλες συνοδεύονται συνήθως με το φίλτρο αναρρόφησης των διαλυτών και το φίλτρο παροχής αερίου απαέρωσης. Ως αέριο απαέρωσης χρησιμοποιείται το ήλιο, το οποίο απομακρύνει το διαλυμένο οξυγόνο και άζωτο (που δημιουργούν φυσαλίδες, προκαλώντας έτσι θόρυβο, διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών και μείωση της αποδοτικότητας της στήλης), χωρίς το ίδιο να διαλυθεί με τους διαλύτες. Μία χρωματογραφική διαδικασία μπορεί να είναι ισοκρατικής έκλουσης ή βαθμιδωτής έκλουσης. Στην ισοκρατική έκλουση, η κινητή φάση παραμένει σταθερή καθ' όλη την διάρκεια του χρωματογραφικού διαχωρισμού, ενώ στην βαθμιδωτή έκλουση η κινητή φάση αλλάζει βαθμιαία ή ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Στην βαθμιδωτή έκλουση χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερα συστήματα διαλυτών, που διαφέρουν ως προς την πολικότητα και την σύσταση κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό.^{2,4,6}

Οι αντλίες μεταφέρουν σταθερή ροή κινητής φάσης προς το εσωτερικό της χρωματογραφικής στήλης. Το σύστημα άντλησης πρέπει να πληρεί τα εξής χαρακτηριστικά ^{2,4,6}:

- Σταθερή πίεση και σταθερή ταχύτητα ροής
- Χρήση αδρανών και ανθεκτικών στην διάβρωση υλικών κατασκευής
- Λήψη όγκου διαλυτών με ακρίβεια

Οι αντλίες χωρίζονται σε αντλίες σταθερής πίεσης και αντλίες σταθερής ροής, όπου οι τελευταίες χωρίζονται με την σειρά τους σε αντλίες τύπου σύριγγας, αντλίες παλινδρόμησης και αντλίες διαφράγματος.

1.3.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος^{2,4} γίνεται με 3 τρόπους:

① Αυτόματος δειγματολήπτης

Ο αυτόματος δειγματολήπτης αποτελείται από την βαλβίδα εισαγωγής, το βρόχο, τη μικροσύριγγα, τα φιαλίδια που περιέχουν τα δείγματα και είναι τοποθετημένα μέσα σε έναν περιστρεφόμενο δίσκο. Η μικροσύριγγα παίρνει μια συγκεκριμένη ποσότητα δείγματος από το φιαλίδιο του περιστρεφόμενου δίσκου και την μεταφέρει στο βρόχο της βαλβίδας.

② Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος

Η βαλβίδα εισαγωγής δείγματος χρησιμοποιείται πάρα πολύ συχνά στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Αποτελείται από έναν ακίνητο χαλύβδινο κύλινδρο με 6 διαύλους, από τους οποίους ο ένας οδηγεί εντός της στήλης. Το δείγμα εισάγεται στο βρόχο και αφού περιστραφεί η βαλβίδα, οδηγείται με την βοήθεια της κινητής φάσης στην στήλη.

③ Απευθείας με μικροσύριγγα στην κορυφή της στήλης

Αυτός ο τρόπος είναι ο πιο παλιός και ο πιο απλός τρόπος εισαγωγής δείγματος στο σύστημα. Ωστόσο παρουσιάζει χαμηλή επαναληψιμότητα στον όγκο έγχυσης με την σύριγγα και αστάθεια στη γραμμή βάσης του χρωματογραφήματος λόγω της διακοπής της ροής κατά την εισαγωγή.

1.3.4. Χρωματογραφικές στήλες

Ανάλογα με τις διαστάσεις των χρωματογραφικών στηλών που χρησιμοποιούνται στην HPLC, οι στήλες χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:



- ➔ Προστατευτικές στήλες ή Προ-στήλες
- ➔ Αναλυτικές στήλες
- ➔ Ήμι-παρασκευαστικές στήλες και παρασκευαστικές

Οι αναλυτικές στήλες που χρησιμοποιούνται στην υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αποτελούνται από ένα εξωτερικό ευθύγραμμο κυλινδρικό περίβλημα και το υλικό πλήρωσης. Είναι κατασκευασμένες από ανοξείδωτο χάλυβα, έχουν μήκος 10-30 cm, εσωτερική διάμετρο 4-10 mm και το μέγεθος των κόκκων του υλικού πλήρωσης είναι 5-10 μm .

Οι προστήλες ή προστατευτικές στήλες, είναι μικρές σε μέγεθος και τοποθετούνται πριν την αναλυτική στήλη, με στόχο την απομάκρυνση των αιωρούμενων σωματιδίων και των προσμίξεων από τους διαλύτες, καθώς και των συστατικών που συνδέονται μη αντιστρεπτά με τη στατική φάση.

Τέλος, οι παρασκευαστικές στήλες είναι στήλες μεγάλων διαστάσεων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό ενώσεων ενός μίγματος σε ποσότητα της τάξης των μιλιγραμμαρίων.^{2,4}

1.3.5. Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής βρίσκεται στην έξοδο της χρωματογραφικής στήλης και στόχος του είναι να αναγνωρίζει έναν αναλύτη μόλις αυτός εκλουσθεί από την στήλη. Πιο συγκεκριμένα, ο ανιχνευτής αναγνωρίζει την αλλαγή της σύστασης της κινητής φάσης λόγω της ύπαρξης του αναλύτη, την μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα το οποίο με την σειρά του μετατρέπεται σε ψηφιακό σήμα και έτσι μεταφέρεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή για να επεξεργαστεί.

Οι ανιχνευτές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες:

❶ Γενικοί Ανιχνευτές (bulk property detectors)

Οι γενικοί ανιχνευτές βασίζονται στην αλλαγή μιας ιδιότητας της κινητής φάσης, παραδείγματος χάριν, του δείκτη διάθλασης, της διηλεκτρικής σταθεράς, ή της πυκνότητας, όπου οι τιμές αυτών επηρεάζονται από την παρουσία των αναλυτών.

❷ Ειδικοί Ανιχνευτές (solute property detectors)

Οι ειδικοί ανιχνευτές βασίζονται στην αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των προσδιοριζόμενων συστατικών, όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης.

Ένας ιδανικός ανιχνευτής θα πρέπει να έχει τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ Να αποκρίνεται σε όλους τους αναλύτες (γενικός ανιχνευτής) ή η εκλεκτικότητα απόκρισης του να είναι γνωστή (ειδικός ανιχνευτής)
- ✓ Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής
- ✓ Να επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης στην περιοχή των ng-μg
- ✓ Αμελητέο νεκρό όγκο, ώστε να αποφευχθεί η διεύρυνση των κορυφών
- ✓ Μειωμένα επίπεδα θορύβου
- ✓ Σταθερότητα και Αναπαραγωγιμότητα
- ✓ Να μην επηρεάζεται από μεταβολές της θερμοκρασίας και της ταχύτητας του υγρού έκλουσης
- ✓ Αξιοπιστία και ευκολία στην χρήση
- ✓ Μη καταστροφή δείγματος

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης είναι οι εξής:

-  Ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (Ultraviolet-visible Detector, UV-Vis)
-  Φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector, FD)
-  Ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector, PDA)
-  Ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector)
-  Ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector)
-  Φασματογράφοι μάζας (Mass spectrometry Detector, MS)
-  Αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector)
-  Ανιχνευτές παράταξης διόδων (Diode Array Detector, DAD)
-  Ανιχνευτές ραδιενέργειας
-  Ανιχνευτές σκεδασμού του φωτός

🌈 Ανιχνευτές φλόγας

- Ανιχνευτές ιονισμού φλόγας
- Φωτομετρικοί ανιχνευτές
- Ανιχνευτές εκπομπής^{3,6}

Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους (Ultraviolet-visible Detector, UV-Vis).

Ο ανιχνευτής αυτός βασίζεται στην απορρόφηση ακτινοβολίας UV από ένα αναλύτη. Η απορρόφηση υπολογίζεται από τον νόμο του Beer:

$$A = \epsilon \times b \times c$$

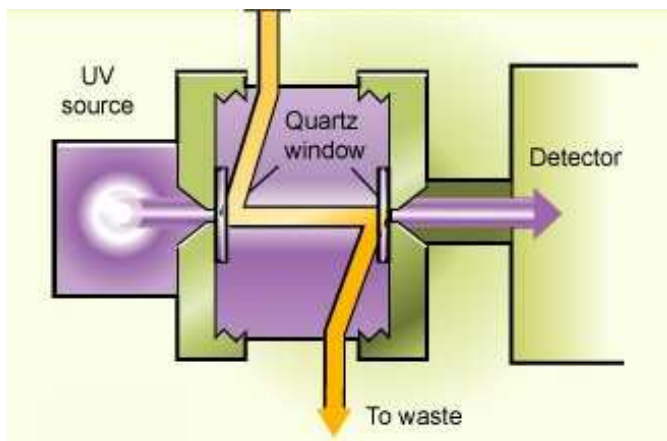
Όπου A: απορρόφηση

ϵ : μοριακή απορροφητικότητα του αναλύτη

b: η διαδρομή του φωτός σε cm κατά την διέλευση του από την κυψελίδα

c: η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα σε mol/L

Οι κυψελίδες των ανιχνευτών UV είναι κυψελίδες ροής και έχουν συνήθως σχήμα Z (Σχήμα 1.10) με εσωτερική διάμετρο 1mm, μήκος 10mm και δυνατότητα υποδοχής δείγματος όγκου 8 μ L.



Σχήμα 1.10 : Σχηματικό διάγραμμα κυψελίδας ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού σε σύστημα HPLC.¹²

Ο ανιχνευτής ορατού-υπεριώδους είναι ανθεκτικός με πολύ καλή ευαισθησία (0.002 μονάδες απορρόφησης και θόρυβο της τάξης του 1%), ανιχνεύοντας έτσι πολύ μικρές ποσότητες αναλυτών –της τάξης των ng- με περιορισμένη απορρόφηση στο UV. Επιπλέον, το μεγάλο

εύρος (-10^5) των ανιχνευτών UV επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό ιχνοποσοτήτων και κύριων συστατικών του δείγματος στο ίδιο χρωματογράφημα. Έχοντας λοιπόν τόσα πλεονεκτήματα, οι ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους χρησιμοποιούνται περισσότερο (περίπου 80%), σε σχέση με τους υπόλοιπους ανιχνευτές, στην φαρμακευτική ανάλυση. Οι πρώτοι ανιχνευτές λειτουργούσαν σε καθορισμένο μήκος κύματος (συνήθως 254 nm, καθώς πολλές οργανικές ενώσεις απορροφούν ισχυρά σ' αυτό το μήκος κύματος, μ' αποτέλεσμα να είναι εφικτή η ανίχνευση τους εκεί), ενώ οι σύγχρονοι ανιχνευτές μπορούν να ρυθμιστούν ώστε να λειτουργούν σε οποιοδήποτε μήκος κύματος σε όλο το εύρος της περιοχής UV/Vis.⁴

1.3.6. Σύστημα καταγραφής αποτελεσμάτων-Λογισμικά

Το ηλεκτρικό σήμα του ανιχνευτή με τη βοήθεια ειδικών επεξεργασιών, καταγράφεται ως ένα σύνολο κορυφών, καμπύλες του Gauss, που αποτελούν το χρωματογράφημα.

Στα παλαιότερα συστήματα HPLC υπήρχε ένας ολοκληρωτής που κατέγραφε την εμφάνιση του χρωματογραφήματος με απλό τρόπο. Οι ιδιότητες που πρέπει να διαθέτει ο ολοκληρωτής είναι η αυτόματη ανίχνευση των κορυφών, η μέτρηση των χρόνων έκλουσης των ουσιών, ο υπολογισμός των εμβαδών ή των υψών αυτών και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του δείγματος με βάση το εμβαδόν της κορυφής. Επίσης πρέπει να έχει την ικανότητα να αποθηκεύει στη μνήμη τα δεδομένα που έχουν επεξεργαστεί για να είναι δυνατή η επανειλημμένη ή παρατεταμένη επεξεργασία αυτών-περισσότερες της μιας φορές-χωρίς να είναι απαραίτητη η επανάληψη της ανάλυσης του δείγματος.^{2,4}

Τα σύγχρονα συστήματα HPLC διαθέτουν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Σ' αυτήν την περίπτωση είναι απαραίτητη η μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό, με τη χρήση ειδικού μετατροπέα. Ο ηλεκτρονικός υπολογιστής διαθέτει κατάλληλα λογισμικά προγράμματα τα οποία ελέγχουν όλο το σύστημα (έλεγχος της αντλίας, του αυτόματου δειγματολήπτη, του ανιχνευτή και αποθήκευση των χρωματογραφημάτων). Τα πλεονεκτήματα που παρέχει ο H/Y είναι ^{2,4}:

- I. η συλλογή, η επεξεργασία και η αποθήκευση των δεδομένων στη μνήμη του υπολογιστή
- II. η επεξεργασία του χρωματογραφήματος γενικότερα (υπολογισμός tailing factor, resolution, κ.α.)
- III. η ταυτόχρονη συλλογή δεδομένων και επιλογή των χρωματογραφημάτων που θα εκτυπωθούν

- IV. δυνατότητα παρέμβασης στον τρόπο ολοκλήρωσης, με μετατόπιση των ορίων ολοκλήρωσης
- V. δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των συστατικών ενός δείγματος με τη χάραξη πρότυπης καμπύλης αναφοράς

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ

2.1.Εισαγωγή

Το πιο σημαντικό στάδιο κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η προκατεργασία του δείγματος. Στόχος της προκατεργασίας είναι η τροποποίηση του υποστρώματος, η απομάκρυνση προσμίξεων και παρεμποδίσεων, η επίτευξη προσυγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων αναλυτών και τέλος η προστασία του χρησιμοποιούμενου οργάνου αποφεύγοντας προβλήματα, όπως το μπλοκάρισμα της αναλυτικής στήλης ή η μη αναστρέψιμη προσρόφηση των ενώσεων στη στήλη.¹³

Η προκατεργασία του δείγματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε κάθε προτεινόμενη αναλυτική μέθοδο. Καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού χρόνου ανάλυσης, οπότε διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του τελικού χρόνου που απαιτείται για την έκδοση του αποτελέσματος για κάθε δείγμα. Η προκατεργασία των δειγμάτων μπορεί να αποτελείται από πολλά στάδια καθιστώντας την έτσι απαιτητική, χρονοβόρα και επιρρεπή σε λάθη καθ' όλη την διάρκεια της, επηρεάζοντας την επαναληψιμότητα και την ακρίβεια της ανάλυσης.¹⁴

Μία μέθοδος προκατεργασίας θεωρείται αποτελεσματική όταν:

- ✓ κατορθώνει την εκλεκτική και επαναλήψιμη απομόνωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων
- ✓ απομακρύνει πλήρως τις παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα
- ✓ είναι εύκολη και γρήγορη
- ✓ έχει χαμηλό κόστος αγοράς
- ✓ είναι φιλική προς το περιβάλλον
- ✓ καταναλώνει μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών
- ✓ έχει την δυνατότητα αυτοματοποίησης και προσαρμογής στις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας

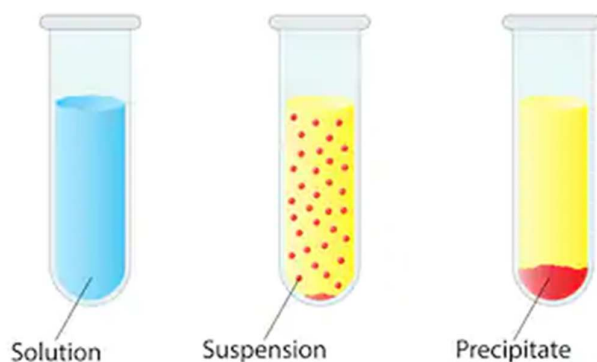
Με την πάροδο του χρόνου, η ανάγκη και η σπουδαιότητα της προκατεργασίας των δειγμάτων σε μια χημική ανάλυση, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, με αποτέλεσμα να ερευνώνται και να εφαρμόζονται τόσο νέες τεχνικές προκατεργασίας, όσο και

παραλλαγές των ήδη υπάρχουσών. Στη συνέχεια περιγράφονται ορισμένες από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές προκατεργασίας.

2.2. Κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Η καθίζηση των πρωτεϊνών με την χρήση οργανικών διαλυτών (κυρίως ακετονιτρίλιο) είναι μια γρήγορη, ήπια, απλή και σχετικά φθηνή μέθοδος προκατεργασίας του δείγματος. Οι πρωτεΐνες μπορούν επίσης να καθιζάνουν λόγω διαταραχών, στο pH του διαλύτη, στην ιοντική ισχύ και στη θερμοκρασία. Η προσθήκη μεγάλων συγκεντρώσεων ορισμένων αλάτων σε αναμίξιμους οργανικούς διαλύτες μπορεί να τροποποιήσει τις ιδιότητες του διαλύτη.

Χρησιμοποιούνται διαλύματα μεθανόλης ή ακετονιτρίλιου ή και διάλυμα οξέος σε αναλογία 3:1 με το βιολογικό δείγμα πχ πλάσμα. Στη συνέχεια, ακολουθεί έντονη ανακίνηση για λίγα λεπτά και φυγοκέντρηση. Πρόκειται για μια σχετικά ατελή μέθοδο καθαρισμού, γιατί δεν απομακρύνονται πολλά ενδογενή συστατικά. Η κατακρήμνιση πρωτεϊνών χρησιμοποιείται πάντοτε σε συνδυασμό με μια άλλη τεχνική προκατεργασίας δείγματος όπως το DLLME, SPE ή SPME. Τέλος, μπορεί να συνδυαστεί με LC- MS/MS.¹⁵⁻¹⁷



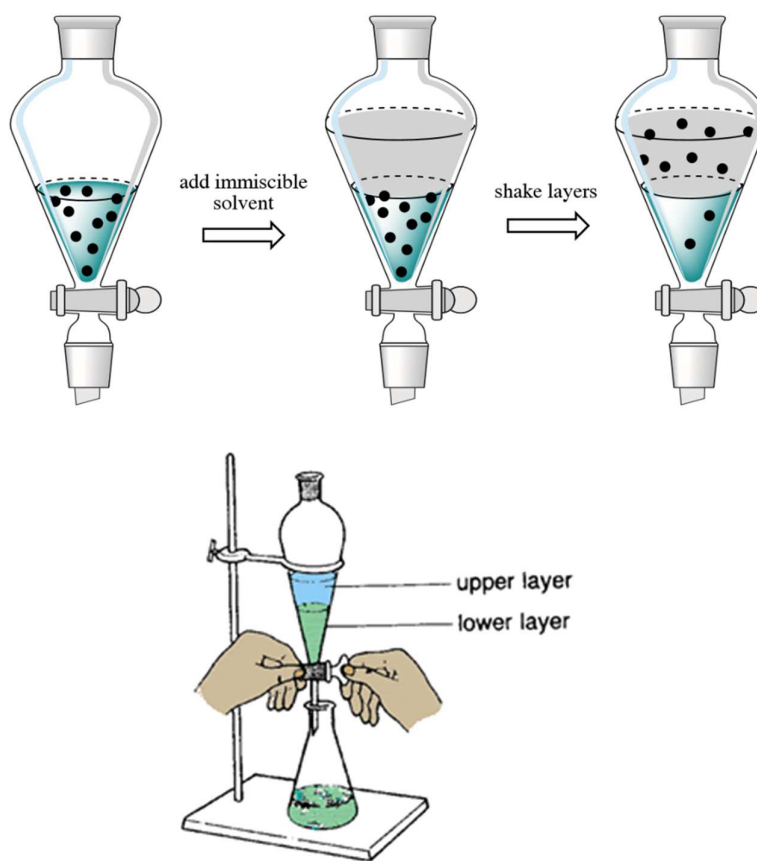
Σχήμα 2.1: Διαδικασία κατακρήμνισης πρωτεϊνών.¹⁸

2.3. Υγρό-υγρό εκχύλιση (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Στην κλασική τεχνική της υγρό-υγρό εκχύλισης, ο διαλύτης του δείγματος έρχεται σε επαφή με έναν μη αναμίξιμο διαλύτη, και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις κατανέμονται στον κατάλληλο διαλύτη εκχύλισης, σύμφωνα με τις ιδιότητές τους. Στη συνέχεια, διαχωρίζονται οι δύο μη αναμίξιμες φάσεις, αυτή που περιέχει τις εκχυλισμένες ενώσεις απομακρύνεται,

εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό σύστημα που χρησιμοποιείται. Στην κλασική της μορφή, η εκχύλιση γίνεται σε ένα διαχωριστικό χωνί ή μια στήλη. Η εκχύλιση υγρού-υγρού παρουσιάζει κάποια αναπόφευκτα προβλήματα όπως είναι τα εξής^{15-17,19}:

- χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών,
- αυξημένος χρόνος προκατεργασίας, λόγω της απαιτούμενης εξατμικής των οργανικών διαλυτών
- σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά την εκχύλιση
- έκθεση σε τοξικούς και εύφλεκτους διαλύτες
- συνεκχύλιση ορισμένων συστατικών με παραπλήσιες ιδιότητες που παρεμποδίζουν την ανάλυση, λόγω μη εκλεκτικότητας των διαλυτών
- αυξημένο κόστος



Σχήμα 2.2: Σχηματική διάταξη της τεχνικής της υγρό-υγρό εκχύλισης.²⁰

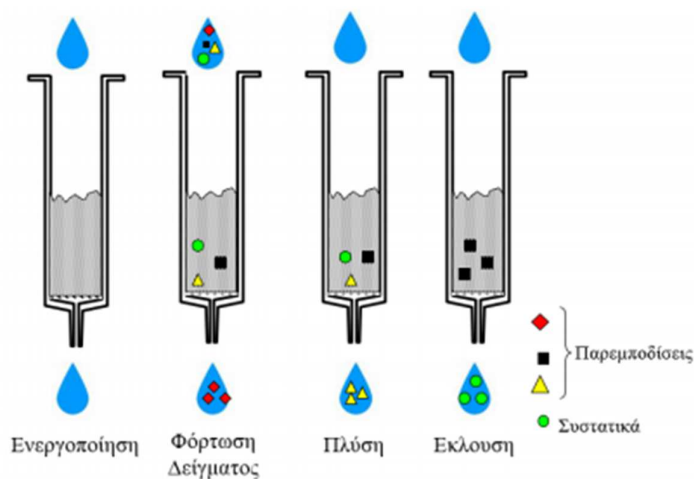
2.4. Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης έγινε γνωστή το 1970 και αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική για την προκατεργασία δειγμάτων. Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε 2 φάσεις: τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσσεις. Μεταξύ των προσδιοριζόμενων ενώσεων, της στερεής και της υγρής φάσης αναπτύσσονται διαμοριακές δυνάμεις που επιτρέπουν τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλυσης των ενώσεων. Συνεπώς, οι ενώσεις παρουσιάζουν ισχυρή συγγένεια με τις ενεργές ομάδες του προσροφητικού υλικού, συγκρατούνται στην επιφάνειά του και διαχωρίζονται από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Η παραλαβή των ενώσεων από το υλικό επιτυγχάνεται με την επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλυσης.^{15,17}

Τα στάδια της SPE είναι τα εξής:

- ✓ •Ενεργοποίηση του προσροφητικού
- ✓ •Φόρτωση του δείγματος
- ✓ •Έκπλυση για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων πολικών συστατικών του υποστρώματος
- ✓ •Έκλυση του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη ή μίγμα διαλυτών
- ✓ •Εξάτμιση του διαλύτη

Στο σχήμα 2.3. δίνονται τα στάδια που ακολουθούνται κατά την εκχύλιση στερεάς φάσης.



Σχήμα 2.3: Στάδια της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE).³

Οι κύριες εμπορικά διαθέσιμες διατάξεις για την SPE είναι οι μικροστήλες σύριγγας, οι μικροστήλες σε μορφή φυσιγγίου, οι μικροστήλες με τεχνολογία δίσκων και τα συστήματα εκχύλισης 96 θέσεων (πλάκες 96-well). Η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού εξαρτάται από τις ιδιότητες της προσδιοριζόμενης ένωσης, τη φύση του υποστρώματος και τις πιθανές παρεμποδίσεις που υπάρχουν στο υπόστρωμα του αναλυόμενου δείγματος.

Τα βασικά πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης είναι ότι:

- Απαιτείται σχετικά μικρός χρόνος εκτέλεσης
- Χρησιμοποιούνται μικροί όγκοι διαλυτών
- Προσφέρει αυξημένη ευαισθησία στην ανάλυση
- Μπορεί να αυτοματοποιηθεί και να αναλυθεί μεγάλος αριθμός δειγμάτων
- Επιτυγχάνεται ικανοποιητικός καθαρισμός του δείγματος και προσυγκέντρωση των συστατικών
- Είναι κατάλληλη τεχνική για συνδυασμό με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας (HPLC, GC κ.ά.)
- Έχει καλή επαναληψιμότητα
- Παρέχει υψηλά ποσοστά ανάκτησης

2.5. Εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά

Η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά με στήλη DPX (Disposable Pipette Extraction) χρησιμοποιείται σε βιολογικά δείγματα. Αποτελείται από μια στήλη συνολικού όγκου 1 mL ή 5 mL και περιέχει ένα προσροφητικό υλικό ανάλογο με αυτό που χρησιμοποιείται στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Κάθε στήλη φέρει μία σύριγγα των 10 mL, η οποία προσαρμόζεται στην κορυφή της στήλης, έτσι ώστε με τη βοήθεια του αέρα να αναμιγνύεται το δείγμα με το προσροφητικό υλικό που βρίσκεται σε διασπορά, αλλά και με τους διαλύτες έκπλυσης και έκλουσης. Σε πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, προτείνεται να απομακρύνεται το άνω προσροφητικό και οι ποσότητες των διαλυτών να εισάγονται από την κορυφή της στήλης με τη βοήθεια της σύριγγας, έτσι ώστε να μη χάνεται κάποια ποσότητα προσροφητικού στα τοιχώματα της στήλης.

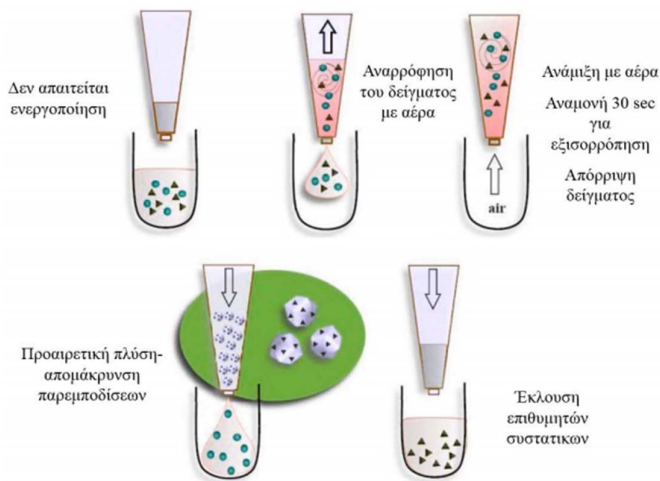
Η βασική διαφορά των στηλών DPX οφείλεται στο γεγονός ότι το προσροφητικό υλικό δεν είναι δεσμευμένο, όπως στην περίπτωση της SPE, αλλά είναι ελεύθερο και σε διασπορά κατά

την επαφή του με τον χρησιμοποιούμενο διαλύτη, έτσι ώστε να υπάρχει η δυνατότητα εισαγωγής και απομάκρυνσης του διαλύτη σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα.¹⁷

Τα στάδια της εκχύλισης με DPX είναι τα εξής:

1. Εισαγωγή του ακροφυσίου του DPX στο δείγμα
2. Αναρρόφηση από το διάλυμα του δείγματος, χωρίς να απαιτείται ενεργοποίηση με μίγμα διαλυτών
3. Ανάμιξη του διαλύματος του δείγματος- προσροφητικού στον αέρα, έτσι ώστε το διάλυμα του δείγματος να γίνει πρακτικά "ψευδό-ομογενές" με το προσροφητικό και να επέλθει ισορροπία.
4. Απομάκρυνση του διαλύματος του δείγματος και επίτευξη ισορροπίας του προσροφητικού με τις ενώσεις που συγκρατήθηκαν (20 δευτερόλεπτα)
5. Πλύση του προσροφητικού υλικού με εισαγωγή του στο κατάλληλο διάλυμα έκπλυσης και ανάμιξη στον αέρα, έτσι ώστε να επέλθει ισορροπία και έπειτα απομάκρυνση του διαλύματος έκπλυσης
6. Έκλυση της στήλης με το μίγμα των διαλυτών έκλυσης και ανάμιξης στο κενό για την επίτευξη ισορροπίας. Επακόλουθη απομάκρυνση του μίγματος διαλυτών έκλυσης
7. Συλλογή του επιθυμητού κλάσματος, απαλλαγμένο από προσμίξεις, ώστε να χρησιμοποιηθεί για χρωματογραφική ανάλυση

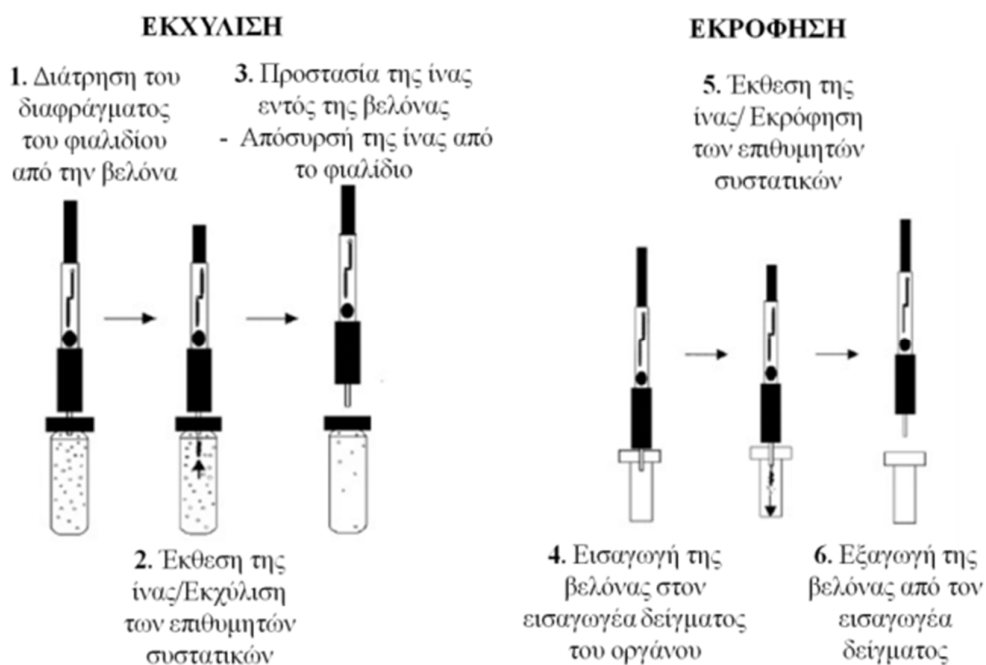
Η διαδικασία αυτή απεικονίζεται και στο σχήμα 2.4.



Σχήμα 2.4: Στάδια εκχύλισης με DPX.³

2.6. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid phase microextraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε το 1990 από τους Arthur και Pawliszyn και επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των 5 – 50 ng/L (ppt) για πτητικά, ημιπτητικά και μη πτητικά συστατικά με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Είναι μια γρήγορη, ευαίσθητη, εύκολα αυτοματοποιούμενη, οικονομική, πράσινη και χωρίς χρήση διαλυτών (solvent-free), διαχωριστική τεχνική. Η τεχνική αυτή αποτελείται από δύο στάδια, τα οποία περιλαμβάνουν ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών από το υπόστρωμα των δειγμάτων. Στο πρώτο στάδιο, μια ίνα τετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου (SiO₂) επικαλυμμένη με μια στατική φάση (coating) από πολυμερές υλικό, εκτίθεται στο φιαλίδιο το οποίο περιέχει το δείγμα, ενώ το προσδιοριζόμενο συστατικό κατανέμεται μεταξύ του υποστρώματος και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης. Στο δεύτερο στάδιο, η ίνα με τα επιθυμητά συστατικά μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αναλυτικού οργάνου για εκρόφηση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Συνήθως, δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού, λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού.^{17,21}



Σχήμα 2.5: Στάδια μικροεκχύλισης στερεάς φάσης.²²

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία εκχύλισης και την εκχυλιστική ικανότητα της SPME εξαρτώνται από:

- την επίστρωση της ίνας
- τον χρόνο δειγματοληψίας και εκρόφησης
- τη θερμοκρασία δειγματοληψίας και εκρόφησης
- την ανάδευση του δείγματος
- την ιοντική ισχύ του διαλύματος

2.7. Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE).

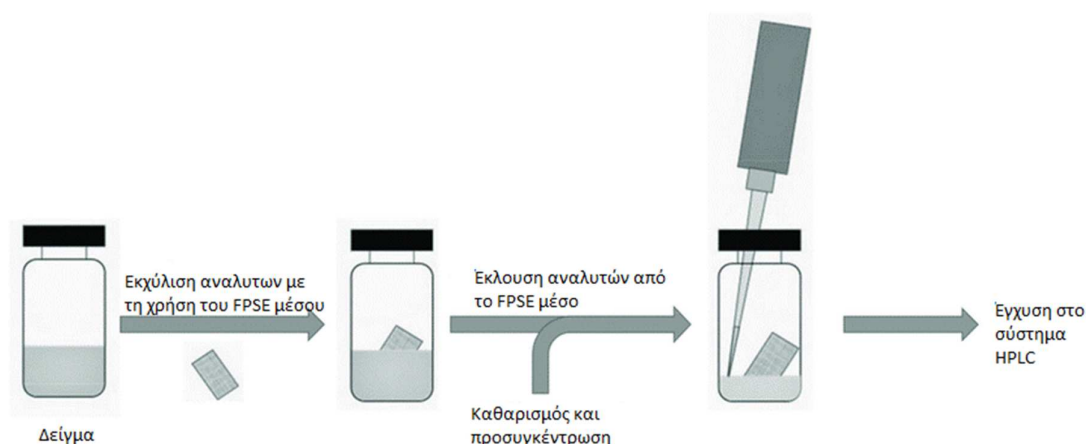
Λαμβάνοντας υπόψη τα προβλήματα που συναντώνται συχνά στις διάφορες τεχνικές προκατεργασίας δείγματος, αναπτύχθηκε μια νέα πράσινη προκατεργασία δείγματος, η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE). Η τεχνική αυτή αναπτύχθηκε το 2014 από τους Kabir και Furton²³. Χρησιμοποιεί ένα φυσικό ή συνθετικό διαπερατό και εύκαμπτο υφασμάτινο μέσο (κυτταρίνη, πολυεστέρας, ίνες υάλου, υδρόφιλο ή υδρόφοβο) ως υπόστρωμα και ένα υβριδικό σύστημα οργανικού-ανόργανου προσροφητικού υλικού που προέρχεται από sol-gel ως μια μορφή λεπτής επίστρωσης. Το επικαλυμμένο με sol-gel FPSE μέσο εισάγεται στο φιαλίδιο δείγματος για να εξαχθεί η αναλυόμενη ουσία. Μετά την εκχύλιση, πραγματοποιείται μια διαδικασία έκλουσης / εκχύλισης ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση / διήθηση πριν από την ανάλυση στο όργανο. Μεταξύ του υποστρώματος και του προσροφητικού μέσου δημιουργείται ένας ισχυρός δεσμός, καθιστώντας το υλικό χημικά και θερμικά σταθερό.

Η τεχνική προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο αποτελείται από τα εξής στάδια:

- ① Ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου FPSE
- ② Εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων
- ③ Έκλουση των προσδιοριζόμενων ενώσεων
- ④ Πλύση του μέσου για μελλοντική χρήση

Όταν ένα μέσο FPSE εκτίθεται απευθείας στο βιολογικό υγρό όπως πλήρες αίμα, πλάσμα και ούρα, τα κυτταρικά υλικά συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών, πεπτιδίων και άλλων

μακρομορίων τείνουν να μπλοκάρουν την επιφάνεια του μέσου εκχύλισης σε περίπτωση που το μέσο δεν είναι βιοσυμβατό. Έτσι λοιπόν η βιοσυμβατότητα είναι ένα πολύ σημαντικό κριτήριο για την επιλογή του προσροφητικού μέσου FPSE. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μεμβράνη sol-gel C18 FPSE δεν είναι βιοσυμβατή και η αδυναμία της να καταργήσει κυτταρικά υλικά όπως πρωτεΐνες, πεπτίδια και άλλα μακρομόρια από την επιφάνειά της μπορεί να είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερο διαθέσιμο προσροφητικό για αλληλεπιδράσεις αναλυτή-προσροφητή και στη συνέχεια χαμηλότερες τιμές εκχύλισης.¹³



Σχήμα 2.6: Στάδια της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο.²⁴

Το μέσο FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αρκετές φορές, χωρίς να υπάρξει απώλεια στην προσροφητική του ικανότητα, καθώς και να εκτεθεί σε οποιοδήποτε οργανικό διαλύτη έκλουσης.

Τα θετικά που παρουσιάζει η τεχνική FPSE είναι τα παρακάτω:

- ✓ Συνδυασμός πλεονεκτημάτων των τεχνικών SPE και SPME
- ✓ Γρήγορη και αποτελεσματική εκχύλιση των ενώσεων σε λίγα βήματα
- ✓ Χρήση μικρού όγκου διαλυτών στο στάδιο της έκλουσης, εξασφαλίζοντας υψηλή προσυγκέντρωση των ενώσεων
- ✓ Απλή διαδικασία προκατεργασίας δείγματος
- ✓ Μείωση κινδύνου απώλειας της προσδιοριζόμενης ένωσης
- ✓ Αποφυγή τυχόν πειραματικών σφαλμάτων και ελαχιστοποίηση της κατανάλωσης οργανικών διαλυτών

✓ Οικονομική και φιλική τεχνική προς το περιβάλλον

2.7.1. Stir FPSE

Η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) μπορεί να ευνοηθεί με την μαγνητική ανάδευση του διαλύματος κατά την εκχύλιση (ή/και κατά την έκλουση). Η τεχνική Stir Fabric Phase Sorptive Extraction (SFPSE), απαιτεί την χρήση ενός επικαλυμμένου sol-gel υβριδικού οργανικού-ανόργανου μέσου FPSE και έναν μαγνητικό μηχανισμό ανάδευσης, προκειμένου να επιτευχθεί η ανάδευση του συνολικού συστήματος εκχύλισης. Για την κατασκευή της συσκευής SFPSE χρησιμοποιείται κάποιο τμήμα ενός φυσιγγίου SPE από πολυπροπυλένιο, ένα FPSE μέσο για τη διαδικασία της εκχύλισης και ένα σύρμα σιδήρου για να επιτραπεί η μαγνητική ανάδευση της συσκευής. Με τον τρόπο αυτό διασφαλίζεται επαρκή διάχυση των αναλυτών εντός του διαλύματος, αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα και μειώνοντας τον χρόνο της εκχύλισης.²⁵



Σχήμα 2.7: Απεικόνιση της τεχνικής Stir Fabric Phase Sorptive Extraction (SFPSE).²⁶

2.7.2. Δυναμική FPSE

Αρκετές τεχνικές της FPSE έχουν μεγάλο χρόνο προκατεργασίας κάτι που οφείλεται στο στάδιο της εκχύλισης. Γι' αυτόν τον λόγο εφαρμόστηκε η Dynamic Fabric Phase Sorptive

Extraction (DFPSE), για πρώτη φορά από τον Lakade και τους συνεργάτες του ²⁷, για την εκχύλιση φαρμακευτικών προϊόντων και προϊόντων προσωπικής φροντίδας από δείγματα ποταμών και λυμάτων. Η DFPSE χρησιμοποιεί κυκλικούς δίσκους από το μέσο FPSE, διαμέτρου 47 mm, οι οποίοι είναι εγκατεστημένοι σε μια συσκευή διήθησης. Οι προσδιοριζόμενοι αναλύτες εκχυλίζονται στους δίσκους FPSE και στην συνέχεια εκλούονται με τη διέλευση του κατάλληλου διαλύτη έκλουσης μέσω της ίδιας συσκευής διήθησης. Κάθε μέσο FPSE κόβεται σε 38-40 δίσκους με ένα εργαλείο κοπής δίσκων (4.0 mm) με την ίδια διάμετρο με την εσωτερική συσκευή διήθησης, συσκευάζονται σε σειρά και στερεώνονται σωστά στο εσωτερικό. Με την Dynamic Fabric Phase Sorptive Extraction (DFPSE) βρέθηκε ότι ο χρόνος εκχύλισης ελαττώνεται κατά πολύ και λαμβάνονται υψηλότερες ανακτήσεις σε σύγκριση με την κλασική FPSE.²⁷

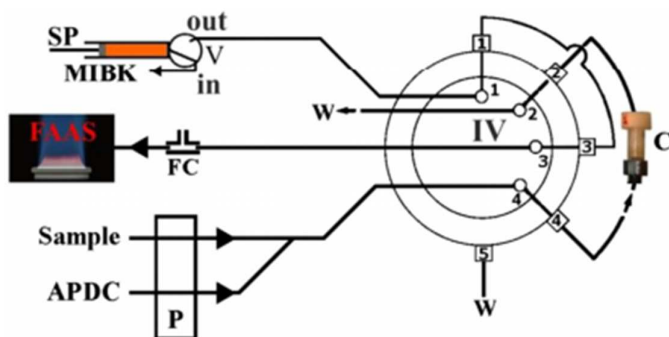


Σχήμα 2.8: Απεικόνιση της Dynamic Fabric Phase Sorptive Extraction (DFPSE).²⁸

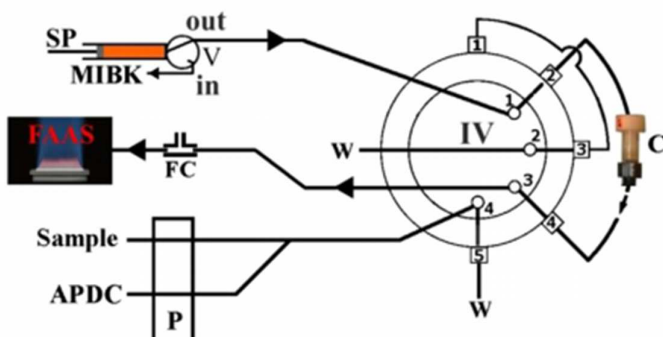
2.7.3. Αυτοματοποιημένη FPSE

Παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα της τεχνικής FPSE, υπάρχει ανάγκη αυτοματοποίησης, προκειμένου να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα, όπως ο υψηλός χρόνος προκατεργασίας δείγματος και η επαναληψιμότητα στη διαδικασία εκχύλισης. Έτσι προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Anthemidis και την ομάδα του ²⁸ η αυτοματοποίηση της τεχνικής FPSE σε on-line μικροστήλες προσυγκέντρωσης. Η νέα on-line flow injection τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο με τη μορφή δίσκων (Fabric Disk Sorptive Extraction, FDSE) σε συνδυασμό με το φασματόμετρο ατομικής απορρόφησης με ατομοποιητή φλόγας (Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS) εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό μολύβδου και καδμίου σε δείγματα φυσικών νερών. Η μικρό-στήλη πληρώθηκε με το μέσο FPSE σε μορφή δίσκων και ενσωματώθηκε στο σύστημα FI, όπως απεικονίζεται στο σχήμα

2.9 στην συγκεκριμένη αυτοματοποιημένη τεχνική, οι μικρό-στήλες προσέφεραν ακόμα μεγαλύτερη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσδιοριζόμενων ενώσεων και των προσροφητικών, μ' αποτέλεσμα να επιτευχθεί μια αποτελεσματικότερη εκχύλιση. Επιπλέον, η νέα πλατφόρμα FDSE παρείχε υψηλή αναπαραγωγιμότητα, σύντομους κύκλους ανάλυσης και καλή ευαισθησία σε σύγκριση με τη «batch» μορφή της FPSE.²⁸



(α) Φόρτωση του δείγματος



(β) Έκλυση

Σχήμα 2.9: Απεικόνιση συστήματος FI-FDSE-FAAS. APDC: υδατικό διάλυμα 0.2% (m/v) διθειοκαρβαμϊδικό αμμώνιο πυρρολιδίνης, MIBK: μέθυλο-ισοβουτύλο κετόνη, W: απόβλητα, P: περιστατική αντλία, SP: αντλία σύριγγας, IV: βαλβίδα έγχυσης στη θέση φόρτωσης ή έκλυσης, V: βαλβίδα δύο θέσεων, FC: μονάδα αντιστάθμισης ροής, C: FDSE στήλη.²⁸

Τα τελευταία χρόνια, η FPSE έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας όσο αφορά την προκατεργασία δείγματος. Μέχρι σήμερα, η τεχνική FPSE έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό διαφόρων οργανικών ενώσεων όπως αντιβιοτικά στο γάλα, ζιζανιοκτόνα τριαζίνης σε περιβαλλοντικά ύδατα, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα σε περιβαλλοντικά δείγματα νερού, βενζοδιαζεπίνες στον ορό του αίματος και άλλα πολλά. Λαμβάνοντας υπόψη τις μεθόδους εκχύλισης που έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία, η

FPSE έχει εφαρμοστεί για την εκχύλιση και τον προσδιορισμό ενώσεων κυρίως σε περιβαλλοντικά δείγματα, σε δείγματα τροφίμων και λιγότερο σε βιολογικά δείγματα.²⁹

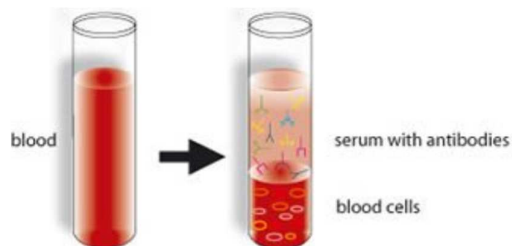
Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) χρησιμοποιήθηκε για την προκατεργασία βιολογικού δείγματος και συγκεκριμένα του ανθρώπινου ορού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Το αίμα είναι ένα σημαντικό μέρος του ανθρώπινου σώματος. Στην πραγματικότητα, περίπου το 7% του σωματικού βάρους του ανθρώπου είναι αίμα, το οποίο στους περισσότερους ανθρώπους είναι περίπου 5 λίτρα αίματος. Το αίμα είναι μέρος του κυκλοφορικού συστήματος, το κέντρο του οποίου είναι η καρδιά. Η καρδιά αντλεί το αίμα σε όλα τα μέρη του σώματος, το οποίο με τη σειρά του βοηθά στη μεταφορά των απαραίτητων θρεπτικών ουσιών και οξυγόνου στα κύτταρα του σώματος. Βοηθά επίσης στην απομάκρυνση των μη χρήσιμων ουσιών και του διοξειδίου του άνθρακα που έχουν παράξει τα κύτταρα. Εκτός από όλα αυτά, το αίμα βοηθά επίσης στη ρύθμιση της θερμοκρασίας, της ισορροπίας του pH και της ισορροπίας του νερού.

Το αίμα αποτελείται από τρία διαφορετικά μέρη: τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια είναι αυτά που μεταφέρουν το οξυγόνο, τα θρεπτικά συστατικά, μη χρήσιμες ουσίες και το διοξείδιο του άνθρακα. Τα λευκά αιμοσφαίρια είναι αυτά που καταπολεμούν τις λοιμώξεις και βοηθούν στην επούλωση τραυμάτων. Τα αιμοπετάλια αίματος βοηθούν στην πήξη του αίματος. Και τα τρία, δηλαδή τα ερυθρά αιμοσφαίρια, τα λευκά αιμοσφαίρια και τα αιμοπετάλια εναιωρούνται στο πλάσμα του αίματος.

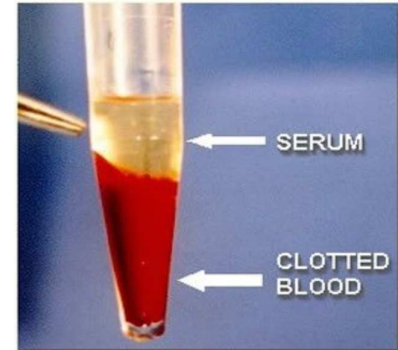
Το πλάσμα περιέχει διάφορες διαλυμένες πρωτεΐνες, γλυκόζη, παράγοντες πήξης, αντισώματα, μεταλλικά ιόντα, ορμόνες και διοξείδιο του άνθρακα. Το πλάσμα είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη μεταφορά των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Το πλάσμα είναι επίσης



σημαντικό στη διαδικασία απομάκρυνσης των άχρηστων ουσιών του αίματος. Λειτουργεί επίσης ως αποθεματικό πρωτεΐνης του ανθρώπινου σώματος και προστατεύει το σώμα από λοιμώξεις και άλλες διαταραχές του αίματος. Διατηρεί επίσης τους ηλεκτρολύτες ισορροπημένους και βοηθά στη διατήρηση της σωστής ισορροπίας pH στο σώμα. Το πλάσμα του αίματος είναι βασικά αυτό που απομένει από το αίμα, μετά την αφαίρεση των ερυθρών αιμοσφαιρίων, των λευκών αιμοσφαιρίων και των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, το πλάσμα του αίματος εξακολουθεί να έχει παράγοντες πήξης όπως τα ινωδογόνα. Μόλις τα ινωδογόνα απομακρυνθούν από το πλάσμα, το διάλυμα που απομένει είναι γνωστό ως ορός.

Ο ορός αίματος περιέχει ακόμα όλες τις πρωτεΐνες που δεν χρησιμοποιούνται στην πήξη του αίματος, καθώς και όλους τους ηλεκτρολύτες, τα αντισώματα, τα αντιγόνα, τις ορμόνες και τυχόν εξωγενείς ουσίες όπως φάρμακα και μικροοργανισμούς.

Ο ορός έχει διάφορες χρήσεις. Χρησιμοποιείται κυρίως σε διάφορους τύπους διαγνωστικών εξετάσεων, συμπεριλαμβανομένου του προσδιορισμού της ομάδας αίματος. Επίσης είναι σημαντικός για την αυτοανανέωση των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων σε συνδυασμό με τον ανασταλτικό παράγοντα της λευχαιμίας κυτοκίνης. Τέλος, είναι χρήσιμος για την ανοσοθεραπεία, όπου ο ορός που λαμβάνεται από το αίμα των ατόμων που έχουν επιβιώσει από μια μολυσματική ασθένεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη θεραπεία για άλλους καθώς περιέχει ήδη τα αντισώματα για αυτό το παθογόνο.³⁰⁻³²



ΟΡΟΣ ΑΙΜΑΤΟΣ

- ✓ Ο ορός είναι το αδιάλυτο, εξωκυτταρικό τμήμα του αίματος μετά την ολοκλήρωση της επαρκούς πήξης.
- ✓ Δεν έχει παράγοντα πήξης.
- ✓ Λαμβάνεται μετά από φυγοκέντρηση του πύματός του αίματος
- ✓ Λιγότερος όγκος σε σύγκριση με το πλάσμα. [Πλάσμα - ινωδογόνο (παράγοντας πήξης) = ορός].
- ✓ Είναι δύσκολο να διαχωριστεί και είναι χρονοβόρο.
- ✓ Έλλειψη ινωδογόνου.
- ✓ Αποτελείται από 90% νερό με διαλυμένες πρωτεΐνες, μέταλλα, ορμόνες και διοξείδιο του άνθρακα.
- ✓ Η πυκνότητα του ορού είναι 1,024 g/mL.
- ✓ Μπορεί να διατηρηθεί στους 2-6 °C για πολλές ημέρες και μπορεί να αποθηκευτεί σε χαμηλή θερμοκρασία στον καταψύκτη για μήνες.
- ✓ Αποτελεί μια σημαντική πηγή ηλεκτρολυτών.
- ✓ Τα κύτταρα συνδέονται συνήθως μαζί με σχηματισμό θρόμβων
- ✓ Το περισσότερο προτιμώμενο μέρος του αίματος που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των ομάδων αίματος και τη διάγνωση ασθενειών.

ΠΛΑΣΜΑ ΑΙΜΑΤΟΣ

- ✓ Το πλάσμα είναι ένα διαυγές, υδατώδες τμήμα του αίματος στο οποίο αιωρούνται διάφοροι τύποι αιμοσφαιρίων
- ✓ Το πλάσμα αποτελείται από ορό και παράγοντα πήξης.
- ✓ Λήφθηκε μετά από φυγοκέντρηση αίματος με αντιπηκτικό.
- ✓ Απαιτούνται αντιπηκτικά για την λήψη πλάσματος.
- ✓ Αποτελείται από το 55% του συνολικού όγκου αίματος.
- ✓ Συγκριτικά ευκολότερο και λιγότερο χρονοβόρο από τον ορό.
- ✓ Περιέχει ινωδογόνο.
- ✓ Αποτελείται από 92% νερό με πρωτεΐνες, άλατα, λιπίδια, γλυκόζη.
- ✓ Η πυκνότητα του πλάσματος είναι 1,025 g/mL.
- ✓ Μπορεί να αποθηκευτεί για ακόμη και 10 χρόνια από την ημερομηνία συλλογής του.
- ✓ Το πλάσμα είναι το κύριο μέσο μεταφοράς μη χρήσιμων προϊόντων.
- ✓ Τα κύτταρα δεν συνδέονται μαζί και εναιωρούνται στο πλάσμα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΕΣΤΕΡΕΣ ΤΟΥ ΠΑΡΑ-ΥΔΡΟΞΥΒΕΝΖΟΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (PARABENS)

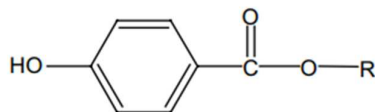
4.1. Εισαγωγή

Η αυξανόμενη πρόοδος έχει οδηγήσει σε αλλαγές του τρόπου ζωής των ανθρώπων με αποτέλεσμα την υπερφόρτωση του ανθρώπινου περιβάλλοντος με όλο και περισσότερες χημικές ουσίες που μπορούν να επηρεάσουν την φυσιολογική λειτουργία του ανθρώπινου σώματος. Τα parabens ανήκουν σε μια γνωστή ομάδα συνθετικών χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε φαρμακευτικά και καλλυντικά προϊόντα και στα τρόφιμα. Οι εστέρες του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος (Parabens) είναι ανθεκτικοί σε μια σειρά περιβαλλοντικών και φυσικών συνθηκών και χρησιμοποιούνται ευρέως στο εμπόριο λόγω της ικανότητάς τους να μειώσουν αποτελεσματικά τη χρήση αντιμικροβιακών παραγόντων. Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρόσθετα συντηρητικών για σχεδόν 100 χρόνια λόγω των αντιμυκητιασικών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Αυτοί οι χημικοί παράγοντες, οι οποίοι πρωτοεμφανίστηκαν στη δεκαετία του 1920, χρησιμοποιήθηκαν ως επί το πλείστον σε φάρμακα και στη συνέχεια η χρήση τους επεκτάθηκε γρήγορα σε τρόφιμα και καλλυντικά προϊόντα, επειδή έχουν χαμηλότερη τοξικότητα και χαμηλότερο κόστος παραγωγής σε σύγκριση με άλλα συντηρητικά. Τα parabens είναι αποτελεσματικά ενάντια στα Grampositive βακτήρια, στην μούχλα και στους μύκητες και δεν έχουν καμία επίδραση στους ιούς.³³⁻³⁶

Τα parabens είναι μια ομάδα ενώσεων που σχηματίζονται από τους εστέρες του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος. Διαφέρουν μεταξύ τους από τον τύπο του υποκαταστάτη, ο οποίος μπορεί να είναι αλκυλική αλυσίδα ή αρωματικός δακτύλιος. Ακολουθούν τα πιο κοινά parabens με γραμμική αλκυλική αλυσίδα ως υποκαταστάτη:

- Methylparaben (MPB)
- Ethylparaben (EPB)
- Propylparaben (PPB)
- Butylparaben (BPB)
- Pentylparaben (PePB)

Το Iso-propylparaben (iPPB) και το iso-butylparaben (iBPB) έχουν ως υποκαταστάτη διακλαδισμένη αλυσίδα, ενώ το benzylparaben (BzPB) έχει ως υποκαταστάτη έναν αρωματικό δακτύλιο.



Σχήμα 4.1: Βασικός σκελετός των εστέρων του πάρα-υδροξυ βενζοϊκού οξέος, όπου R = methyl (CH₃), ethyl (C₂H₅), propyl (C₃H₇), butyl (C₄H₈) κλπ.

Τα parabens πληρούν αρκετά κριτήρια ενός συντηρητικού που το καθιστά ιδανικό για χρήση, όπως είναι τα εξής:³³

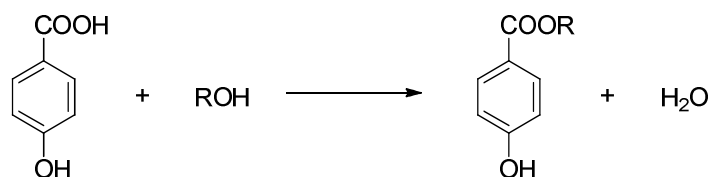
- ✓ ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δραστηριότητας
- ✓ χημική σταθερότητα (για μεγάλο διάστημα θερμοκρασίας και pH που κυμαίνονται από 4,5 έως 7,5)
- ✓ ασφαλή στη χρήση
- ✓ χαμηλός βαθμός συστηματικής τοξικότητας
- ✓ χαμηλό κόστος παραγωγής,
- ✓ καμία αισθητή οσμή ή γεύση
- ✓ είναι σχετικά μη ερεθιστικά
- ✓ είναι επαρκώς διαλυτά στο νερό ώστε να παράγουν την αποτελεσματική συγκέντρωση σε υδατική φάση
- ✓ δεν προκαλούν αλλαγές στη συνοχή ή τον χρωματισμό των προϊόντων

Ο συνδυασμός των ιδιοτήτων αυτών καθιστά σχετικά δύσκολο να βρεθεί ένα συντηρητικό, το οποίο θα μπορέσει να αποτελέσει μια ικανοποιητική αντικατάσταση των parabens. Τα parabens ταξινομούνται ως «γενικά ασφαλείς» (GRAS-Generally Recognized as Safe) ενώσεις και έχουν εγκριθεί για χρήση σε τρόφιμα από τους κανονισμούς της Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων των ΗΠΑ (FDA) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ). Πρόσφατες αναφορές έδειξαν ότι η έκθεση σε parabens μπορεί να τροποποιήσει ή να διαταράξει το ενδοκρινικό σύστημα και συνεπώς μπορεί να έχει επιβλαβείς συνέπειες στην ανθρώπινη υγεία. Αυτές οι μελέτες έχουν δείξει ότι τα parabens έχουν ασθενή οιστρογονική δραστηριότητα, ενώ άλλες έρευνες έχουν μελετήσει τη σχέση μεταξύ της χρήσης αποσμητικών που περιέχουν parabens και της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού. Επιπλέον, ορισμένες πρόσφατες μελέτες έχουν αναφέρει ανεπιθύμητες ενέργειες στην αναπαραγωγή. Παρά το γεγονός ότι

αυτές οι χημικές ουσίες χρησιμοποιούνται ευρέως από τη δεκαετία του 1920, πολλά θέματα που σχετίζονται με τον αντίκτυπό τους στην ανθρώπινη υγεία παραμένουν ανεξήγητα. Για παράδειγμα, η επιρροή τους στο ανθρώπινο ενδοκρινικό σύστημα και οι πιθανές επιπλοκές στην ομοιόσταση που σχετίζονται με αυτά. Έπειτα από αρκετές δοκιμές, τα parabens ταξινομούνται στα χημικά ενδοκρινικής διαταραχής (Endocrine-disrupting chemicals-EDCs). Η συμμετοχή των parabens σε ασθένειες, με βάση τις ορμονικές διαταραχές, έχει επίσης συζητηθεί στο παρελθόν. Έτσι λοιπόν, η κατανόηση των ιδιοτήτων, της εμφάνισης και του μεταβολισμού τους είναι εξαιρετικά απαραίτητη για να εκτιμηθεί η επιρροή τους στο ανθρώπινο σώμα.

4.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες

Τα parabens παράγονται με την εστεροποίηση του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος με μια κατάλληλη αλκοόλη (R-OH), παρουσία ενός καταλύτη (π.χ. πυκνού θεικού οξέος ή πάρα-τολουολοσουλφονικού οξέος).³⁴



Σχήμα 4.2: Εστεροποίηση του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος.

Όσο αυξάνεται το μήκος αλυσίδας του εστέρα του paraben, τόσο αυξάνεται και η αντιμικροβιακή δράση, αλλά μειώνεται η διαλυτότητα του σε πολικούς διαλύτες. Γενικά, ο μικροβιακός αναδιπλασιασμός λαμβάνει χώρα στην υδατική φάση και επομένως η ποσότητα του paraben που είναι διαλυμένη στην υδατική φάση καθορίζει την ικανότητα συντήρησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι μικρότεροι εστέρες (όπως MPB, PPB και EPB) να είναι οι εστέρες που επιλέγονται ως συντηρητικά στα τρόφιμα. Σε όξινα υδατικά διαλύματα, ανεξάρτητα από τη δομή τους, τα parabens αντιστέκονται στην υδρόλυση και είναι σταθερά³⁴. Σε αλκαλικά διαλύματα τα parabens υδρολύονται σε πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη. Με την αύξηση του μήκους αλυσίδας (-R), αυξάνεται η αντίσταση των υδατικών διαλυμάτων των parabens στην υδρόλυση. Η υδρόλυση λαμβάνει χώρα σε pH άνω του 7. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες των parabens είναι ευθέως ανάλογες με το μήκος της

αλυσίδας της εστερικής ομάδας, και έτσι, για παράδειγμα, το BPB έχει 4 φορές μεγαλύτερη ικανότητα να αναστείλει την ανάπτυξη μικροβίων από το EPB. Ωστόσο, ταυτόχρονα με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας αλκυλίου, αυξάνεται η τιμή του συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού, η οποία οδηγεί σε μείωση της υδατοδιαλυτότητας.³⁷ Τα parabens είναι λιπόφιλες ενώσεις με αυξανόμενους συντελεστές κατανομής οκτανόλης / νερού (K_{ow} , συνήθως εκφραζόμενοι ως $\log K_{ow}$) και αντιμικροβιακή δραστηριότητα με αυξανόμενο μοριακό βάρος και μήκος της αλκυλικής πλευρικής αλυσίδας. Τα μοριακά βάρη και οι συντελεστές κατανομής $\log$ οκτανόλης / νερού των parabens συνοψίζονται στον Πίνακα 4.1. Σε καθαρή μορφή, είναι γενικά μικροί άχρωμοι κρύσταλλοι ή κρυσταλλικές σκόνες σχεδόν χωρίς οσμή ή γεύση.³⁷

Πίνακας 4.1: Μοριακά βάρη και συντελεστές κατανομής $\log$ οκτανόλης / νερού των parabens.

Paraben	CAS Number	Μοριακό Βάρος	LogP ³⁷
MPB	99-76-3	152,15	1,66
EPB	120-47-8	166,18	2,19
PPB	94-13-3	180,20	2,71
iPPB	4191-73-5	180,22	2,91
BPB	94-26-8	194,23	3,24
iBPB	4247-02-3	194,25	3,4
BzPB	94-18-8	229,15	3,56

Ένα άλλο σημαντικό στοιχείο, είναι ότι σε συγκεντρώσεις τόσο χαμηλές όσο αυτές που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία νερού, το χλώριο αντιδρά με parabens για την παραγωγή χλωριωμένων παραγώγων. Οι Canosa και οι συνεργάτες του ³³ το 2006 παρατήρησαν ότι ακόμη και λίγα λεπτά επαφής μεταξύ καλλυντικών που περιέχουν parabens (π.χ. αφρόλουτρα μπάνιου) και χλωριωμένου νερού της βρύσης έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό χλωριωμένων και βρωμιωμένων υποπροϊόντων. Μάλιστα, ο ρυθμός αντίδρασης αυξάνεται με τη θερμοκρασία. Αυτό το φαινόμενο είναι ανησυχητικό λόγω της υψηλής σταθερότητας των σχηματιζόμενων χλωριωμένων παραγώγων και της άγνωστης

οιστρογονικής δράσης τους. Επιπλέον, τα χλωριωμένα παράγωγα είναι σημαντικά πιο τοξικά για τους υδρόβιους οργανισμούς από τις αντίστοιχες μητρικές ενώσεις. Τέλος, η προσθήκη parabens στην προσωπική φροντίδα, τα τρόφιμα και τα φαρμακευτικά προϊόντα έχει γίνει κοινή πρακτική σε όλο τον κόσμο. Κατά συνέπεια, η παραγωγή parabens αυξήθηκε δραματικά και οδήγησε στη μόλυνση του πόσιμου νερού, η οποία είχε ως αποτέλεσμα την απορρόφηση των parabens από τα υδρόβια ζώα. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι επιστήμονες έχουν τεκμηριώσει την εκτεταμένη ανίχνευση parabens και των μεταβολιτών τους σε ψάρια, ασπόνδυλα, θαλάσσια φύκια, θαλασσινό νερό, μικροοργανισμούς και ιζήματα ωκεανών.³³

4.3. Πηγές έκθεσης σε parabens

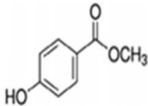
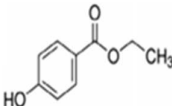
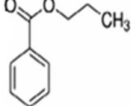
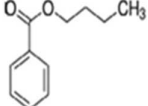
Τα parabens βρίσκονται σχεδόν παντού, έχουν ανιχνευθεί στη σκόνη εντός σπιτιού, σε νερά λίμνης και ακόμη σε ιχθυοστοιχεία σε δείγματα μεταλλικού νερού. Οι τρεις κύριες πηγές σε parabens είναι τα καλλυντικά, τα φάρμακα και τα τρόφιμα. Σύμφωνα με εκτιμήσεις των Ηνωμένων Πολιτειών έχει βρεθεί ότι η μέση ολική έκθεση σε parabens ανά άτομο είναι περίπου 76 mg/d (μέχρι 1,3 mg/kg ημερησίως για ένα άτομο που ζυγίζει 70 kg). Τα καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας παρέχουν περίπου τα δύο τρίτα αυτής της ποσότητας, δηλαδή τα 50 mg/d, τα φαρμακευτικά προϊόντα παρέχουν τα 25 mg/d, ενώ τα τρόφιμα συμβάλλουν μόνο στο 1 mg/d. Η συγκέντρωση των parabens στα τρόφιμα είναι συνήθως μικρότερη από 1%.^{15,33,38}

4.3.1. Καλλυντικά

Τα parabens είναι αντιμικροβιακά που χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε μια μεγάλη ποικιλία καλλυντικών. Εκτιμάται ότι το 75-90% των καλλυντικών περιέχει parabens σε επίπεδα συνήθως 0,01-0,3%. Αυτές οι ενώσεις είναι εστέρες που προέρχονται από το πάρα-υδρόξυ-βενζοϊκό οξύ και εμποδίζουν την ανάπτυξη μυκήτων και μικροβίων, αλλά, με τη σειρά τους, μπορούν να προκαλέσουν παρενέργειες στους καταναλωτές και οργανοληπτικές αλλοιώσεις στα καλλυντικά. Τα MPB, EPB, PPB, και BPB είναι τα πιο κοινά parabens που βρίσκονται στα καλλυντικά.¹⁶ Αυτά τα parabens χρησιμοποιούνται σε σχεδόν όλους τους τύπους καλλυντικών, με αναφερόμενη χρήση σε πάνω από 13.200 σκεύασμα. Η δημοφιλής χρήση των συντηρητικών parabens στα καλλυντικά και τα προϊόντα περιποίησης προκύπτει από τη χαμηλή τοξικότητά τους, το ευρύ φάσμα δραστηριότητας τους, την αδράνεια τους, την παγκόσμια κανονιστική αποδοχή τους, τη βίο-αποικοδόμηση και το χαμηλό κόστος τους. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η εξαιρετική χημική σταθερότητα τους σε σχέση με το pH

(αποτελεσματικό μεταξύ pH 4,5 -7,5) και τη θερμοκρασία³⁴. Πρόσθετες πληροφορίες αυτών των ενώσεων και των αλάτων τους, ειδικά σε σχέση με τα χημικά χαρακτηριστικά και την αντιμικροβιακή δράση, παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.¹⁶

Πίνακας 4.2 : Χαρακτηριστικά των parabens που χρησιμοποιούνται στα καλλυντικά.

Paraben	MP	EP	PP	BP	MP-Na ⁺	EP-Na ⁺	PP-Na ⁺
							
Χημικός Τύπος	C ₈ H ₈ O ₃	C ₉ H ₁₀ O ₃	C ₁₀ H ₁₂ O ₃	C ₁₁ H ₁₄ O ₃	C ₉ H ₉ NaO ₃	C ₁₀ H ₉ NaO ₃	C ₁₁ H ₁₁ NaO ₃
Μοριακό Βάρος	152.15	166.17	180.20	194.23	174.13	188.8	202.18
Κωδικός CAS	99-76-3	120-47-8	94-13-3	94-26-8	5026-62-0	35285-68-8	35285-69-9
Κωδικός E	E218	E214	E216	-	E219	E215	E217
Κωδικός E	8.17	8.22	8.35	8.37			
Διαλυτότητα στους 25°C (%w/w) :							
-H ₂ O	0.25	0.11	0.04	0.02	33	50	50
-Προπυλενογλυκόλη	26	20	29	49	-	-	-
-Αιθανόλη	32	41	50	68	-	-	-
Αντιμικροβιακή Δράση (ελάχιστη συγκέντρωση αναστολής σε %w/w) :							
-Pseudomonas aeruginosa	0.20	0.12	0.08	0.015	0.25	0.13	0.09
-Escherichia coli	0.12	0.08	0.045	0.015	0.17	0.09	0.05
-Proteus Vulgaris	0.20	0.075	0.045	0.01	0.24	0.09	0.55
-Staphylococcus aureus	0.16	0.12	0.045	0.015	0.20	0.14	0.05
-Bacillus cereus	0.15	0.10	0.06	0.015	0.20	0.10	0.06
-Candida albicans	0.13	0.075	0.045	0.01	0.17	0.085	0.035
-Saccharomyces cerevisiae	0.10	0.06	0.025	0.015	0.14	0.075	0.035
-Aspergillus niger	0.08	0.045	0.025	0.015	0.11	0.05	0.025
	0.085	0.045	0.035	0.025	0.10	0.055	0.04
LD ₅₀ (mg/kg) σε ποντίκια ανά μέθοδο χορήγησης:							
-Χορήγηση από το στόμα	>8000	-	6322 to >8000	13,200	2000	1500	3700
-Υποδόρια ένεση	125-1200	-	1650	-	-	-	-
-Ενδοπεριτοναϊκή	760-960	-	640	-	-	-	-

Τα parabens μεμονωμένα ή σε συνδυασμό, χρησιμοποιούνται σε όλες τις κατηγορίες καλλυντικών προϊόντων. Τα προϊόντα που περιέχουν αυτά τα συντηρητικά, ενδέχεται να έρθουν σε επαφή με το δέρμα, τα μαλλιά και το τριχωτό της κεφαλής, τα χείλη, τους βλεννογόνους (του στόματος, των οφθαλμών και του κόλπου), τις μασχάλες και τα νύχια. Οι Doron και οι συνεργάτες του (2001),³⁴ χαρακτήρισαν τα parabens, συμπεριλαμβανομένου του propyl paraben, ως δυνητικοί αντιβακτηριακοί παράγοντες ενάντια σε ακινητοποιημένα ή πλαγκτονικά (ελεύθερα επιπλέοντα) βακτήρια που βρίσκονται στην στοματική κοιλότητα. Τα προϊόντα που περιέχουν parabens μπορούν να χρησιμοποιούνται περιστασιακά ή σε σταθερή βάση και η χρήση τους μπορεί να επεκταθεί για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η συχνότητα και η διάρκεια της εφαρμογής ενδέχεται να είναι συνεχείς. Η χρήση των parabens, μόνα ή σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις, είναι κατάλληλη για τη συντήρηση των καλλυντικών. Τα parabens είναι πιο δραστικά έναντι της μούχλας και των ζυμών και έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στα καλλυντικά για περισσότερο από μισό αιώνα.

Μία ευρωπαϊκή μελέτη έδειξε ότι ανιχνεύθηκαν parabens σε ποσοστό 99 % σε καλλυντικά προϊόντα που προορίζονται στην παρατεταμένη επαφή με το δέρμα ή τα μαλλιά. Οι ερευνητές Zirwas και Moennich³⁸, βρήκαν ότι τα parabens είναι το έβδομο πιο κοινό αλλεργιογόνο στα σαμπουάν. Ενώ το 2014 βρέθηκε ότι, από 4680 γερμανικά προϊόντα, το 39% περιείχε από 1 έως και 5 διαφορετικά παράγωγα του π-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος.

Οι Gabb και Blake³⁹ εξέτασαν 38.975 καταναλωτικά προϊόντα και διαπίστωσαν ότι 4435 περιείχαν methyl paraben (11,4%), 1356 περιείχαν EPB (3,5%) και 1008 περιείχαν BPB (2,6%). Πιο συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τα parabens εντοπίζονται στο 66% έως 87% των γυναικείων καλλυντικών προϊόντων, στο 30% των σαμπουάν, στο 77% έως 82% των κραγιόν, στο 30% των αντηλιακών και στο 23% των υγρών μαντηλιών. Αξίζει να σημειωθεί ότι κανένα από τα 195 αποσμητικά που εξετάστηκαν δεν περιείχαν parabens. Στο σχήμα 4.3 απεικονίζεται το ποσοστό των parabens που ανιχνεύθηκε στα καλλυντικά προϊόντα των καταναλωτών.³⁸



Σχήμα 4.3: Ποσοστό των parabens στα καλλυντικά προϊόντα των καταναλωτών.³⁸

Παρά τα παραπάνω, στην επιστημονική βιβλιογραφία αναφέρονται πιθανές παρενέργειες που σχετίζονται με τη χρήση καλλυντικών που περιέχουν paraben, καθώς αυτά απορροφώνται γρήγορα μέσω του δέρματος. Συγκεκριμένα, επισημάνθηκαν οι ενδοκρινικές διαταραχές. Η αύξηση στο μήκος της αλυσίδας ενός paraben φαίνεται να αυξάνει την οιστρογονική δραστηριότητα. Επιπλέον, η εφαρμογή καλλυντικών που περιέχουν parabens σε άτομα με κατεστραμμένο ή σπασμένο δέρμα μπορεί να προκαλέσει κάποια ευαισθησία. Σε ορισμένες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν σε ζώα, έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες στην αναπαραγωγή. Αν και δεν έχει αποδειχθεί πλήρως, έχει προταθεί μια πιθανή σχέση μεταξύ των αποσμητικών που περιέχουν parabens και του καρκίνου του μαστού. Διαφορετικές ομάδες εμπειρογνομόνων έχουν προτείνει περαιτέρω αξιολόγηση προκειμένου να διευκρινιστεί σε ποιο βαθμό τα parabens που υπάρχουν στα καλλυντικά είναι επιβλαβή.¹⁵

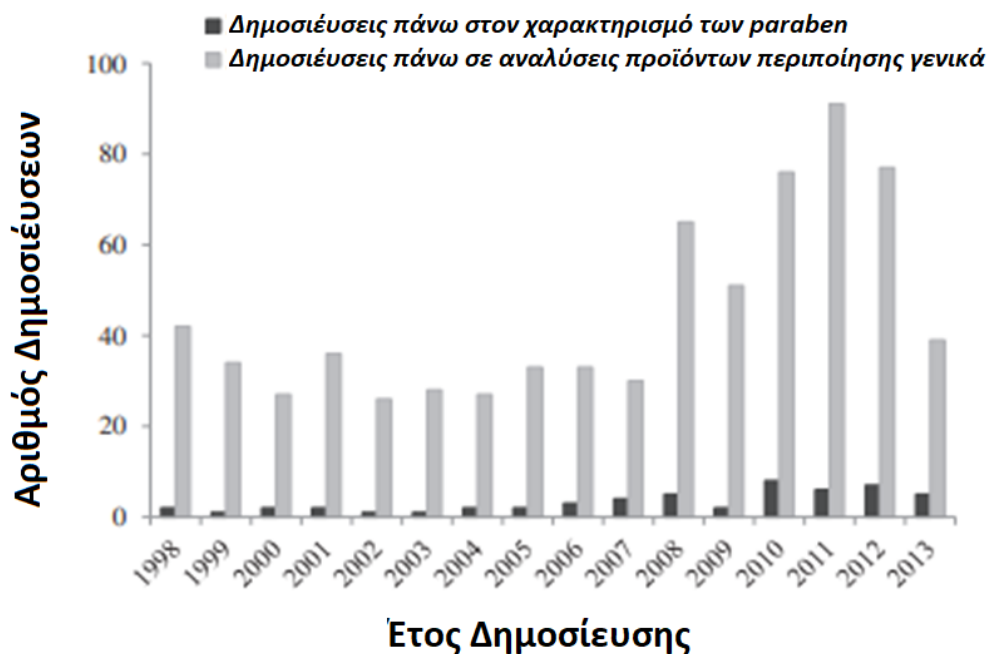
Αν και τα parabens είναι εγκεκριμένα συντηρητικά, η νομοθεσία περιορίζει τη συγκέντρωσή τους στα καλλυντικά σε ορισμένες περιπτώσεις (πίνακας 4.3). Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) και των ΗΠΑ επιτρέπει τη χρήση πάρα-υδροξυ βενζοϊκού οξέος (των αλάτων και εστέρων του) έως 0,4% (ως οξύ) για ένα μόνο paraben και 0,8% (ως οξύ) για μείγματα αυτών. Η νομοθεσία της Δανίας είναι διαφορετική και έχει περισσότερους περιορισμούς, έτσι απαγορεύεται η χρήση των PPB και BPB σε προϊόντα που προορίζονται για βρέφη και παιδιά ηλικίας κάτω των 3 ετών. Αντίθετα, η νομοθεσία στον Καναδά δεν περιορίζει τη χρήση parabens στα καλλυντικά. Ενώ στην Ιαπωνία, η συνολική συγκέντρωση parabens σε ένα καλλυντικό προϊόν δεν μπορεί να υπερβαίνει το 1,0% ^{34,35}. Με βάση τη διαθέσιμη βιβλιογραφία που δείχνει την υψηλή κυτταροτοξικότητα των parabens με υποκαταστάτη διακλαδισμένη ή μακρά αλυσίδα, έχει απαγορευθεί η χρήση του iPPB, του iBPB, του BzBP και του PPB από την Ευρωπαϊκή Ένωση. ⁴⁰

Πίνακας 4.3: Νομοθετικές οδηγίες και μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις των parabens στα καλλυντικά.

Οργανισμός	Οδηγία	Ανώτατη επιτρεπτή συγκέντρωση
Ευρωπαϊκή Ένωση	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία Νο. 1223/2009	0.4% (ως οξύ) για ένα παράγωγο paraben 0.8% (ως οξύ) για μείγμα παραγώγων parabens
Δανία	Υπουργείο Περιβάλλοντος Δανίας. Νομοθετική διαταγή εν αναμονή της θεσμοθέτησης για τα καλλυντικά προϊόντα.	0.4% (ως οξύ) για ένα παράγωγο paraben 0.8% (ως οξύ) για μείγμα παραγώγων parabens
Ηνωμένες Πολιτείες	Ομοσπονδιακό νομοθέτημα περί Τροφίμων, Φαρμάκων και Καλλυντικών προϊόντων	PPB, BPB, iPPB, iBPB και άλατα αυτών δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται σε προϊόντα που προορίζονται για παιδιά κάτω των 3 ετών 0.4% για ένα παράγωγο paraben 0.8% για μείγμα παραγώγων parabens
Ιαπωνία	Ιαπωνικός νόμος περί Φαρμακευτικών θεμάτων	1% για ένα παράγωγο paraben 1% για μείγμα παραγώγων parabens
Καναδάς	Νομοθέτημα περί Τροφίμων και Φαρμάκων	Κανένας περιορισμός

Η πιθανή οιστρογονική δραστηριότητα καθώς και η καρκινογόνος δράση των parabens είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της χρήσης τους ανά τον κόσμο με βάση τις εκάστοτε νομοθεσίες. Αυτό οδήγησε στην έναρξη ενός κινήματος που ονομάζεται «PARABEN FREE», το οποίο επικεντρώνεται στην παραγωγή προϊόντων (κυρίως καλλυντικών) χωρίς parabens στη σύνθεσή τους. Μια μεγάλη ποσότητα καλλυντικών χωρίς paraben κυκλοφόρησαν τα τελευταία χρόνια με πολύ θετική ανταπόκριση από τον καταναλωτή. Η επισήμανση αυτών των προϊόντων αναγράφει συνήθως '0% parabens' ή 'καλλυντικά χωρίς parabens'. Ωστόσο, η έλλειψη συγκεκριμένων ρυθμίσεων διευκολύνει την απάτη στην επισήμανση ³⁵. Η αμφιλεγόμενη και ευρεία χρήση τους, κάνει τα parabens μια ομάδα μορίων που πρέπει να ελέγχεται συνεχώς από αναλυτική άποψη. Το σχήμα 4.4 δείχνει τον αριθμό των δημοσιευμένων εργασιών ανά έτος για τον προσδιορισμό των parabens σε σύγκριση με το συνολικό αριθμό δημοσιεύσεων που αφορούν αναλύσεις καλλυντικών προϊόντων. ¹⁶





Σχήμα 4.4: Ετήσια δημοσιευμένα έργα ανάλυσης καλλυντικών και έργα ανάλυσης parabens.¹⁶

4.3.2. Φάρμακα

Τα parabens χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στα φάρμακα στα μέσα της δεκαετίας του 1900. Μια ποικιλία φαρμακευτικών σκευασμάτων που περιλαμβάνουν τα υπόθετα, τα αναισθητικά, τα χάπια, τα σιρόπια, τα διαλύματα αύξησης βάρους, τα ενέσιμα διαλύματα και τα αντισυλληπτικά, είναι γνωστό ότι περιέχουν parabens ως συντηρητικά. Οι συνδυασμοί parabens είναι πιο δραστικοί από τα μεμονωμένα parabens. Η συγκέντρωσή τους που χρησιμοποιείται, ποικίλλει από προϊόν σε προϊόν, αλλά σπάνια υπερβαίνει το 1%. Το methyl paraben (MPB) και το propyl paraben (PPB) χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά σε πολλά φάρμακα χωρίς ιατρική συνταγή.^{34,35,38,41}



Η επιτροπή οφθαλμιατρικών φαρμάκων του FDA έχει καθορίσει ότι το MPB και το PPB, ενώ παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες δεν είναι κατάλληλα ως συντηρητικά σε οφθαλμικά σκευάσματα, καθώς είναι ερεθιστικά για τα μάτια. Έτσι λοιπόν προτάθηκε να διεξαχθούν περαιτέρω μελέτες διαμόρφωσης και δοκιμές ασφάλειας σε αυτά τα δύο parabens. Το MPB

και το PPB έχουν ταξινομηθεί ως ανενεργά συστατικά σε προϊόντα οδοντιατρικής χρήσης, αντισυλληπτικά, τοπικά αναλγητικά και σε ενέσιμα φάρμακα (μέσω υποδόριας, ενδομυϊκής, ενδοφλεβικής, ενδοαρθρικής και ενδοσυνδυαστικής οδού), εισπνεόμενα και ενδορινικά διαλύματα, καθώς και σε οφθαλμικές αλοιφές, διαλύματα και εναιωρήματα.³⁴

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2016 ⁴², συγκρίθηκαν και κατηγοριοποιήθηκαν τα parabens σε φαρμακευτικά προϊόντα με βάση τον επιδιωκόμενο ρόλο του φαρμάκου (φάρμακο για τον λαιμό, αντιφλεγμονώδη φάρμακα, γαστρεντερικά φάρμακα, φάρμακα κατά της γρίπης και άλλα). Η μελέτη, όμως, δεν έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Δεν κατηγοριοποίησε τα φαρμακευτικά δείγματα με βάση τη φυσική τους κατάσταση (στερεό / υγρό). Ωστόσο, ο Moreta και οι συνεργάτες του (2015) ⁴³ διαπίστωσαν μια αυξανόμενη συχνότητα των parabens στα υγρά φαρμακευτικά προϊόντα. Οι συγγραφείς υπέθεσαν ότι αυτά τα αποτελέσματα σχετίζονται με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε υγρασία των υγρών, η οποία με τη σειρά της απαιτεί την προσθήκη υψηλότερων ποσοτήτων συντηρητικών για τον περιορισμό της ανάπτυξης μικροοργανισμών.

Στην ιστοσελίδα 'Drugs.com' βρίσκεται μια λίστα με φάρμακα που λαμβάνονται από το στόμα και περιέχουν parabens. Μερικά από αυτά φαίνονται στον πίνακα 4.4. Τα 3 πιο κοινά είναι τα methyl paraben, propyl paraben και butyl paraben.

Πίνακας 4.4 : Κοινά φάρμακα που περιέχουν parabens.³⁸

Κορυφαία Φάρμακα με Methylparaben (MPB)	Κορυφαία Φάρμακα με Propylparaben (PPB)	Κορυφαία Φάρμακα με Butylparaben (BPB)
Acetaminophen 325 mg	Acetaminophen 325 mg	Benadryl Allergy Kaggels diphenhydramine 25 mg
Acetaminophen/diphenhydramine 500 mg/12.5 mg	Amantadine hydrochloride 100 mg	Chlordiazepoxide hydrochloride 10 mg
Benzonatate 100 mg	Anacin aspirin-free acetaminophen 500 mg	Diphenhist 25 mg
Chlorpheniramine maleate extended-release 12 mg	Anafranil 25 mg	Diphenhydramine hydrochloride 25 mg
Chlorpromazine hydrochloride 100 mg	Benzonatate 100 mg	Diphenhydramine hydrochloride 25 mg
Cyclobenzaprine hydrochloride 10 mg	Benzonatate 100 mg	Hydroxyurea 500 mg
Disopyramide phosphate 100 mg	Chlorpromazine hydrochloride 50 mg	Leecol 20 mg
Docusate sodium 100 mg	Cyclobenzaprine hydrochloride 10 mg	Loxapine succinate 25 mg
Ergocalciferol 1.25 mg	Dexbrom. maleate/ Pseudoeph. ER 6 mg/120 mg	Loxapine succinate 5 mg
Morphine sulfate SR 30 mg	Dipyridamole 75 mg	Oxazepam 10 mg
Morphine sulfate SR 15 mg	Disopyramide phosphate 100 mg	Phenytion sodium extended 100 mg
Nifedipine 10 mg	Docusate sodium 100 mg	Phrenilin forte acetamin. 650 mg/butalbital 50 mg
Nortriptyline hydrochloride 25 mg	Ergocalciferol 1.25 mg	Seromycin 250 mg
Oxazepam 10 mg	Luoxetine hydrochloride 10 mg	Temazepam 30 mg
Tofranil-PM 75 mg	Methylethylgonovine maleate 0.2 mg	Temazepam 15 mg
Tofranil-PM 125 MG	Oxazepam 10 mg	Tetracycline hydrochloride 250 mg
Valproic acid 250 mg	Tetracycline hydrochloride 250 mg	Theophylline extended-release 200 mg
Verapamil hydrochloride SR 120 mg	Verapamil hydrochloride SR 120 mg	Theophylline extended-release 125 mg
Vimovo esomeprazole 20 mg/naproxen 500 mg	Verelan 180 mg	Theophylline extended-release 300 mg
Zenatane 10 mg	Vimovo esomeprazole 20 mg/naproxen 500	Tylenol extra strength 500 mg

Σύμφωνα με τη Φαρμακευτική Νομοθεσία στα φαρμακευτικά σκευάσματα ένα parabens και ένα μείγμα από parabens δεν μπορούν να υπερβούν το 0,1% και 0,3%, αντίστοιχα ³⁵.

4.3.3. Τρόφιμα

Στα τέλη του 20^{ου} αιώνα, ο οργανισμός FDA ταξινομήσε τα parabens ‘αναγνωρισμένα ως ασφαλή’ (Generally Recognized As Safe, GRAS) ³⁸, παρόλο που η χρήση τους περιορίστηκε από πολλά ιδρύματα. Το 1974, η κοινή επιτροπή εμπειρογνομόνων του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (Food and Agriculture Organization-FAO) / Παγκόσμιας Οργάνωσης Υγείας για τα πρόσθετα τροφίμων (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-JECFA) καθόρισε την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (Acceptable Daily Intake-ADI) για τα MPB, EPB και PPB συνολικά ως 10 mg / kg σωματικού βάρους (WHO, 1974). Ωστόσο, το 2007, ως απάντηση στα συχνά αναφερόμενα προβλήματα υψηλής κυτταροτοξικότητας, το JECFA απέσυρε το PPB από την ADI (WHO, 2007).

Επιπλέον, η παρουσία των parabens στα τρόφιμα, θα πρέπει να κοινοποιείται σαφώς μέσω μιας ετικέτας, με ένα σύμβολο E στο περιτύλιγμα. Τα parabens στα τρόφιμα ταξινομούνται ως «συντηρητικά» μεταξύ E200 – E299 (πίνακας 4.5).

Πίνακας 4.5 : Τα επισημασμένα σύμβολα E των parabens στις ετικέτες των τροφίμων.³⁵

Paraben	MPB	EPB	PPB	HPB
Κωδικός E	E218	E214	E216	E209

Τα parabens προστίθενται στα μεταποιημένα λαχανικά, μπαχαρικά, γαλακτοκομικά προϊόντα, αρτοσκευάσματα και χυμούς. Σύμφωνα με μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε το 2013 ³⁵, στα 282 δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν, περίπου το 99% περιείχε parabens. Η μέση τιμή συγκέντρωσης parabens που υπάρχει στα τρόφιμα βρέθηκε να είναι περίπου 39,3 ng/g του προϊόντος. Οι αναλύσεις των parabens μεταξύ διαφόρων κατηγοριών τροφίμων έδειξαν ότι τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στα λαχανικά (109 ng/g), στα καρυκεύματα (75,4 ng/g) και στα δημητριακά (25,2 ng/g).

Στα πλαίσια μιας μελέτης, συλλέχθηκαν 50 δείγματα φρέσκων λαχανικών από διαφορετικές αγροτικές αγορές στο Πεκίνο της Κίνας, για τη μέτρηση των parabens και μόνο 1 δείγμα ήταν θετικό στο MPB με συγκέντρωση στα 81 μg / kg, όπως καθορίστηκε από την τεχνική

QuEChERS (ίσως η βέλτιστη ανάλυση για την ανίχνευση χημικών καταλοίπων σε φρούτα και λαχανικά). Αντίθετα, μια ξεχωριστή μελέτη στην Κίνα διαπίστωσε ότι σχεδόν όλες οι πηγές τροφίμων περιέχουν τουλάχιστον 1 είδος parabens (προϊόντα δημητριακών, κρέας, θαλασσινά, αυγά, γαλακτοκομικά προϊόντα, φασόλια, λαχανικά και φρούτα).³⁸ Τέλος, όπως είναι λογικό τα φρέσκα τρόφιμα είχαν χαμηλή περιεκτικότητα σε parabens σε σύγκριση με τα μεταποιημένα τρόφιμα.

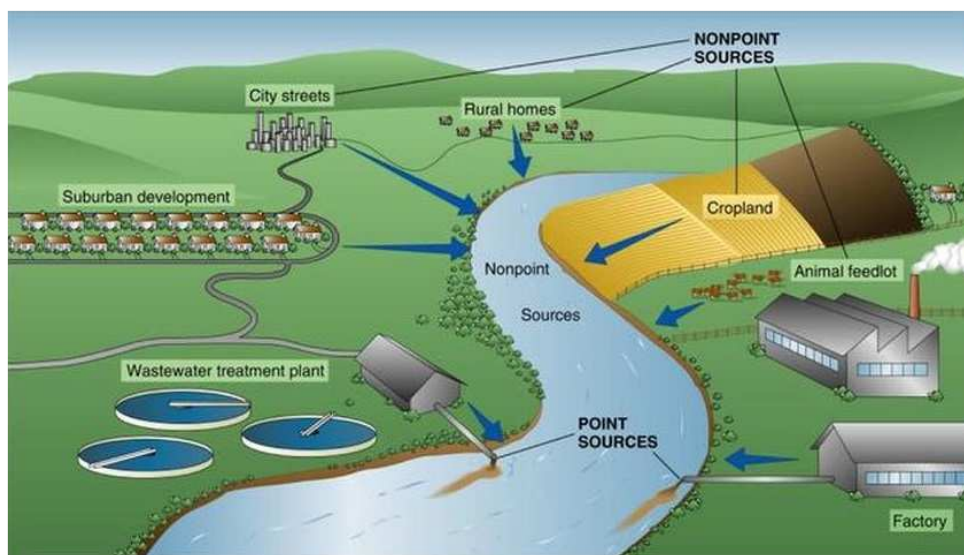
Αρκετά συχνά, δημοσιεύονται λίστες τροφίμων που περιέχουν parabens, μερικά από τα οποία φαίνονται στο σχήμα 4.5.

Αλκοολούχα αναψυκτικά	Χυμοί φρούτων	Πίκλες/Τουρσί
Αρτοσκευάσματα	Ζελέ/Πουτίγκες	Κρούστες
Μπύρα	Σαντιγή	Σαλάτες
Κεϊκ	Μαρμελάδες	Θαλασσινά
Δημητριακά ή πατατάκια	Κέτσαπ	Μαλακά Ζαχαρωτά
Μηλίτες	Υγρά διατροφικά συμπληρώματα	Πικάντικες Σάλτσες
Επικαλυμένοι ξηροί καρποί	Μαριναρισμένα και διατηρημένα προϊόντα αλιείας	Υποκατάστατα Ζάχαρης
Γλυκίσματα (εκτός απο σοκολάτα)	Μαγιονέζα	Προϊόντα επεξεργασίας αποξηραμένων κρεάτων
Βούτυρα	Κρέατα	Ζελατινώδη υλικά συσκευασίας κρεάτων
Προϊόντα γέμισης	Γαλακτοκομικά	Τοματοπελτέ
Σιρόπια με γεύσεις	Μουστάρδα	Γαρνιτούρες
Κατεψυγμένα γαλακτοκομικά προϊόντα	Λάδια	Λαχανικά (επεξεργασμένα/διατηρημένα/φρέσκα)
Χυμοί φρούτων και λαχανικών	Συσκευασμένα κρέατα/ψάρια/πουλερικά	

Σχήμα 4.5: Λίστα τροφίμων και ροφημάτων που περιέχουν parabens.³⁸

4.3.4. Υδάτινοι πόροι

Η ευρεία παραγωγή και χρήση των parabens μπορεί να οδηγήσει στη διαρροή τους στο περιβάλλον. Τα επιφανειακά νερά, λόγω της θέσης τους στα χαμηλότερα σημεία του τοπίου, είναι συχνά πιο επιρρεπή σε μόλυνση. Τα parabens μπορούν να απελευθερωθούν στο υδάτινο περιβάλλον κυρίως μέσω απορρίψεων των επεξεργασμένων λυμάτων, αλλά και μέσω απορροής από μη σημειακές πηγές και εναπόθεσης σωματιδίων από την ατμόσφαιρα. (σχήμα 4.6)



Σχήμα 4.6: Σημειακές και μη σημειακές πηγές μόλυνσης.⁴⁴

Υστερα από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στα ποτάμια της Κίνας, τα πιο συχνά εμφανιζόμενα parabens ήταν το methyl paraben (MPB) και propyl paraben (PPB), οι συγκεντρώσεις των οποίων φτάνουν τις τιμές των 1062 ng/L και 3142 ng/L, αντίστοιχα. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις που εντοπίστηκαν σε ευρωπαϊκά ποτάμια ήταν χαμηλότερες, έως 400 ng/L για το MPB και 69 ng/L για το PPB. Η παρουσία του EPB και του BPB σε δείγματα νερού καταγράφηκε λιγότερο συχνά. Οι συγκεντρώσεις των ενώσεων που μετρήθηκαν ήταν σχετικά χαμηλές σε σύγκριση με το MPB και το PPB και ισούται με 147 ng/L (EPB) και 163 ng/L (BPB).

Η εμφάνιση καθώς και η συγκέντρωση των ρύπων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη θάλασσα. Οι μέγιστες μετρούμενες συγκεντρώσεις των parabens συσχετίστηκαν με συνθήκες που εμφανίζονται σε περιόδους χαμηλού υετού, όπου τα φορτία των ενώσεων διαλύονται σε μικρότερο όγκο νερού, με αποτέλεσμα την αύξηση των συγκεντρώσεών τους. Στη μελέτη ωστόσο, καταγράφηκαν εκπληκτικά υψηλότερες τιμές parabens κατά την περίοδο υψηλών κατακρημνίσεων. Ο λόγος για τον οποίο συνέβη αυτό, ήταν η απόρριψη ορισμένων ακατέργαστων λυμάτων από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων στον ποταμό. Κατά τη διάρκεια ισχυρών βροχοπτώσεων οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων υπερέβησαν και είχε ως αποτέλεσμα, ένα μέρος των μη επεξεργασμένων λυμάτων να απελευθερωθεί απευθείας στο περιβάλλον. Διαπιστώνεται λοιπόν, ότι κατά την εκτίμηση των επιπτώσεων των προϊόντων φαρμακευτικής και προσωπικής φροντίδας στο περιβάλλον θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η

εποχιακή μεταβλητότητα καθώς και οι τοπικές συνθήκες όπου πραγματοποιούνται οι διάφορες μελέτες.³³

4.3.5. Εδάφη, ιζήματα και λάσπη

Η διαλυτότητα των ενώσεων και οι τιμές του συντελεστή κατανομής οκτανόλης-νερού που προσδιορίζουν τη συγγένεια με την οργανική ύλη, υποδηλώνουν ότι η πιθανότητα συσσώρευσης των parabens σε ιζήματα αυξάνεται αναλογικά με το μήκος αλυσίδας του άλκυλο-υποκαταστάτη. Μερικά αποτελέσματα δείχνουν ότι τα parabens, καθώς και τα χλωριωμένα παράγωγά τους, διαχωρίζονται κατά προτίμηση στην αιωρούμενη στερεή φάση στα νερά ποταμού. Οι συγκεντρώσεις των parabens και τα χλωριωμένα παράγωγά τους, είναι αρκετές φορές υψηλότερες στην αιωρούμενη στερεή φάση σε σύγκριση με τη διαλυμένη φάση. Το 2008 πραγματοποιήθηκε μία μελέτη, όπου αναλύθηκαν σειρές parabens, σε δασικά και γεωργικά, εδάφη και ιζήματα από διαφορετικές περιοχές της Ισπανίας. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις στην πλειονότητα των δειγμάτων καταγράφηκαν για το MPB και το PPB (τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα συντηρητικά σε προϊόντα υγείας και ομορφιάς). Οι καταγεγραμμένες τιμές ήταν έως 6,35, 5,10, 0,29, 4,03, 0,71 ng / g ξηρού βάρους (dw) για MPB, EPB, iPPB, PPB και BPB, αντίστοιχα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, γενικά, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις εντοπίστηκαν στα ιζήματα. Αυτό μπορεί να προκύψει από το γεγονός ότι τα ιζήματα συνήθως περιέχουν πολύ οργανικό κλάσμα και μπορεί να έχουν συνεχή επαφή με ρύπους διαλυμένους σε υδατικό διάλυμα, γεγονός που οδηγεί στην απόθεση των parabens. Υψηλά αυξημένη συγκέντρωση βρέθηκε για το BPB (377 ng / g dw) σε δείγματα θαλάσσιων ιζημάτων από μολυσμένη περιοχή στην Τενερίφη, Ισπανία.³³

Το 2012 είχε αναφερθεί⁴⁵ η παρουσία αρκετών parabens σε γεωργικά εδάφη, σε τροποποιημένα εδάφη με επεξεργασμένη λάσπη λυμάτων και σε βιομηχανικά εδάφη, με την υψηλότερη συγκέντρωση σε MPB (έως 8,04 ng/g dw), ακολουθούμενη από το EPB (έως 1,23 ng/g dw) και δύο μορφές BPB (περίπου 1 ng/g dw το καθένα). Επίσης, βρέθηκε ότι το PPB υπάρχει στο έδαφος των κήπων σε τιμές 1,5 ng / g dw. Σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις parabens, έως 127 ng/g dw για το MPB και έως 15–23 ng / g dw για τα EPB, PPB και BPB, βρέθηκαν σε ιζήματα και εδάφη στον Καναδά. Είναι λογικό ότι η απόρριψη λυμάτων στα οικοσυστήματα του νερού, επηρεάζει κατά πολύ τα αποτελέσματα, καθώς ιζήματα από τμήματα του ποταμού που βρίσκονται κάτω από το λοβό διασποράς των λυμάτων είχαν

συγκεντρώσεις parabens 19-56 ng / g dw ενώ ιζήματα από παρθένα ορεινή ροή δεν είχαν καθόλου parabens.

4.3.6. Σκόνη, αέρας

Τα parabens που υπάρχουν στην σκόνη των εσωτερικών χώρων και στον αέρα προέρχονται από προϊόντα προσωπικής φροντίδας που χρησιμοποιούνται στα νοικοκυριά. Η έκθεση του ανθρώπου σ' αυτούς τους ρύπους πραγματοποιείται μέσω της εισπνοής και της κατάποσης από το στόμα.³³ Τα αποτελέσματα μίας μελέτης⁴⁶, έδειξαν ότι οι συγκεντρώσεις των parabens που εντοπίστηκαν στον αέρα εσωτερικών χώρων ήταν έως 21 ng/m³ για το MPB, 4,0 ng/m³ για το EPB και 3,2 ng/m³ για το BPB. Οι εκτιμώμενοι ημερήσιοι ρυθμοί αναπνοής για ενήλικες (16–70 ετών) και παιδιά (0–2 ετών) είναι ίσοι με 185 dm³/kg σωματικού βάρους /ημέρα και 658 dm³/kg σωματικού βάρους /ημέρα, αντίστοιχα. Υποθέτοντας ότι το πιο συχνά ανιχνευόμενο MPB (67%) υπάρχει στον εσωτερικό αέρα σε μέση συγκέντρωση (2,9 ng/m³) και χρησιμοποιώντας τον μέσο ρυθμό αναπνοής, η ημερήσια πρόσληψη σε MPB μέσω της εισπνοής είναι ίση με 0,547 ng/kg σωματικού βάρους/ημέρα και 1,91 ng/kg σωματικού βάρους/ημέρα για ενήλικες και παιδιά, αντίστοιχα. Όταν χρησιμοποιείται η μέγιστη συγκέντρωση σε MPB (21 ng/m³) στους υπολογισμούς, η εκτιμώμενη ημερήσια πρόσληψη ισούται με 3,89 ng/kg σωματικού βάρους/ημέρα (ενήλικες) και 13,8 ng/kg σωματικού βάρους/ημέρα (παιδιά).³³ Οι τιμές των συγκεντρώσεων των parabens στη σκόνη των εσωτερικών χώρων παρουσίασαν μια υψηλή μεταβλητότητα, κάτι το οποίο μπορεί να σχετίζεται με την διαφορετική χρήση προϊόντων προσωπικής φροντίδας. Ωστόσο, τα methyl- και propyl- paraben ήταν αυτά με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Οι μέγιστες συγκεντρώσεις που μετρήθηκαν ήταν 14300 ng/g για το MPB, 3110 ng/g για το EPB, 110800 ng/g για το PPB και 3920 ng/g για το BPB. Παραδόξως, οι συγκεντρώσεις parabens στη σκόνη ήταν πολύ υψηλότερες από αυτές που εντοπίστηκαν στη λάσπη λυμάτων. Οι συνολικές μέσες συγκεντρώσεις των parabens που βρέθηκαν στη σκόνη, είναι οι ακόλουθες με φθίνουσα σειρά: στην Κορέα (2320 ng/g), στην Βόρεια Ιαπωνία (2300 ng/g), στις Βόρειες Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (1390 ng/g) και στην Βόρεια Κίνα (418 ng/g), ενώ η μέση συγκέντρωση του αθροίσματος των τεσσάρων parabens στην Ευρώπη (Ισπανία) ήταν 1399 ng/g. Τέλος, το methyl paraben αντιπροσώπευε το 42 έως το 73% των συνολικών συγκεντρώσεων parabens.

4.4. Μέθοδοι απομάκρυνσης και διάσπασης.

4.4.1. Βιοδιάσπαση.

Διάσπαση είναι η διαδικασία κατά την οποία μία χημική ουσία σπάει σε μικρότερα μόρια με βιοτικό τρόπο (βιοαποικοδόμηση) ή αβιοτικό τρόπο (υδρόλυση, φωτόλυση και οξειδωση).

Χρόνος ημιζωής είναι το μέτρο σταθερότητας και διατήρησης μιας χημικής ουσίας στο περιβάλλον. Ερμηνεύεται ως τον χρόνο που απαιτείται για μια ποσότητα για να μειωθεί στο μισό της, μέσω διάσπασης.

Βιοαποικοδόμηση είναι η διαδικασία με την οποία οι οργανικές ουσίες διασπώνται από ζωντανούς οργανισμούς όπως βακτήρια και μύκητες. Η βιοαποικοδόμηση μπορεί να συμβεί σε επιφανειακά ύδατα, ιζήματα και έδαφος.

Τα parabens έχουν χαρακτηριστεί³³ ως εύκολα βιοαποικοδομήσιμα, υπό αερόβιες συνθήκες, με βιοαποικοδομησιμότητα περίπου 90% της θεωρητικής ζήτησης οξυγόνου (για MPB, EPB και PPB). Το MPB αναφέρθηκε ότι υπέστη υδρόλυση σε πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ σε νερό, με χρόνο ημιζωής ($t_{1/2}$) αρκετών δεκάδων ωρών για βιοτική αποδόμηση και σε αρκετές δεκάδες ημέρες για αβιοτική υδρόλυση. Ωστόσο, το 2011 είχε αναφερθεί ότι η βιοαποικοδόμηση ενεργοποιημένης λάσπης πραγματοποιήθηκε μέσω βιολογικών οδών παρά αβιοτικών διεργασιών ή προσρόφησης. Τα parabens που μελετήθηκαν (MPB, EPB, PPB, BPB και iBPB) ήταν σχεδόν πλήρως βιοαποικοδομημένα (99%) σε λιγότερο από 5 ημέρες, με τον χρόνο ημιζωής να μην υπερβαίνει τις 3 ημέρες. Η επιμονή των ενώσεων αυξήθηκε ελαφρώς με το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας και τον βαθμό χλωρίωσης. Οι χρόνοι ημιζωής των αλογονωμένων παραγώγων του MPB ήταν έως και 10 ημέρες.

4.4.2. Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης

Δεδομένου ότι τα parabens ανιχνεύθηκαν, σε απόβλητα από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων, σε ποτάμια και ακόμα και σε πόσιμο νερό, φαίνεται σκόπιμη η εφαρμογή πιο αποτελεσματικών-αποδοτικών συστημάτων αποικοδόμησης. Λόγω της οικονομικής απόδοσης, της απλότητας και την μη ύπαρξη προβλημάτων μετά τη θεραπεία, οι προηγμένες διαδικασίες οξείδωσης φαίνεται να παρέχουν μια ικανοποιητική λύση. Πρόσφατα, πραγματοποιήθηκαν αρκετές μελέτες αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας και των βέλτιστων συνθηκών για την απομάκρυνση των parabens από υδατικά διαλύματα.³³

Τα αποτελέσματα της φωτόλυσης³³ έδειξαν χαμηλή και μέτρια αποδοτικότητα όσον αφορά την αποικοδόμηση των BPB και iBPB, αντίστοιχα. Οι χρόνοι ημιζωής και οι κβαντικές αποδόσεις (ϕ) των ενώσεων ήταν 410 ώρες για το BPB ($\phi = 7,6-8,6 \times 10.66$) και 580 ώρες για το iBPB ($\phi = 2,3-2,4 \times 10.45$). Η φωτόλυση του υδατικού προτύπου διαλύματος MPB και BPB με ακτινοβολία UVC (254 nm) είχε επίσης χαμηλή απόδοση, με κβαντική απόδοση ίση με $6,07 \times 10^{-3}$ και $3,3 \times 10^{-3}$, αντίστοιχα. Πολύ καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με την εφαρμογή προηγμένων διεργασιών οξείδωσης, όπως οζονισμού, φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης από TiO_2 ή συνδυασμού συστήματος $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$. Στο σύστημα $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, η σταθερά σχηματισμού της αντίδρασης της υδροξυλικής ρίζας με το BPB (k_{OH}) εξαρτάται ελαφρώς από το pH του διαλύματος και τη θερμοκρασία, ενώ οι σταθερές ρυθμού δεύτερης τάξης για την αντίδραση μεταξύ του BPB και όζοντος (k_{O_3}) μειώθηκαν έντονα στο διάλυμα οξέος (pH = 2) σε σύγκριση με αλκαλικό διάλυμα (pH = 12). Το αλκαλικό pH ήταν επίσης ευεργετικό για τη φωτοκατάλυση του BPB από TiO_2 . Η φωτοευαίσθητη οξείδωση του BPB υπό ακτινοβολία ορατού φωτός σε ομογενές υδατικό διάλυμα οδηγεί σε αργή αποικοδόμηση της ένωσης στόχου, κυρίως ως αποτέλεσμα της αντίδρασης με το οξυγόνο απλής κατάστασης. Η φωτοευαίσθητη οξείδωση σε φυσικό νερό, εμβολιασμένη με BPB, αυξήθηκε σε σύγκριση με την αποικοδόμηση σε καθαρό, ρυθμισμένο υδατικό διάλυμα.

4.5. Φαρμακοκινητική

Η φαρμακοκινητική (δηλαδή η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η απέκκριση) των parabens μπορεί να επηρεάσει το κατά πόσο η έκθεση σε αυτές τις ενώσεις τις καθιστά δραστικές ενδοκρινικές χημικές ουσίες στον άνθρωπο. Παρά την ουσιαστικά χαμηλότερη ισχύ τους από τα οιστρογόνα, ο προσδιορισμός του βαθμού στον οποίο αυτές οι ενώσεις μπορούν να φτάσουν σε δυνητικά όργανα-στόχους, μετά την έκθεση τους, θα έχουν κρίσιμες επιπτώσεις σε μια αξιολόγηση του κινδύνου τους.⁴⁷

Μετά από στοματική πρόσληψη όλα τα parabens που έχουν μελετηθεί απορροφώνται γρήγορα και σχεδόν πλήρως από τη γαστρεντερική οδό σε αρουραίους, κουνέλια και σκύλους. Μετά την απορρόφηση τους, τα parabens υδρολύονται εύκολα από εστεράσες του ήπατος, με τον κύριο μεταβολίτη το πάρα-υδροξύ βενζοϊκό οξύ (PHBA). Άλλοι μεταβολίτες, περιλαμβάνουν το πάρα-υδροξυιππουρικό οξύ και εστέρα και μια ποικιλία συζευγμένων γλυκουρονιδίων. Ο μεταβολισμός είναι γρήγορος με τους μεταβολίτες να εμφανίζονται στα ούρα εντός 0,5 ωρών μετά την κατάποση. Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει το μεταβολισμό των parabens σε

ζωντανούς οργανισμούς. Η βιβλιογραφία ³⁵ έχει δείξει ότι τα parabens απορροφώνται μετά από δερματική εφαρμογή, μετά από διατροφική πρόσληψη και μέσω εισπνοής. Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη ³⁴ που διεξήχθη σε αρουραίους, τα parabens απορροφώνται σε μεγαλύτερο επίπεδο μετά από την διατροφική πρόσληψη παρά από αυτό της δερματικής εφαρμογής και αυξάνεται παράλληλα με την αύξηση της θερμοκρασίας του σώματος. Μετά από την δερματική απορρόφηση, στα κερατινοκύτταρα, οι εστέρες του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος (PHBA) υδρολύονται μερικώς σε πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ (PHBA). Ωστόσο, η διαδικασία υδροξυλίωσης δεν μειώνει τις αρνητικές επιδράσεις των parabens, όπως η αυξημένη παραγωγή δραστικών ενδιαμέσων οξυγόνου (ROS) και νιτρικού οξειδίου (NO), καθώς και η νέκρωση των κερατινοκυττάρων. Σε καθημερινή βάση το ανθρώπινο δέρμα εκτίθεται στο φως του ήλιου και σε καλλυντικά που περιέχουν parabens. Έτσι, οι παρενέργειες του MPB που παρατηρήθηκαν προηγουμένως βρέθηκαν να αυξάνονται με ταυτόχρονη έκθεση των κερατινοκυττάρων στην υπεριώδη ακτινοβολία B (UVB).

Οι εστέρες του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος, μετά τη δερματική εφαρμογή ή τη διατροφική πρόσληψη, μεταφέρονται εύκολα στην κυκλοφορία του αίματος. Μελέτες έδειξαν, ότι η συχνότητα ανίχνευσης των MPB, EPB και PPB σε δείγματα ορού που συλλέχθηκαν από 332 γυναίκες ήταν 63%, 22% και 29%, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε ότι η μέση συγκέντρωση MPB, EPB και PPB ήταν ίση με 9,4 ng/mL, 3 ng/mL και 2 ng/mL, αντίστοιχα. Τα parabens έδειξαν σταθερότητα στο *in vitro* πλάσμα αίματος. Ακόμη και μετά από 24 ώρες, το 95% του MPB, το 94,4% του EPB και το 47% του PPB δεν υπέστη μεταβολικό μετασχηματισμό.

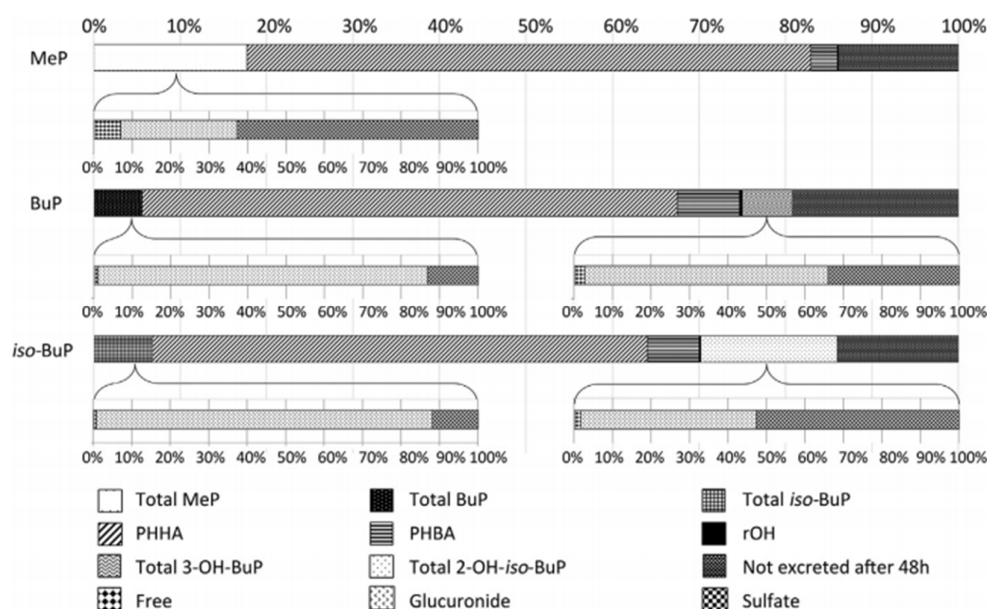
Το πρώτο βήμα της βιομετατροπής των parabens είναι η διαδικασία της υδρόλυσης σε πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ (PHBA) και αλκοόλη. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από εστεράσες, συμπεριλαμβανομένων της καρβοξυλεστεράσης (ανθρώπινη καρβοξυλεστεράση 1 (hCE1) και ανθρώπινη καρβοξυλεστεράση 2 (hCE2)). Αυτά τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από διαφορετική συγγένεια υποστρώματος: το hCE1 δείχνει υψηλότερη συγγένεια με parabens με μικρό άλκυλο υποκαταστάτη (MPB και EPB), ενώ το hCE2 είναι πιο εκλεκτικό έναντι των ενώσεων με μακρά αλκυλική αλυσίδα (BPB και BzPB). Πολλές μελέτες σε ανθρώπους και ζώα έχουν επιβεβαιώσει ότι η υδρόλυση του εστερικού δεσμού σε parabens πραγματοποιείται σε μικροσώματα ήπατος, λεπτό έντερο και εν μέρει στα δερματικά στρώματα. Η ταχύτητα της υδρόλυσης σε μικροσώματα ανθρώπινου ήπατος μειώνεται με την αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας. Η δεύτερη φάση της βιομετατροπής των parabens είναι η σύζευξη με το γλυκουρονίδιο, το θειικό οξύ και τη γλυκίνη, όπου συμβαίνει στα μικροσώματα του ήπατος. Ο σχηματισμός συζυγών με γλυκουρονικό οξύ καταλύεται από το ένζυμο UDP-

γλυκουρονυλοτρανσφεράσες (UGT). Η υψηλότερη δραστικότητα γλυκουρονιδίωσης δείχνει ότι οι ισομορφές UGT ανήκουν σε οικογένειες A1 και 2B (UGT1A1, UGT1A8, UGT1A9, UGT2B7, UGT2B7, UGT2B7, UGT2B). Είναι ενδιαφέρον ότι τα προϊόντα σύζευξης του MPB και του PPB βρέθηκαν να είναι σταθερά στο πλάσμα ακόμη και μετά από 30 ημέρες.⁴¹

Σύμφωνα με μελέτες που πραγματοποιήθηκαν το 2010³⁵ τα parabens μεταβολίζονται στον οργανισμό και δεν συσσωρεύονται στους ιστούς. Ωστόσο, ο ανθρώπινος ιστός του καρκίνου του μαστού έχει δείξει την παρουσία μη μεταβολιζόμενης μορφής paraben, η οποία οδήγησε σε συζητήσεις σχετικά με την καρκινογόνο δράση τους. Η παρατηρούμενη συσσώρευση των MPB, BPB και BzPB σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF7) θα μπορούσε να είναι το αποτέλεσμα της έλλειψης καρβοξυλεστερασών CE1 και CE2 σε αυτά τα κύτταρα, τα οποία μπορούν να λάβουν μέρος στον μεταβολισμό των parabens.

Ο πρωταρχικός τρόπος απομάκρυνσης των μεταβολιτών των parabens (πάρα-υδρόξυ ιππουρικό οξύ και μια ποικιλία συζευγμένων γλυκουρονιδίων) από τον οργανισμό είναι μέσω της απέκκρισης των ούρων και σε μικρότερο βαθμό μέσω περιττωμάτων και χολής (σχήμα 4.7). Η αξιολόγηση των μεταβολιτών των ούρων χρησιμοποιείται στη βιοπαρακολούθηση της έκθεσης των parabens.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μικρές ποσότητες parabens (MPB, EPB και PPB), κυρίως με χαμηλή μοριακή μάζα, εκκρίνονται μέσω των ούρων σε μη μεταβολιζόμενη μορφή (Σχήμα 4.7).



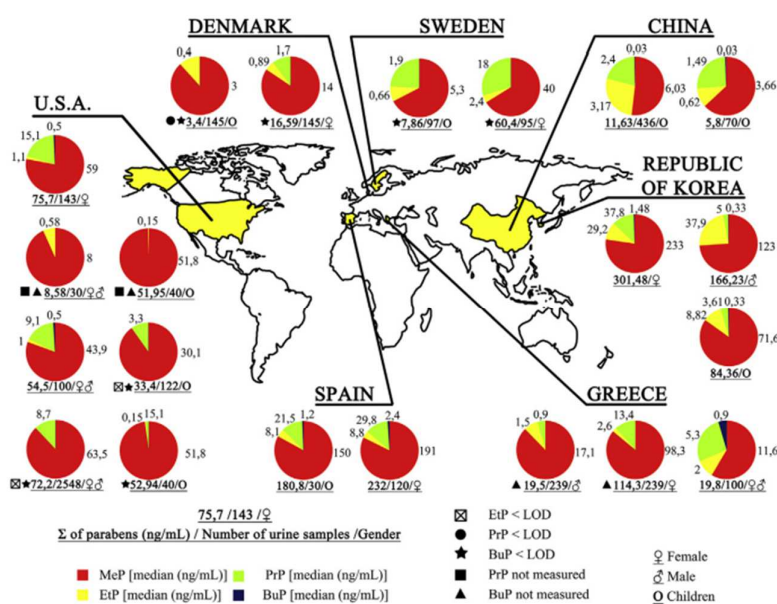
Σχήμα 4.7: Οι μεταβολίτες των parabens στα ούρα. Ο μέσος όρος της απέκκρισης των μεταβολιτών MPB, BPB και iBPB στα ούρα 48 ώρες μετά την χορήγηση τους.³⁵

Τα δείγματα ούρων που ελήφθησαν από 60 άντρες της Δανίας έδειξαν την παρουσία 98%, 80%, 98% και 83% των MPB, EPB, PPB και BPB, αντίστοιχα. Επίσης, παρατηρήθηκαν οι αποκλίσεις στα επίπεδα των parabens στα ούρα μεταξύ των ανθρώπων που ζουν σε διαφορετικές χώρες (Κίνα, Κορέα, Δανία, Σουηδία, Ελλάδα, Ισπανία και ΗΠΑ) (Σχήμα 4.8). Πιθανώς, αυτές οι διαφορές προκύπτουν από τους ισχύοντες νόμους των χωρών σχετικά με τη μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση των parabens στα προϊόντα. Το MPB βρέθηκε να απεκκρίνεται σε τεράστιες ποσότητες. Το PPB βρέθηκε να είναι το δεύτερο υψηλότερο εκκρινόμενο paraben στα ούρα, το οποίο μαζί με το MPB αποτελούν πάνω από το 90% του αθροίσματος των εκκρινόμενων parabens. Επιπλέον, η ποσότητα των υπόλοιπων parabens στα ούρα βρέθηκε ότι μειώνεται με αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας. Είναι ενδιαφέρον ότι έχουν αναφερθεί μεγαλύτερες συγκεντρώσεις parabens στα ούρα σε δείγματα που ελήφθησαν από γυναίκες από ότι σε άντρες. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στις διαφορές που υπάρχουν στη χρήση καλλυντικών προϊόντων από άνδρες και γυναίκες. Τα parabens έχουν επίσης εντοπιστεί στα δείγματα ούρων Αμερικανών παιδιών, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συγκέντρωση και το ποσοστό ανίχνευσης μεταξύ του φύλου των παιδιών.³⁵

Αρκετές μελέτες³⁵ έχουν δώσει πολυάριθμα δεδομένα σχετικά με την παρουσία των parabens σε διάφορους τύπους βιολογικών δειγμάτων, όπως το σπέρμα και το εμμηνορροϊκό αίμα. Σε δείγματα σπέρματος που ελήφθησαν από 60 άντρες της Δανίας, η μέση συγκέντρωση σε MPB, EPB, PPB και BPB βρέθηκε να είναι περίπου 0,99 ng/mL, 0,14 ng/mL, 0,68 ng/mL και 0,06 ng/mL, αντίστοιχα. Αυτή η μελέτη ανέφερε ότι η υψηλότερη μέση συγκέντρωση των parabens ήταν στα ούρα (MPB-17,7 ng/mL, EPB-1,98 ng/mL, PPB-3,6 ng/mL και BPB-0,19 ng/mL), σε σύγκριση με αυτά των δειγμάτων σπέρματος που προέρχονταν από την ίδια ομάδα ανδρών. Στα δείγματα εμμηνορροϊκού αίματος που συλλέχθηκαν από Ισπανές γυναίκες, το ποσοστό ανίχνευσης των MPB, EPB, PPB και BPB βρέθηκε να είναι περίπου 96%, 60%, 92% και 56%, αντίστοιχα. Μεταξύ των μετρούμενων parabens, το MPB βρέθηκε να είναι το κυρίαρχο paraben σε συγκέντρωση 45,5 ng/mL.

Οι έγκυες γυναίκες είναι ομάδα ειδικής φροντίδας και τυχόν επιπλοκές που εμφανίζονται κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης μπορεί να επηρεάσουν την ανάπτυξη του παιδιού. Στις ΗΠΑ, υπήρξε 100% ανίχνευση σε MPB και PPB στα δείγματα ούρων που ελήφθησαν³⁵ από έγκυες γυναίκες, κάτι που είναι πολύ ανησυχητικό. Η μέση συγκέντρωση του MPB και του PPB βρέθηκε να είναι 279 ng/mL και 75,3 ng/mL, αντίστοιχα. Μια άλλη μελέτη μετρήσε τη

συγκέντρωση του MPB και του PPB σε δείγματα ούρων που ελήφθησαν από έγκυες κορεάτισσες και διαπίστωσε ότι τα αποτελέσματα συσχετίστηκαν με τη συγκέντρωση αυτών των ενώσεων στα νεογέννητα μωρά τους. Η εμβρυϊκή έκθεση σε parabens συμβαίνει μέσω της μεταφοράς αυτών των ενώσεων μέσω του ομφάλιου λώρου. Το 2015 διαπιστώθηκε ⁴⁸ ότι η συγκέντρωση των parabens στο αίμα του ομφάλιου λώρου ήταν περίπου 10 φορές χαμηλότερη από εκείνη των ούρων των εγκύων γυναικών. Δυστυχώς, ο κίνδυνος να φτάσουν τα parabens στα βρέφη μέσω του μητρικού γάλακτος είναι επίσης υψηλός. Μελέτες έδειξαν ότι περίπου το 25% και το 50% των δειγμάτων του μητρικού γάλακτος, που ελήφθησαν από τις γυναίκες των ΗΠΑ, περιείχαν MPB και PPB. Στην Αυστρία, από τα 54 δείγματα μητρικού γάλακτος που αναλύθηκαν, βρέθηκαν τα MPB, EPB και BPB σε ποσοστά 26%, 15% και 11% παρόντα, αντίστοιχα. Στα δείγματα μητρικού γάλακτος που μελετήθηκαν στη Βραζιλία, βρέθηκε η παρουσία των MPB, EPB και PPB κατά 100% και του BPB κατά 25%.



Σχήμα 4.8: Συγκεντρώσεις των parabens στα ούρα. Τα γραφήματα κύκλων δείχνουν τη μέση συγκέντρωση των MPB, EPB, PPB και BPB στα δείγματα ούρων που συλλέχθηκαν από άτομα διαφορετικών χωρών. Τα δεδομένα στο γράφημα δείχνουν το άθροισμα (Σ) parabens (ng/mL), την ποσότητα των δειγμάτων ούρων και το φύλο (γυναίκες, άνδρες ή παιδιά). (LOD - όριο ανίχνευσης).³⁵

Σε μία άλλη έρευνα,³⁴ μελετήθηκε ο μεταβολισμός των parabens (methyl, ethyl, propyl και butyl) και του PHBA σε νηστικούς σκύλους μετά από ενδοφλέβια χορήγηση 50 mg/kg ή από του στόματος χορήγηση 1 g/kg. Ανάλογα με το paraben, η ανάκτηση στα ούρα της συνολικής

χορηγούμενης δόσης κυμάνθηκε από 40 έως 95% υποδηλώνοντας ότι η πλειονότητα αυτών των ενώσεων διατήρησε τον βασικό φαινολικό της χαρακτήρα. Σε αυτή τη μελέτη, σε έναν νηστικό άνθρωπο χορηγήθηκε από το στόμα δόση 70 mg/kg methyl paraben και δεν βρέθηκε ανιχνεύσιμη η μητρική ένωση στο πλάσμα ή στα ούρα. Τέλος, δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση σε σκύλους, που τους χορηγήθηκε από το στόμα είτε methyl- είτε propyl- paraben στα 1,0 g/kg/ημέρα για 1 έτος. Σε κουνέλια μετά την χορήγηση, είτε 400 mg/kg είτε 800 mg/kg iso-butylparaben (iBPB), ανακτήθηκε το 32% και 50% της μητρικής ένωσης στα ούρα ως ελεύθερο ή συζευγμένο PHBA μετά από 24 ώρες. Μόνο περίπου το 0,2-0,9% της μητρικής ένωσης ανιχνεύθηκε στα ούρα ως μη μεταβολιζόμενο iso-butylparaben (iBPB).

Επειδή τα περισσότερα προϊόντα που περιέχουν paraben εφαρμόζονται τοπικά στο δέρμα, η δερματική απορρόφηση είναι ιδιαίτερα σημαντική σε σχέση με την εκτίμηση των δόσεων και των πιθανών επιδράσεων. Το δέρμα δεν είναι ένα αδιαπέραστο φράγμα και ανάλογα με το συγκεκριμένο paraben (δηλαδή τον συντελεστή κατανομής K_{ow}) και τον τύπο του σκευάσματος (π.χ. υδατικό ή λιπίδιο), μπορεί να απορροφηθεί κάποιο κλάσμα μιας εφαρμοζόμενης δόσης και να εισέλθει στο κυκλοφοριακό σύστημα, αν και όχι απαραίτητα ως μητρική ένωση.

4.6. Τοξικολογία των parabens

Η εφαρμογή καλλυντικών προϊόντων έχει αναγνωριστεί ως η κύρια πηγή συνολικής έκθεσης του ανθρώπου σε parabens. Η απορρόφηση των parabens επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την ακεραιότητα του δέρματος και τη λειτουργία φραγμού του. Η δερματική απορρόφηση των parabens εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το “όχημα”. Μια *in vitro* μελέτη διάχυσης της επιδερμικής μεμβράνης έδειξε, προβλέψιμα, ότι η απόφραξη με τους πτητικούς διαλύτες ακετόνη και αιθανόλη αυξάνει τη διείσδυση. Αν και παρατηρήθηκε μειωμένη διείσδυση για τα αποφρακτικά οχήματα αλοιφής, οι συγγραφείς υποστήριξαν ότι η κατανομή και η διάχυση εντός της επιδερμικής μεμβράνης λόγω της απόφραξης εξηγούν το φαινόμενο αυτό. Η φιλαγκρίνη είναι μια πρωτεΐνη του δέρματος η οποία διασφαλίζει τη συνοχή μεταξύ των κυττάρων της επιφανειακής στιβάδας του δέρματος. Το 10% των Ευρωπαίων και των Ασιατών έχουν απώλεια στη φιλαγκρίνη με αποτέλεσμα το δέρμα τους να στερείται λιπίδια, τα οποία υπάρχουν φυσικά στην επιφάνειά του για να το προστατεύουν από πιθανές αλλεργιογόνες ουσίες. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, οι ερεθιστικοί παράγοντες που βρίσκονται στο περιβάλλον και συνήθως είναι καλά ανεκτοί, όπως είναι η γύρη, η σκόνη ή ορισμένα προϊόντα προσωπικής υγιεινής, μπορούν να διεισδύσουν το δέρμα. Στους άντρες της Δανίας, εκείνοι με

μη φυσιολογική φιλαγκρίνη είχαν κατά μέσο όρο 80% και 91% υψηλότερη απορρόφηση για methyl- και propyl paraben (MPB, PPB), αντίστοιχα, όπως αποδεικνύεται από μετρήσεις της απέκκρισης των ούρων τους.^{41,49}

Στην μελέτη οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι, μετά από δερματική χορήγηση, μια ορισμένη ποσότητα του MPB δεν μεταβολίζεται και μπορεί να παραμείνει συστηματικά διαθέσιμη, ενώ η ύπαρξη κατεστραμμένου δέρματος μπορεί να διευκολύνει την απορρόφηση. Αποδείχθηκε ότι στο κατεστραμμένο δέρμα απορροφάται συστηματικά έως και 923 μg/kg σωματικού βάρους ανά ημέρα μη υδρολυμένου MPB μετά την εφαρμογή γαλακτώματος που περιέχει methyl paraben. Έτσι, ένα υγιές δέρμα είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του φραγμού.

Όταν εξετάζεται η διαφορά φύλου στη χρήση καλλυντικών, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις ούρων στις γυναίκες είναι διπλάσιες από αυτές που παρατηρούνται στους άνδρες. Πρέπει να ληφθεί υπόψη και η φύση του προϊόντος, για παράδειγμα, ενυδατικά που εφαρμόζονται σε μεγαλύτερες επιφάνειες σώματος και προϊόντα που παραμένουν παρατεταμένο χρόνο στο δέρμα, αυξάνουν την πιθανότητα απορρόφησης. Επειδή τα parabens με μικρότερες ομάδες πλευρικής αλυσίδας έχουν μεγαλύτερο δυναμικό διείσδυσης στο δέρμα και του δέρματος λόγω λιποφιλίας, το MPB έχει αποδειχθεί ότι απορροφάται με υψηλότερο ρυθμό από άλλα parabens.^{41,49}

4.6.1. Χρόνιες επιπτώσεις στο δέρμα

Οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες επικεντρώθηκαν σε μακροχρόνιες επιδράσεις. Αν και είναι γνωστά πολλά για τη διείσδυση των parabens μέσω του ανθρώπινου δέρματος και τον μεταβολισμό των απορροφούμενων parabens, πολύ λιγότερα είναι γνωστά για τις επιδράσεις που έχουν στο ίδιο το δέρμα. Τα parabens θεωρήθηκαν σχετικά μη ερεθιστικά σε επίπεδα που χρησιμοποιούνται στα τρέχονα παρασκευάσματα. Αυτός ο ισχυρισμός υποστηρίζεται από δεδομένα που συλλέχθηκαν από μια επιδημιολογική μελέτη 4.226 υγιών ατόμων που χρησιμοποίησαν δοκιμασμένα 151 διαφορετικά σκευάσματα που περιέχουν parabens (μαζί με άλλα συστατικά). Στην πραγματικότητα εντοπίστηκε μια τάση για μειωμένο ερεθισμό. Σε αυτήν την αναδρομική ανάλυση, 1.363 μελέτες αθροιστικού ερεθισμού σε περισσότερα από 45.000 άτομα δεν έδειξαν ότι τα parabens είναι ερεθιστικά σε τυπικές συνθήκες χρήσης και οι βαθμολογίες ερεθισμού δεν συσχετίστηκαν με συγκεντρώσεις συντηρητικών.⁴⁹

Το δέρμα είναι ένα ανοσολογικό όργανο καθώς και ένα φυσικό φράγμα. Ως ανοσολογικό αμυντικό σύστημα διασύνδεσης, είναι σημαντικό για την κανονική επούλωση τραυμάτων και

την πρόληψη λοιμώξεων. Τα κερατινοκύτταρα παρακολουθούν αυτές τις άμυνες μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων (υποδοχείς που μοιάζουν με διόδια, υποδοχείς μαννόζης και υποδοχείς ολιγομερισμού που συνδέονται με νουκλεοτίδια), οι οποίοι αναγνωρίζουν μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα, όπως μαστιγίνη, νουκλεϊκά οξέα, λιποπολυσακχαρίτες και πεπτιδογλυκάνη. Τα ενεργοποιημένα κερατινοκύτταρα ξεκινούν την έμφυτη ανοσοαπόκριση, με αποτέλεσμα την έκκριση αντιμικροβιακών πεπτιδίων, κυτοκινών και χημειοκινών, τα οποία σκοτώνουν άμεσα βακτήρια, μύκητες και ιούς. Είναι λογικό ότι τα τοπικά εφαρμοζόμενα μικροβιοκτόνα μπορεί να επηρεάσουν δυσμενώς αυτήν τη φυσική ανοσολογική βακτηριακή ισορροπία, αλλά μελέτες έχουν δείξει μικρή ή καθόλου άμεση επίδραση στην οικολογία της μικροχλωρίδας.

Ωστόσο, ζητήθηκε συνεχής επιτήρηση των συντηρητικών επιδράσεων στο μικρόβιο του δέρματος λόγω της ευέλικτης και επιλεκτικά προσαρμοστικής φύσης που επιδεικνύει το μικρόβιο. Η χρήση καλλυντικών στο «δυτικό δέρμα» έχει εμπλακεί ως μείωση της ποικιλότητας των μικροβίων σε σύγκριση με το «δέρμα που δεν έχει εκτεθεί», γεγονός που υποδηλώνει ένα λιγότερο υγιές και λιγότερο αποτελεσματικό οικοσύστημα. Αντίθετα, μια άλλη μελέτη έδειξε αυξημένη ποικιλία βακτηριακών ειδών μετά τη χρήση καλλυντικών ανεξάρτητα από την κατάσταση ενυδάτωσης.

Έχει βρεθεί⁴⁹ ότι, η καθημερινή εφαρμογή του MPB στο ανθρώπινο δέρμα για 1 μήνα μειώνει τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων, αλλάζει την κυτταρική μορφολογία και μειώνει τις εκφράσεις των υαλουρονάνης συνθετάσης 1 και 2, mRNA και κολλαγόνο τύπου IV. Επίσης, η έκθεση σε parabens μπορεί να προκαλέσει κυτταρικές αλλαγές, λόγω του ότι τα κύτταρα που έχουν υποστεί αγωγή με methyl paraben παρουσιάζουν διακοπή του κυτταρικού κύκλου G2 / M₁ (όπου G2 είναι μία φάση της μεσόφασης του κυτταρικού κύκλου), το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει σε κυτταρική γήρανση εάν η βλάβη του DNA δεν επιδιορθωθεί.

4.6.2. Οιστρογονικές και αντι-οιστρογονικές επιπτώσεις

Τα parabens έχει αποδειχθεί ότι μεταβολίζονται ταχέως και απεκκρίνονται μέσω των ούρων, με βιολογικό χρόνο ημιζωής μικρότερο από 24 ώρες. Η μετατροπή τους από εστεράσες στο δέρμα και το ήπαρ είναι αποτελεσματική και ο πρωταρχικός μεταβολίτης, το πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ, έχει σημαντικά ασθενέστερη ξενοοιστρογονικότητα. Ότι τα parabens είναι ασθενώς οιστρογόνα φαίνεται να υποστηρίζονται καλά από τα υπάρχοντα δεδομένα διάφορων εργαστηριακών και ζωικών μελετών.

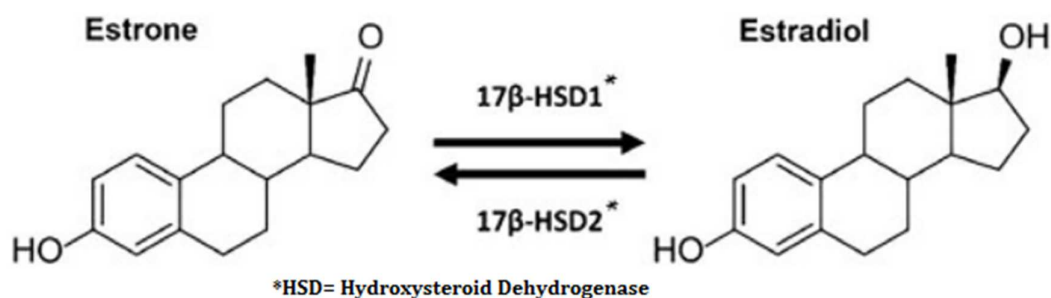
Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) καταγράφει έναν εξαντλητικό κατάλογο χημικών με οιστρογονικό δυναμικό, το οποίο διατηρεί το Υπουργείο Περιβάλλοντος και Τροφίμων στη Δανία. Συνολικά, υπάρχουν 194 τέτοιες ουσίες σε αυτόν τον κατάλογο μαζί με τα MPB, EPB, PPB και BPB, μαζί με το παραπροϊόν του *in vivo* μεταβολισμού τους, του πάρα-υδρόξυ βενζοϊκού οξέος. Οι κατηγορίες χημικών για τις οποίες υπάρχει υποψία ότι έχουν ενδοκρινική δράση ιεραρχούνται σύμφωνα με το επιστημονικό επίπεδο επιβεβαίωσης κινδύνου. Συνολικά, υπάρχουν 3 κατηγορίες, με τον πλήρη κατάλογο που παρατίθεται στο παράρτημα Χ της ΕΕ. Τα 4 parabens που αναφέρθηκαν προηγουμένως και το πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ βρίσκονται στην κατηγορία 1, όπου οι καταγεγραμμένες χημικές ουσίες έχουν αποδειχθεί ότι δείχνουν ενδείξεις πιθανής ενδοκρινικής διαταραχής (και έτσι ορίζονται ως μια ένωση ενδοκρινικού διαταράκτη [EDC]). Η κετοκοναζόλη, η ρεσορκινόλη και τα ενεργά αντηλιακά συστατικά 2-αιθυλεξυλ 4-μεθοξυκιναμικό και μεθυλοβενζυλιδενο καμφορά παρατίθενται επίσης στην κατηγορία 1. Η κατηγορία 2 (όπου υπάρχει απόδειξη βιολογικής δραστηριότητας, αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις ενδοκρινικής διαταραχής) περιλαμβάνει την 2-υδροξυ 4 - μεθοξυβενζοφαινόνη. Η κατηγορία 3 αντιπροσωπεύει το υπόλοιπο του παραρτήματος Χ, με την υποδιαίρεση «α» για ουσίες για τις οποίες δεν υπάρχουν ενδείξεις για ιδιότητες διαταραχής του ενδοκρινικού συστήματος και «b» για ουσίες για τις οποίες δεν έχουν συγκεντρωθεί ή υπάρχουν ανεπαρκή δεδομένα (n = 109). Τα μέταλλα και τα καρβαμικά άλατα είναι αξιοσημείωτα σε αυτήν τη λίστα, συμπεριλαμβανομένων αλουμινίου, καδμίου, χαλκού, μολύβδου και υδραργύρου. Και οι 3 κατηγορίες κυριαρχούνται από εντομοκτόνα, φυτοφάρμακα, ζιζανιοκτόνα και άλλα χημικά ενεργά μικροβιοκτόνα. Πρόσθετες ουσίες που εμπλέκονται ως πιθανοί ενδοκρινικοί διαταράκτες στα καλλυντικά, περιλαμβάνουν άλατα αργιλίου και τρικλοζάνη. Είναι ενδιαφέρον ότι το iPPB και το iBPB αναφέρονται σε πολλές δημοσιεύσεις ως "γνωστοί ενδοκρινικοί διαταράκτες", αλλά δεν περιλαμβάνονται στην ομάδα με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες κατηγορίας 1 της ΕΕ.⁴⁹

Οι ισχυρισμοί ότι τα parabens εμφανίζουν ενδοκρινική δράση βασίζονται σε *in vitro* και *in vivo* μελέτες⁴⁹. Ωστόσο, η ισχύς των δεδομένων προς υποστήριξη αυτού του ισχυρισμού αμφισβητήθηκε, με βάση τη φύση των δημοσιευμένων μελετών. Ως «ασθενή οιστρογόνα», τα parabens έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν ένα μικρό κλάσμα της δραστηριότητας της φυσικής οιστραδιόλης. Πιστεύεται ότι όλα τα εμπορικά χρησιμοποιούμενα parabens έχουν ποικίλους βαθμούς οιστρογονικής ισχύος, εξού και η ένταξή τους ως endocrine disruptors chemicals (EDC)⁴⁹. Ο Routledge και οι συνεργάτες του⁵⁰ ανέφεραν για πρώτη φορά την οιστρογονική δραστηριότητα τμημάτων των parabens το 1998. Επιβεβαίωσαν επίσης τη χαμηλή ισχύ των

parabens σε σχέση με την ξενοοιστρογονικότητα. Υπολόγισαν ότι τα 4 πιο συχνά χρησιμοποιούμενα parabens στα καλλυντικά προϊόντα είναι 10.000 φορές λιγότερο ισχυρά (butylparaben) ή χαμηλότερα (MPB, EPB, PPB) σε σύγκριση με την 17β-οιστραδιόλη. Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι «η ασφάλεια στη χρήση αυτών των χημικών πρέπει να επανεκτιμηθεί, δίνοντας ιδιαίτερη προσοχή στην εκτίμηση των πραγματικών επιπέδων συστημικής έκθεσης στους ανθρώπους. Η απόκτηση τέτοιων δεδομένων αποτελεί προϋπόθεση για την παραγωγή αξιόπιστων εκτιμήσεων σχετικά με τον πιθανό κίνδυνο έκθεσης του ανθρώπου σε parabens.

Ο μηχανισμός της οιστρογονικής δράσης των ξενοβιοτικών ουσιών parabens δεν είναι καλά κατανοητός. Οι εστέρες των parabens μεταβολίζονται ταχέως *in vivo* στον σχετικά ανενεργό μεταβολίτη πάρα-υδρόξυ βενζοϊκό οξύ, αλλά είναι άγνωστο σε ποιο βαθμό οι μικρομοριακές συγκεντρώσεις τους, διαταράσσουν τη φυσιολογική δραστηριότητα του οιστρογόνου.

Μία υπόθεση συσχετίζει την πιθανή βιολογική δραστικότητα με την αναστολή της ενζυμικής δραστηριότητας. Αυτοί οι συγγραφείς διαπίστωσαν ότι όλα τα parabens αναστέλλουν την 17β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση τύπου 2 σε συγκεντρώσεις μικρομορίων, με 50% ανασταλτική συγκέντρωση μεταξύ 1 και 10 μM. Αυτό το επίπεδο αναστολής της ενζυμικής δραστικότητας θα αύξανε τη μετατροπή της οιστραδιόλης σε ασθενέστερη οιστρόνη. Παρόμοια εύρη συγκεντρώσεων μικρομορίων αναστέλλουν επίσης την 17β-υδροξυστεροειδή αφυδρογονάση τύπου 1, με τρόπο που εξαρτάται από το μέγεθος περίπου στο ίδιο επίπεδο, με το heptylparaben και το hexylparaben ως τα πιο δραστικά (αυξανόμενη οιστρογονική δραστικότητα). Η ισορροπία αναστολής αυτών των αντιδραστικών ενζύμων που θα υπαγόρευαν το βιολογικό αποτέλεσμα εξαρτάται από το μέγεθος της πλευρικής αλυσίδας paraben (Σχήμα 4.9)



Σχήμα 4.9: Ανταγωνιστική ενζυμική δραστικότητα και δραστικότητα παραγώγων οιστρογόνων.⁴⁹

Είναι σημαντικό όταν εξετάζονται οι βιολογικοί κίνδυνοι να λαμβάνεται υπόψη και ο ξενιστής. Υπάρχουν κρίσιμες περίοδοι ανάπτυξης ευαισθησίας σε ενδοκρινικούς δραστικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των φυσικών και συνθετικών ορμονών. Το έμβρυο και τα μικρά παιδιά θεωρούνται ότι είναι πιο ευάλωτα στις εκθέσεις των EDC, πάνω στο οποίο βασίστηκε η απόφαση της ΕΕ να απαγορεύσει τα parabens σε προϊόντα που προορίζονται σε παιδιά ηλικίας κάτω των 3 ετών. Ο ηλικιωμένος πληθυσμός μπορεί επίσης να είναι πιο ευαίσθητος στο ενδεχόμενο ενδοκρινικής διαταραχής, επειδή ο μεταβολισμός μειώνεται με την ηλικία.

4.6.3. Καρκίνος του μαστού

Τα parabens είναι ανενεργά σε κλασικές δοκιμασίες για μεταλλαξιογένεση και καρκινογένεση. Ο ρόλος των οιστρογόνων στην έναρξη του καρκίνου του μαστού, καθώς και ο αντίκτυπος τους στην ανάπτυξη, την εξέλιξη και τη μετάσταση είναι καλά τεκμηριωμένος. Οι παράγοντες που αυξάνουν τον κίνδυνο καρκίνου του μαστού είναι η πρόωπη εμμηνόπαυση, η καθυστερημένη εμμηνόπαυση, η καθυστερημένη έναρξη της τεκνοποίησης, το οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του μαστού, η γενετική ευαισθησία, το ιστορικό έκθεσης σε ιονίζουσα ακτινοβολία, η υπερβολική κατανάλωση αλκοόλ και η παρατεταμένη χρήση οιστρογόνων και προγεστερόνης σε γυναίκες που βρίσκονται στην μετεμμηνόπαυση.

Όταν έγινε εμφανές ότι τα parabens εμφανίζουν θεωρητικές δυνατότητες μίμησης οιστρογόνου το 1998 και ότι σχετίζονται με οιστρογόνα που εμπλέκονται στην αιτία του καρκίνου του μαστού, το ενδιαφέρον για την ξενοοιστρογόνο επίδραση των parabens (και άλλων χημικών) στην αιτία του καρκίνου κέρδισε δυναμική.⁴⁹ Η οιστρογονική δραστηριότητα των parabens στα MCF-7 καρκινικά κύτταρα του ανθρώπινου μαστού, ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Byford και τους συναδέλφους του ⁵¹. Οι Wróbel και Gregoraszcuk ⁵² επιβεβαίωσαν τις επιδράσεις των parabens στο επίπεδο της επίδρασης του τροφικού υποδοχέα και της μεταγραφής της πρωτεΐνης. Η συνεπής αύξηση των επιπέδων ER1 mRNA και η έκφραση πρωτεΐνης τόσο στις καλοήθειες (MCF-10a) όσο και στις κακοήθειες (MCF-7) κυτταρικές σειρές ταυτοποιήθηκε σε συγκέντρωση 20-nmol/L. Μεταβλητές επιδράσεις παρατηρήθηκαν στα επίπεδα του PGR και του ER₂ mRNA και στην έκφραση της πρωτεΐνης μεταξύ διαφόρων εστέρων των parabens και κυτταρικών σειρών.

Μεταγενέστερες μελέτες ^{53,54} έχουν προσδιορίσει ότι παράγωγα των parabens μπορεί να υπάρχουν στον ανθρώπινο καρκινικό ιστό του μαστού σε συγκεντρώσεις συγκρίσιμες με αυτές

που αποδεικνύεται ότι διεγείρουν τον πολλαπλασιασμό κυττάρων καρκίνου του μαστού που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα *in vitro*.

Μια μελέτη παρακολούθησης από τους Charles και Darbre⁵⁵ εξέτασε τα διεγερτικά κατώτατα όρια που παρουσιάζουν τα parabens για την ανθρώπινη κυτταρική σειρά καρκίνου του μαστού MCF-7. Αυτά στη συνέχεια συγκρίθηκαν με συγκεντρώσεις που εντοπίστηκαν σε 160 δείγματα ανθρώπινου μαστού. Το 27% των δειγμάτων ιστού αποδείχθηκε ότι έχει τουλάχιστον 1 paraben σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από εκείνη των συγκεντρώσεων με τη χαμηλότερη παρατηρούμενη επίδραση στην κυτταρική σειρά. Το πολλαπλασιαστικό ερέθισμα βρέθηκε να αυξάνεται χρησιμοποιώντας συνδυασμούς 5 εστέρων paraben σε συγκεντρώσεις έως και το 50ο εκατοστημόριο στα δείγματα ιστού του μαστού που εξετάστηκαν και πρότειναν ότι μπορεί να υπάρχει συνδυασμός τροφικού αποτελέσματος. Συνιστάται η μέτρηση της παρουσίας βιολογικών επιδράσεων και των 5 parabens παρά μεμονωμένων εστέρων.

Παρόλο που τα καλλυντικά προϊόντα γενικά και τα προϊόντα υγιεινής που προορίζονται στις μασχάλες έχουν προταθεί ως πηγή των parabens που βρίσκονται σε καλοήθεις και κακοήθεις ιστούς του μαστού, ο Baig και οι συνεργάτες του⁵⁶ αξιολόγησαν την παρουσία 5 parabens σε 4 σειριακές τοποθεσίες στο στήθος, σε 60 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή για καρκίνο του μαστού. Ένας ή περισσότεροι εστέρες των parabens προσδιορίστηκαν ποσοτικά σε 158 από τα 160 δείγματα ιστού (99%) και βρέθηκε ότι και οι 5 εστέρες ήταν παρόντες. Τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στις περιοχές της μασχάλης (παραδοσιακά υψηλότερος ανατομικός κίνδυνος καρκίνου του μαστού από ό,τι στις άλλες περιοχές). Αυτό βρέθηκε ακόμη και σε γυναίκες που δεν είχαν χρησιμοποιήσει ποτέ αποσμητικό μασχάλης, και οι συγγραφείς εικάζουν ότι η μεταφορά paraben στον ιστό του μαστού μπορεί να συμβεί και από άλλες μη υποδόριες πηγές.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι είμαστε εκτεθειμένοι σε πολύ μεγάλο αριθμό χημικών προϊόντων άμεσα ή έμμεσα κάθε μέρα. Έχει εκτιμηθεί ότι περισσότερες από 80.000 χημικές ουσίες κατασκευάζονται ή εισάγονται στις Ηνωμένες Πολιτείες κάθε χρόνο. Ο προσδιορισμός της μεμονωμένης ουσίας ή του συνδυασμού χημικών εκθέσεων, είναι μια δύσκολη μελέτη για να σχεδιαστεί και ακόμη πιο δύσκολο να ελεγχθεί. Υπάρχουν ανησυχίες και ερωτήματα που παραμένουν σχετικά με τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα και την εφαρμογή τους στον άνθρωπο. Το πιο σημαντικό είναι η έλλειψη κλινικής επιβεβαίωσης για την τεκμηρίωση αυτών των υποθετικών ισχυρισμών. Για παράδειγμα, ο Mirick και οι συνεργάτες του^{34,37,49} δεν βρήκαν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε 813 ασθενείς σε σύγκριση με 793 μάρτυρες κατά την εξέταση των αποσμητικών (που πιθανώς περιέχουν paraben). Μετά

την έκθεση του Darbre ³⁷ το 2004, οι ρυθμιστικές αρχές εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό στη διαμάχη των parabens. Η επιτροπή SCCS της Ευρωπαϊκής Ένωσης μελέτησε τα στοιχεία σχετικά με τα parabens το 2010 ³³ και διατύπωσε ορισμένους προβληματισμούς σχετικά με τη μελέτη του Darbre ³⁷, συμπεριλαμβανομένου του γεγονότος ότι τα περισσότερα καλλυντικά μασχάλης δεν περιέχουν parabens. Κατέληξε λοιπόν στο συμπέρασμα ότι «δεν υπάρχουν ενδείξεις κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου του μαστού που προκαλείται από τη χρήση καλλυντικών μασχάλης που περιέχουν paraben». Επιπλέον στις αποφάσεις της επιτροπής SCCS, το 2006, το 2008 και το 2011, αναφέρεται ότι δεν είχαν παρουσιαστεί σημαντικά ενδιάμεσα αποδεικτικά στοιχεία για την επανεκτίμηση αυτής της γνώμης επειδή οι υποβληθείσες πληροφορίες είχαν «πάρα πολλές ελλείψεις για να θεωρηθούν επιστημονικά έγκυρες». Στην απόφαση της SCCS το 2011, επιβεβαιώθηκε ότι το MPB και το EPB δεν αποτελούν αντικείμενο ανησυχίας και ότι «η αξιολόγηση της ασφάλειας του PPB και BPB δεν μπορεί να οριστικοποιηθεί ακόμη». Παράλληλα, ο Darbre αναγκάστηκε να αποσαφηνίσει τη σημασία της παρουσίας των parabens σε ιστό από καρκίνο του μαστού και ο ίδιος καταγράφει ότι «πουθενά στο χειρόγραφο του δεν ισχυρίστηκε ότι η παρουσία των parabens προκάλεσε τον καρκίνο του μαστού, καθώς πράγματι η μέτρηση μιας ένωσης σε έναν ιστό δεν μπορεί να αποδείξει την αιτία».

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° : ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ UV (FPSE-HPLC-UV) ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΟ

5.1. Εισαγωγή

Στο πλαίσιο εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν επιστημονικές εργασίες που αναφέρονται στον προσδιορισμό των parabens στον ορό. Τα parabens έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως πρόσθετα συντηρητικών για σχεδόν 100 χρόνια λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους, μ' αποτέλεσμα ο προσδιορισμός τους σε διάφορα βιολογικά υλικά να έχει απασχολήσει πολλά ερευνητικά εργαστήρια ανά τον κόσμο.

Οι τεχνικές ανάλυσης που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κυρίως η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, με αναφορές στην υπερ.-υψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography-UHPLC) ⁵⁷ και στην αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography-GC) ⁵⁸. Η ανίχνευση των ενώσεων έχει πραγματοποιηθεί με την χρήση των παρακάτω ανιχνευτών:

- Υγρή χρωματογραφία σε σύνδεση με ανιχνευτή μαζών, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS) ^{57,59}
- Φασματομετρία μάζας ατμοσφαιρικής πίεσης με αραίωση ισοτόπων, isotope dilution–atmospheric pressure photoionization–tandem mass spectrometry (HPLC–MS/MS) ⁶⁰
- Ανιχνευτής παράταξης διόδων, photo diode array detector (PDA) ³⁶
- Ανιχνευτής μαζών–Mass Spectrometry (MS) ⁵⁸

Οι τεχνικές που έχουν εφαρμοστεί για την προκατεργασία του ανθρώπινου ορού είναι οι εξής:

- Η τεχνική της μικροεκχύλισης διασποράς υγρού-υγρού, Dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) ^{57,59}
- Η τεχνική εκχύλισης στερεάς φάσης, solid phase extraction (SPE) ⁶⁰
- Η τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) ³⁶

Κάθε μία από τις παραπάνω τεχνικές παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Η κατάλληλη τεχνική επιλέχθηκε με βάση τον επιθυμητό στόχο και τις συνθήκες της ανάλυσης.

Σύμφωνα με τα φυσικοχημικά τους χαρακτηριστικά οι επτά αναλύτες έχουν παρόμοια φυσικοχημική συμπεριφορά. Σε $pH=6.3$ που είναι το pH της κινητής φάσης, είναι στην ουδέτερη μορφή τους. Η τιμή του $\log D$ παραμένει θετική σε όλους τους αναλύτες μέχρι το $pH=7$, καθώς από αυτό το σημείο και μετά παρουσιάζει φθίνουσα πορεία. Σε εύρος $pH=0-7$ οι ενώσεις είναι λιπόφιλες και σε $pH>7$ οι ενώσεις φορτίζονται αρνητικά, καθώς αυξάνεται ο βαθμός ιοντισμού τους.

5.2. Αρχή μεθόδου

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό των parabens σε ανθρώπινο ορό περιλαμβάνει σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (UV-VIS). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η Spherisorb® ODS1 με διαστάσεις 2,0 x150,0 mm και διάμετρο σωματιδίων 3 μm , της εταιρείας Waters, σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Παρακάτω αναφέρονται αναλυτικότερα η οργανολογική διάταξη και οι συνθήκες ανάλυσης.

5.3. Εξοπλισμός-Οργανολογία

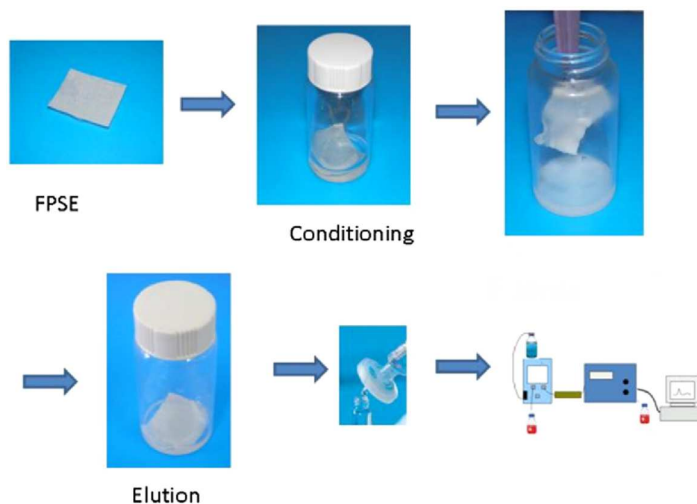
5.3.1. Σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Για τη μελέτη της χρωματογραφικής συμπεριφοράς των καθαρών αναλυτών και την επιλογή της κινητής φάσης χρησιμοποιήθηκε το σύστημα HPLC-UV. Το σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης που χρησιμοποιήθηκε, είναι της εταιρείας Waters με αντλία ισοκρατικής έκλουσης και ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) μοντέλο 486, ρυθμιζόμενο να καταγράφει στα 257 nm. Η εισαγωγή του δείγματος στο σύστημα γίνεται σε βρόχο εισαγωγής δείγματος των 10 μL . Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε είναι στήλη Spherisorb® ODS1 με διαστάσεις 2,0 x150,0 mm και διάμετρο σωματιδίων 3 μm , της εταιρείας Waters. Η κινητή φάση αποτελούταν από υδατικό διάλυμα 49 mM μυρμηκικού αμμωνίου και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 66/34 v/v με προσθήκη 0,1% πυκνού διαλύματος (99%) μυρμηκικού οξέος. Η ταχύτητα ροής στο χρωματογραφικό σύστημα ρυθμίστηκε στα 0,25 mL/min. Η απαραίτητη απαέρωση των διαλυμάτων της κινητής φάσης, πραγματοποιήθηκε με συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρείας Waters, με διήθηση υπό κενό, χρησιμοποιώντας φίλτρα νάιλον. Επίσης, τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ($\approx 25^{\circ}C$) και η συνολική διάρκεια της ανάλυσης ήταν 24 λεπτά.

5.3.2. Προκατεργασία δείγματος

Πριν την ένεση των δειγμάτων στο σύστημα είναι απαραίτητο τα δείγματα να υπόκεινται σε μια προκατεργασία απομόνωσης των αναλυτών από το βιολογικό δείγμα και στην προκειμένη περίπτωση από τον ορό. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction-FPSE). Το υφασμάτινο μέσο που επιλέχθηκε είναι η silica-gel-cw20 με διαστάσεις 1,5 x 1,5 cm και εμβαδόν 2,25 cm². Η διαδικασία προκατεργασίας για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς απαιτεί 7 υφασμάτινα μέσα, ένα για κάθε συγκέντρωση, 35 γυάλινα φιαλίδια και 7 φίλτρα σύριγγας Hydrophilic PTFE, μέγεθος πόρων 0,22 μm και περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- i. Ενεργοποίηση υφασμάτινου μέσου με 2 mL ACN-MeOH 50/50 για 5min.
- ii. Έκπλυση με 2 mL H₂O για 5 min.
- iii. Εκχύλιση του δείγματος.
- iv. Έκπλυση με ελάχιστο νερό και στέγνωμα για 5 min.
- v. Επανεκχύλιση με διαλύτη.
- vi. Διήθηση των δειγμάτων με φίλτρα σύριγγας Hydrophilic PTFE, μέγεθος πόρων 0,22 μm
- vii. Πλύση του μέσου με 2 mL ACN-MeOH και τοποθέτηση σε διηθητικό χαρτί



Σχήμα 5.2: Τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction-FPSE).⁶¹

5.3.3. Αντιδραστήρια – Διαλύτες

Για την ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- ✚ Ακετονιτρίλιο (CH_3CN , ACN), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,8% (Merck - Darmstadt, Germany)
- ✚ Μεθανόλη (CH_3OH , MeOH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,8% (Merck - Darmstadt, Germany)
- ✚ Νερό (H_2O), απεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή Synergy UV Millipore, HPLC βαθμού καθαρότητας.
- ✚ Τριφθοροξικό οξύ (CF_3COOH , TFA), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Merck - Darmstadt, Germany)
- ✚ Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Merck - Darmstadt, Germany)
- ✚ Μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH_4 , AMF) αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Acros Organics - New Jersey, USA).

5.3.4. Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

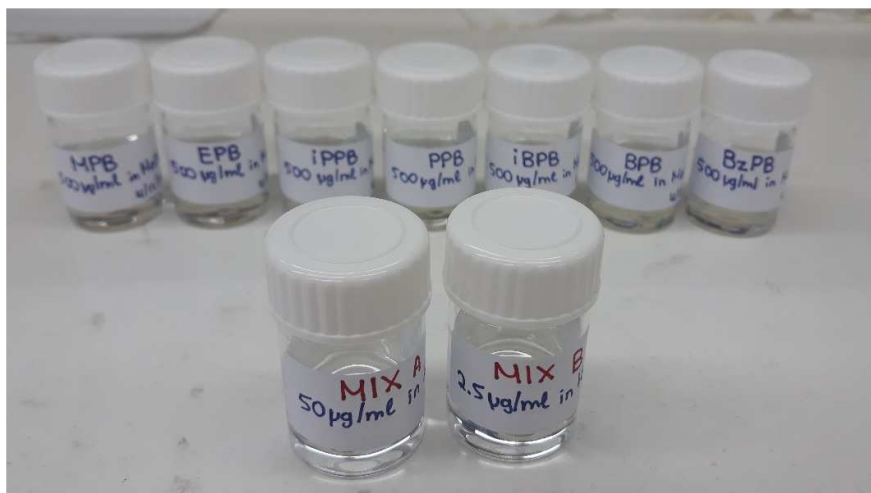
5.3.4.1. Διαλύματα παρακαταθήκης

Για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων παρακαταθήκης για τους 7 αναλύτες (MePB, EPB, PPB, iPPB, BPB, iBPB, BzPB) ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg στερεάς ουσίας και στη συνέχεια, το στερεό διαλύεται σε μεθανόλη, και τοποθετείται για περαιτέρω διάλυση σε λουτρό υπερήχων και τέλος αραιώνεται με μεθανόλη σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL έως τη χαραγή. Έτσι προκύπτουν 7 πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης για κάθε αναλύτη σε συγκέντρωση 500 $\mu\text{g/mL}$.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν δύο μικτά διαλύματα παρακαταθήκης.

- **Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης A:** Λαμβάνεται 1mL από κάθε ένα από τα 7 διαλύματα παρακαταθήκης, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και ο όγκος αραιώνεται μέχρι την χαραγή με νερό. Έτσι, παρασκευάζεται μικτό διάλυμα παρακαταθήκης με συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/mL}$.
- **Μικτό διάλυμα παρακαταθήκης B:** Λαμβάνεται 0.5mL από το μικτό διάλυμα παρακαταθήκης, μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10mL και ο όγκος αραιώνεται μέχρι

την χαραγή με νερό. Έτσι, παρασκευάζεται μικτό διάλυμα παρακαταθήκης με συγκέντρωση 2,5 $\mu\text{g/mL}$.



Σχήμα 5.3: Διαλύματα παρακαταθήκης που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο.

5.3.4.2. Διαλύματα εργασίας

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα διαλύματα παρακαταθήκης και αραιώνοντας με νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα εργασίας, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 5.1), που περιέχουν και τους 7 αναλύτες σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5.1: Πρότυπα διαλύματα εργασίας.

Όνομα	$C_{\text{μικτού}}$ διαλύματος $\mu\text{g/mL}$	Ποσότητα μL	Ποσότητα μg	Τελικός όγκος mL	$C_{\text{τελ}}$ $\mu\text{g/mL}$	$C_{\text{τελ}}$ ng/mL
Μικτό Β	2,5	200	0,5	10	0,05	50
Μικτό Β	2,5	400	1	10	0,1	100
Μικτό Β	2,5	600	1,5	10	0,15	150
Μικτό Β	2,5	1000	2,5	10	0,25	250
Μικτό Α	50	100	5	10	0,5	500

Μικτό Α	50	200	10	10	1	1000
Μικτό Α	50	500	25	10	2,5	2500

Έτσι λοιπόν παρασκευάστηκαν 7 διαλύματα εργασίας σε εύρος συγκεντρώσεων 50-2500 ng/mL.

5.3.4.3.Εμβολιασμένα δείγματα ορού.

Για την παρασκευή των εμβολιασμένων δειγμάτων ορού, 50μL ανθρώπινου ορού εμβολιάζονται με 10μL από τα διαλύματα εργασίας με την χρήση μικροπιπέτας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να έχουμε εμβολιασμό ίδιας ποσότητας βιολογικού υλικού με διάλυμα εργασίας και συνεπώς για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης να υπάρχει ίδιο ποσοστό διαλύτη. Για την καμπύλη βαθμονόμησης τα βιολογικά δείγματα παρασκευάζονται αυθημερόν, και το εύρος εργασίας είναι από 10 έως 500 ng/mL συγκέντρωση στον ορό, όπως φαίνεται και στον πίνακα 5.2. Παρασκευάστηκαν 7 εμβολιασμένα με ορό διαλύματα σε εύρος συγκεντρώσεων 10-500 ng/mL.

Πίνακας 5.2: Εμβολιασμένα δείγματα ορού.

C _{τελ} ng/mL	Όγκος μL	Ποσότητα αναλυτών μg	Όγκος ορού	C στον ορό ng/mL
50	10	0,5	50	10
100	10	1	50	20
150	10	1,5	50	30
250	10	2,5	50	50
500	10	5	50	100
1000	10	10	50	200
2500	10	25	50	500

5.4. Βελτιστοποίηση χρωματογραφίας

Στην ανάπτυξη μιας αναλυτικής μεθόδου πολύ σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η βελτιστοποίηση της. Μια αναλυτική μέθοδος επηρεάζεται από πολλές αριθμήσιμες παραμέτρους. Έτσι μέσω της βελτιστοποίησης θα βρεθούν οι τιμές των πειραματικών παραμέτρων της μεθόδου που δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή τη βέλτιστη απόκριση (response) και θα χρησιμοποιηθούν, ώστε να επιφέρουν το βέλτιστο και αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των αναλυτών.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν οι εξής παράγοντες προς βελτιστοποίηση:

- ☒ Επιλογή στατικής φάσης
- ☒ Η επίδραση της κινητής φάσης, εξετάζοντας το είδος και το ποσοστό οργανικού τροποποιητή (Μεθανόλη & Ακετονιτρίλιο)
- ☒ Συγκέντρωση άλατος (μυρμηκικού αμμωνίου) στην κινητή φάση
- ☒ Το ποσοστό και το είδος των πρόσθετων στην κινητή φάση (TFA ή HCOOH)
- ☒ Μελέτη ανάκτησης (Recovery)
- ☒ Μελέτη καταλληλότερης ποσότητας βιολογικού υλικού
- ☒ Μελέτη σταδίων προκατεργασίας βιολογικού δείγματος

5.4.1. Επιλογή στατικής φάσης

Όπως ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η χρωματογραφική στήλη πυκτής πυριτίας Spherisorb® ODS1 με διαστάσεις 2x150 mm και διάμετρο σωματιδίων 3μm, της εταιρείας Waters, σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης.

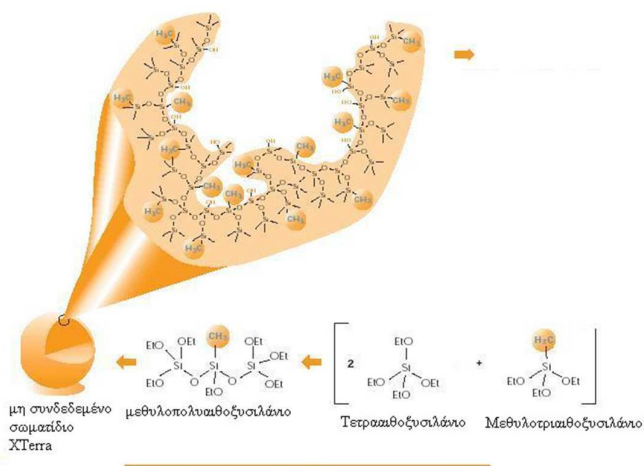
Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης υψηλής πίεσης: HPLC κανονικής φάσης και HPLC αντίστροφης φάσης. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε HPLC αντίστροφης φάσης (reversed phase HPLC ή RPHPLC). Εδώ ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες οργανικές ομάδες, όπως ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η

κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η έκλουση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης αυξάνοντας το ποσοστό οργανικού διαλύτη. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ελαττώνει την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης: είναι προφανές ότι όσο πιο άπολο είναι ένα διαχωριζόμενο μόριο, τόσο περισσότερο χρόνο θα αλληλοεπιδράσει με την άπολη στατική φάση και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, που θα απαιτείται για να επιτευχθεί η αποδέσμευσή του. Ως αποτέλεσμα επιτυγχάνεται η εκλεκτική έκλουση των άπολων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη. Όπως αναφέρθηκε, στη χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης, η επιφάνεια του προσροφητικού μέσου έχει τροποποιηθεί με την πρόσδεση μακρών αλυσίδων υδρόφοβων μορίων. Τέτοια μόρια είναι υδρογονάνθρακες, που τυπικά αποτελούνται από 4 ή 8 ή 18 άτομα άνθρακα, μετατρέποντας την στατική φάση σε άπολη. Οι στήλες με τα παραπάνω προσροφητικά μέσα ονομάζονται C4 ή C8 ή C18, αντίστοιχα. Μη πολικά μόρια στο διαχωριζόμενο δείγμα προσροφώνται ισχυρά στις αλυσίδες υδρογονάνθρακα, ενώ τα πολικά μόρια κινούνται ταχύτερα διαμέσου της στήλης και εκκλύονται νωρίτερα. Η χρωματογραφία HPLC αντίστροφης φάσης είναι η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη μορφή της HPLC και γενικότερα η περισσότερο κοινώς χρησιμοποιούμενη μέθοδος διαχωρισμού ουσιών για αναλυτικούς σκοπούς.

Ωστόσο, για να καταλήξουμε στην συγκεκριμένη στατική φάση έγιναν αρχικά κάποια πειράματα μελέτης πάνω σε πρότυπες ουσίες, χωρίς την παρουσία βιολογικού υλικού. Σκοπός αυτής της μελέτης, ήταν να αποκτηθεί μια εικόνα για τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών και να γίνει επιλογή της χρωματογραφικής στήλης που θα χρησιμοποιηθεί παρουσία του βιολογικού υλικού. Η επιλογή της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης αποτελεί το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη μεθόδου. Ο βασικός παράγοντας που εξετάζεται στην προκειμένη περίπτωση, είναι η ικανοποιητική συγκράτηση των αναλυτών στη στατική φάση, που εκφράζεται με το χρόνο συγκράτησης (t_R), και τον παράγοντα χωρητικότητας (k' και $\log k'$).

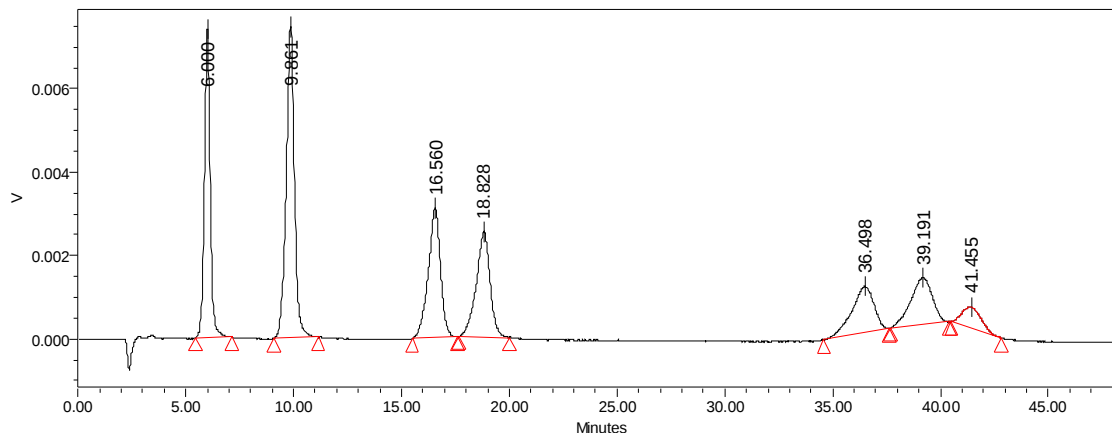
Έτσι λοιπόν, εξετάστηκαν 3 χρωματογραφικές στήλες: η X-Terra MS C-18 με διαστάσεις 3.0x150 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm , η Hypersil Gold-C18 με διαστάσεις 2.1x150 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm και η Spherisorb® ODS1 με διαστάσεις 2x150 mm και διάμετρο σωματιδίων 3 μm .

Αρχικά, εξετάστηκε η αναλυτική στήλη X-Terra MS C-18 με διαστάσεις 3.0x150mm και διάμετρο σωματιδίων 5μm. Οι στήλες X-Terra της εταιρείας Waters κατασκευάζονται με την Τεχνολογία Υβριδικών Σωματιδίων (Hybrid Particle Technology) συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα της síλικα (υψηλή αποδοτικότητα, υψηλή μηχανική αντοχή) και των πολυμερικών πληρωτικών υλικών (χρήση σε μεγάλο εύρος τιμών pH), ενώ ταυτόχρονα περιορίζει τα μειονεκτήματα και των δύο αυτών υλικών. Το εύρος τιμών του pH αποδοτικής λειτουργίας των στηλών X-Terra είναι 1-12, δηλαδή περίπου διπλάσιο του αντίστοιχου των στηλών síλικα (pH 2-8). Έτσι, η ανάπτυξη μιας μεθόδου είναι δύο φορές γρηγορότερη και δύο φορές πιο εύκολη, εφόσον η μορφή των κορυφών είναι βελτιωμένη, η συγκράτηση είναι αυξημένη και οι διαχωρισμοί είναι καλύτεροι. Οι στήλες X-Terra μπορεί να είναι συνδεδεμένες ή μη συνδεδεμένες στατικές φάσεις. Οι πλέον συνηθισμένες στήλες XTerra είναι οι C8 και C18.



Σχήμα 5.4: Απεικόνιση στατικής φάσης X-Terra MS.⁴

Ωστόσο, η συγκεκριμένη στήλη δεν επιλέχθηκε λόγω του μη ικανοποιητικού διαχωρισμού των 7 αναλυτών, αλλά και λόγω του αυξημένου χρωματογραφικού χρόνου, 41,4 λεπτά, όπως φαίνεται και στο σχήμα 5.5.



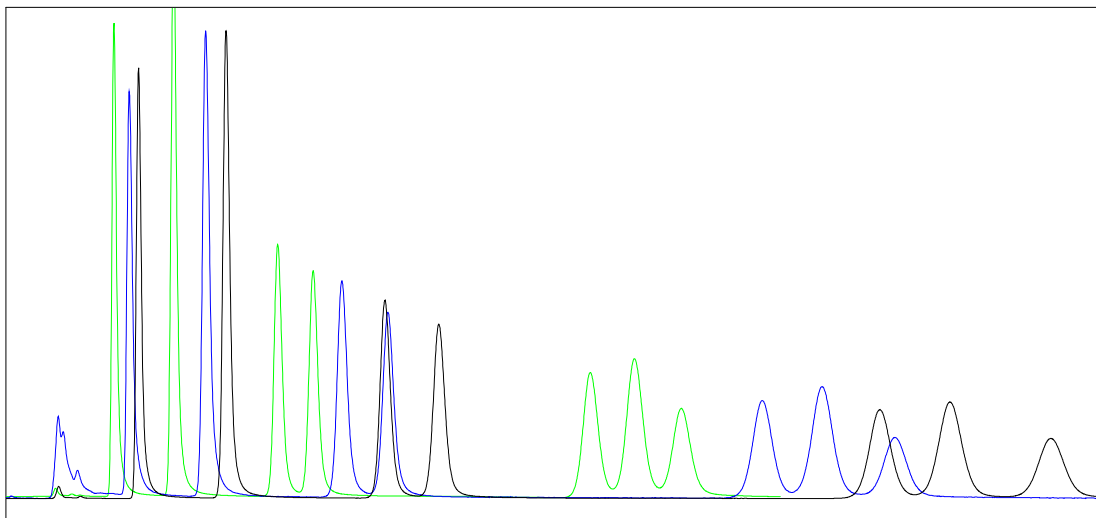
Σχήμα 5.5: Χρωματογραφικός διαχωρισμός των parabens με την χρήση στατικής φάσης X-Terra MS C-18 και κινητής φάσης □□ F 27 m□/Me□□ 57/43 v/v, pH=6,3.

Η δεύτερη στήλη που μελετήθηκε ήταν η Hypersil Gold-C18 με διαστάσεις 2.1x150 mm και διάμετρο σωματιδίων 5 μm. Η στατική φάση των στηλών Hypersil Gold έχει ως βάση υψηλής καθαρότητας διοξείδιο του πυριτίου και παράγεται με μία καινοτόμα μέθοδο παραγωγοποίησης και επικάλυψης χρησιμοποιώντας τη χημεία της αλκυλικής αλυσίδας. Τα πλεονεκτήματα της στήλης αυτής είναι τα εξής:



- Προσφέρει καλύτερο σχήμα στις κορυφές διατηρώντας παράλληλα την C-18 εκλεκτικότητα
- Άριστη ανάλυση, εκλεκτικότητα και ακρίβεια
- Αξιοπιστία στην ακρίβεια και ποιότητα των αναλυτικών δεδομένων

Πραγματοποιήθηκε μελέτη ως προς την εύρεση των βέλτιστων χρωματογραφικών, διατηρώντας σταθερά τα mmol του ρυθμιστικού που χρησιμοποιήθηκε στην κινητή φάση. Έτσι λοιπόν, μελετήθηκαν οι εξής κινητές φάσεις: AMF 34 mM/MeOH 58/42 v/v, AMF 35 mM/MeOH 57/43 v/v και AMF 36 mM/MeOH 56/44 v/v. Η σύγκριση των τριών αυτών κινητών φάσεων φαίνεται στο σχήμα 5.6.



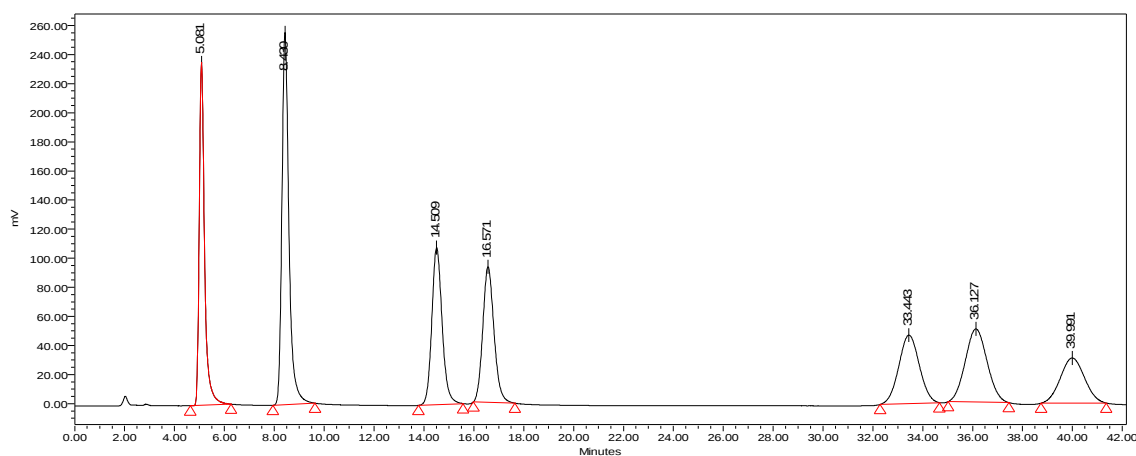
Σχήμα 5.6: Χρωματογραφήματα που προκύπτουν από την ανάλυση μεικτού πρότυπου διαλύματος των επτά parabens συγκέντρωσης 500 ng mL^{-1} .

MAYPO: AMF 34mM/MeOH 58/42 v/v,

ΜΠΛΕ: AMF 35mM/MeOH 57/43 v/v,

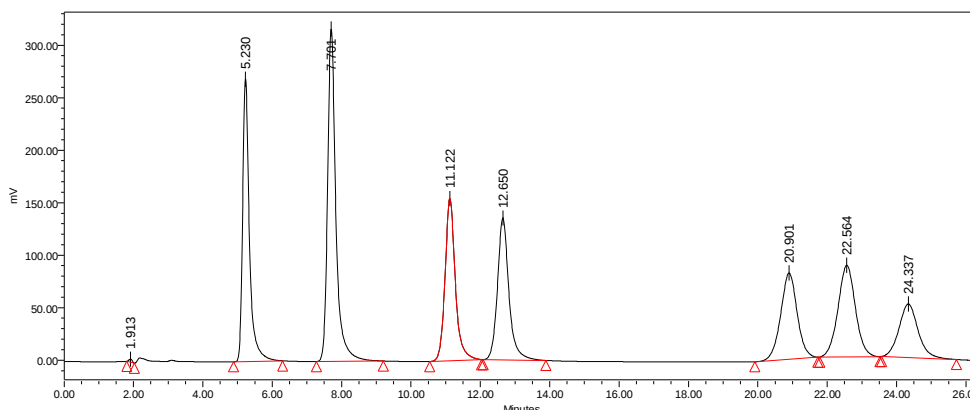
ΠΡΑΣΙΝΟ: AMF 36mM/MeOH 56/44 v/v

Παρατηρείται ότι με την χρήση της κινητής φάσης AMF 36mM/MeOH 56/44 v/v, η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιείται σε πιο σύντομο χρόνο, ωστόσο με την κινητή φάση AMF 34mM/MeOH 58/42 v/v, πραγματοποιείται περισσότερο ικανοποιητικός διαχωρισμός. Τα βέλτιστα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό με την χρήση αυτής της στήλης φαίνονται στο σχήμα 5.7. Παρατηρήθηκε ικανοποιητικός διαχωρισμός αλλά αυξημένος χρωματογραφικός χρόνος, 40 λεπτά.



Σχήμα 5.7: Χρωματογραφικός διαχωρισμός των parabens με τη χρήση στατικής φάσης Hypersil Gold-C18 και κινητής φάσης AMF 34 mM/MeOH 58/42 v/v, pH=.6,3.

Η τελευταία στήλη που εξετάστηκε και τελικά επιλέχθηκε για τον προσδιορισμό των 7 αναλυτών ήταν η χρωματογραφική στήλη πυκτής πυριτίας Spherisorb® ODS1 με διαστάσεις 2x150 mm και διάμετρο σωματιδίων 3μm, της εταιρείας Waters, σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Θέλοντας να μειώσουμε τον χρωματογραφικό χρόνο της ανάλυσης, αυξήσαμε το ποσοστό της μεθανόλης στην κινητή φάση. Άρα διατηρώντας σταθερά τα mmol του ρυθμιστικού της κινητής φάσης, AMF, η νέα κινητή φάση που προκύπτει είναι η εξής, AMF 37mM/MeOH 53/47 v/v. Πράγματι ο διαχωρισμός που πραγματοποιήθηκε ήταν αρκετά ικανοποιητικός και σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, 24 λεπτά περίπου, όπως φαίνεται και στο αντίστοιχο χρωματογράφημα του σχήματος 5.8.



Σχήμα 5.8: Χρωματογραφικός διαχωρισμός των parabens με την χρήση στήλης πυκτής πυριτίας Spherisorb® ODS1 και κινητής φάσης AMF 37mM/MeOH 53/47 v/v, pH=.6,3.

5.4.2. Επιλογή κινητής φάσης

5.4.2.1. Επιλογή Οργανικού τροποποιητή.

Αφού επιλέχθηκε η βέλτιστη στατική φάση, το επόμενο βήμα είναι ο καθορισμός των βέλτιστων συνθηκών στην κινητή φάση. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων μεταβαλλόταν ένας παράγοντας την φορά, ενώ οι υπόλοιποι παράγοντες παρέμεναν σταθεροί, προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Οι οργανικοί τροποποιητές που μελετήθηκαν ήταν το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Το ACN πλεονεκτεί έναντι της MeOH στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης σε πολλά σημεία. Αρχικά, σε αναλυτικού βαθμού καθαρότητας διαλύτες στους οποίους έχει γίνει αφαίρεση των ακαθαρσιών που απορροφούν

στο υπερίωδες, το ακετονιτρίλιο υπερέχει της μεθανόλης στο ότι έχει χαμηλότερη απορροφητικότητα, πράγμα που οδηγεί σε χαμηλότερο θόρυβο υποβάθρου. Επίσης, ένα άλλο στοιχείο στο οποίο υπερέχει το ακετονιτρίλιο είναι ότι δημιουργεί χαμηλότερη πίεση κατά το χειρισμό των αναλυτικών οργάνων, λόγω του χαμηλότερου ιξώδους που το χαρακτηρίζει σε σχέση με τη μεθανόλη. Ακόμα, το ακετονιτρίλιο έχει αυξημένη εκλουστική ισχύ με αποτέλεσμα να μειώνεται κατά πολύ ο χρόνος ανάλυσης. Συγκρίνοντας, δηλαδή κινητή φάση που αποτελείται από ακετονιτρίλιο αναμεμειγμένο με νερό σε σχέση με ίδιο ποσοστό μεθανόλης αναμεμειγμένης με νερό, παρατηρούνται ταχύτεροι χρόνοι έκλουσης στην πρώτη περίπτωση.

Παρόλα τα πλεονεκτήματα του ακετονιτρίλιου, ένα στοιχείο στο οποίο υπερέχει η μεθανόλη είναι στη διαδικασία της απαέρωσης. Κατά την ανάμειξη μεθανόλης με νερό για την παρασκευή της κινητής φάσης, απελευθερώνεται θερμότητα, πράγμα που διευκολύνει την απομάκρυνση εγκλωβισμένων φυσαλίδων αέρα. Αντίθετα, κατά την ανάμειξη ακετονιτρίλιου με νερό, παρατηρείται πτώση της θερμοκρασίας του μείγματος, πράγμα που οδηγεί σε εγκλωβισμό νέων φυσαλίδων κατά τη μετάβαση του μείγματος σε θερμοκρασία δωματίου. Αυτό μπορεί να δημιουργήσει πειραματικό σφάλμα, ειδικά όταν πρόκειται για ισοκρατική έκλουση. Τέλος, το σημαντικότερο πλεονέκτημα της μεθανόλης είναι το μειωμένο της κόστος σε σχέση με το ακετονιτρίλιο, καθώς και το γεγονός ότι τα τελευταία χρόνια παρατηρείται δυσκολία στην εύρεσή του ACN στην αγορά, λόγω δυσκολιών που σχετίζονται με την παραγωγή του.

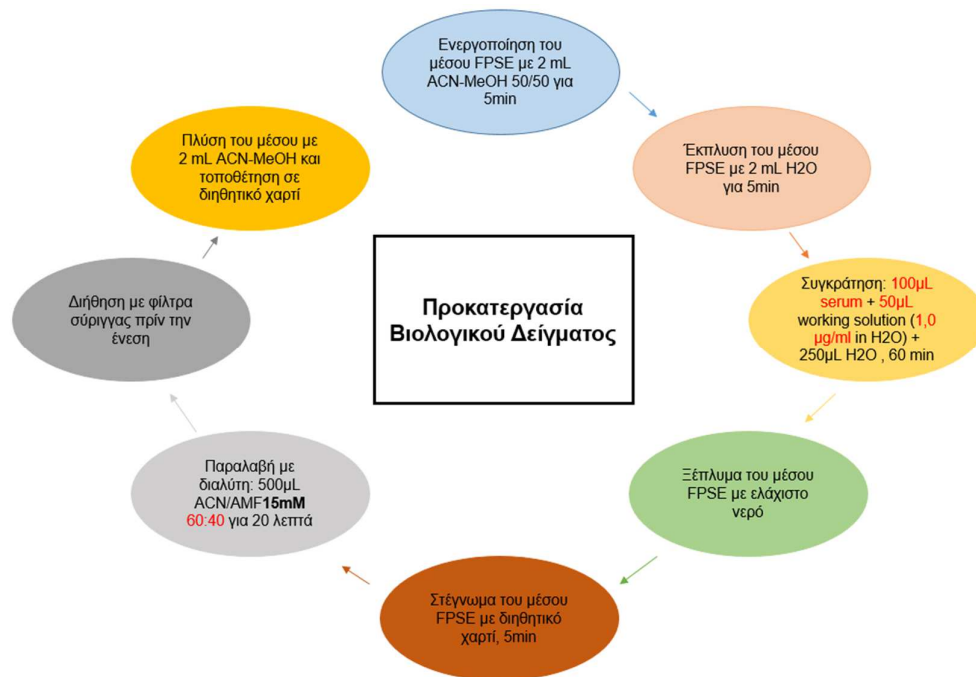
Πειραματικά δεν παρουσιάστηκε μεγάλη διαφορά μεταξύ των δύο αυτών οργανικών τροποποιητών. Επομένως λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων προτιμήθηκε το ακετονιτρίλιο.

5.4.2.2. Συγκέντρωση άλατος (μυρμηκικού αμμωνίου) στην κινητή φάση

Στη συνέχεια μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης στο σήμα, στην συγκράτηση και στη μορφή των χρωματογραφικών κορυφών των αναλυτών. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε ήταν της μεταβολής ενός παράγοντα κάθε φορά, με διατήρηση σταθερών των υπόλοιπων παραγόντων (μελέτη "One Factor at a Time"- OFAT).

Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οχτώ κινητές φάσεις, αλλάζοντας μόνο την συγκέντρωση του άλατος και διατηρώντας σταθερούς όλους τους υπόλοιπους παράγοντες (δηλαδή αναλογία ρυθμιστικού άλατος / ακετονιτρίλιου και ποσότητα μυρμηκικού οξέος).

Επίσης η προκατεργασία του βιολογικού δείγματος έγινε με τον ίδιο τρόπο σε όλη τη μελέτη, πιο συγκεκριμένα, στο σχήμα 5.9 φαίνεται η διαδικασία προκατεργασίας του βιολογικού δείγματος, του ορού, που πραγματοποιήθηκε κατά τη διάρκεια της μελέτης της κινητής φάσης.

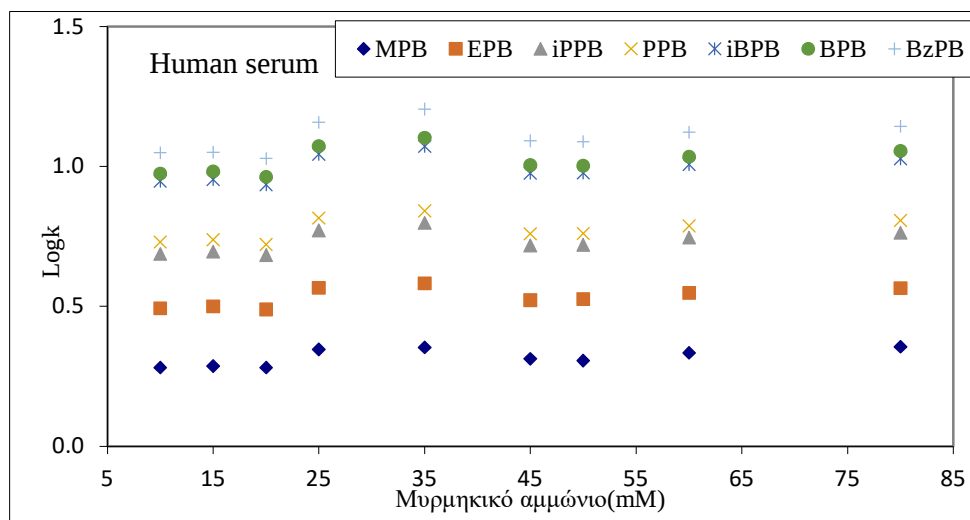


Σχήμα 5.9: Διαδικασία προκατεργασίας του βιολογικού δείγματος-ορού.

Οι κινητές φάσεις που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

1. A □ F (10m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
2. A □ F (15m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
3. A □ F (20m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
4. A □ F (25m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
5. A □ F (35m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
6. A □ F (50m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
7. A □ F (60m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□
8. A □ F (80m□)/□C□ , 65/35 + 0.1% □C□□□

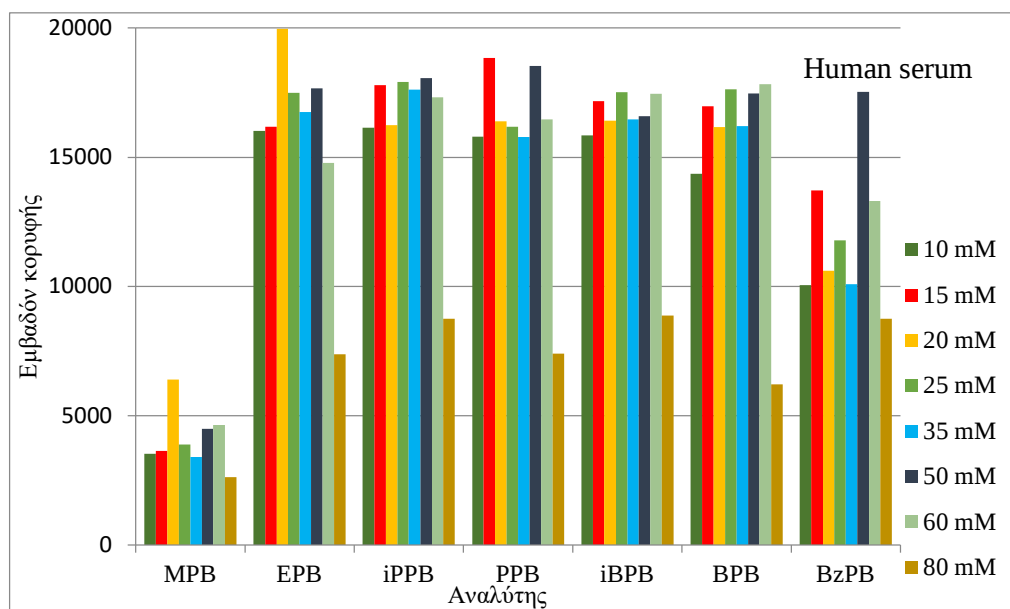
Στο σχήμα 5.10 απεικονίζεται το διάγραμμα σχέσης logk και συγκέντρωσης μυρμηκικού αμμωνίου για κάθε αναλύτη, καθώς παρουσιάζονται και αναλυτικά τα σήματα του κάθε αναλύτη για κάθε περίπτωση.



Σχήμα 5.10: Διάγραμμα σχέσης logk και συγκέντρωσης μυρμηκικού αμμωνίου.

Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος αυξάνεται λίγο η κατακράτηση των αναλυτών, ο αριθμός των θεωρητικών πλακών και βελτιώνεται η συμμετρία.

Στο σχήμα 5.11 παρουσιάζεται το διάγραμμα καθώς και οι αναλυτικές τιμές για την σχέση εμβαδού κορυφής και κάθε αναλύτη για τις διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού άλατος.

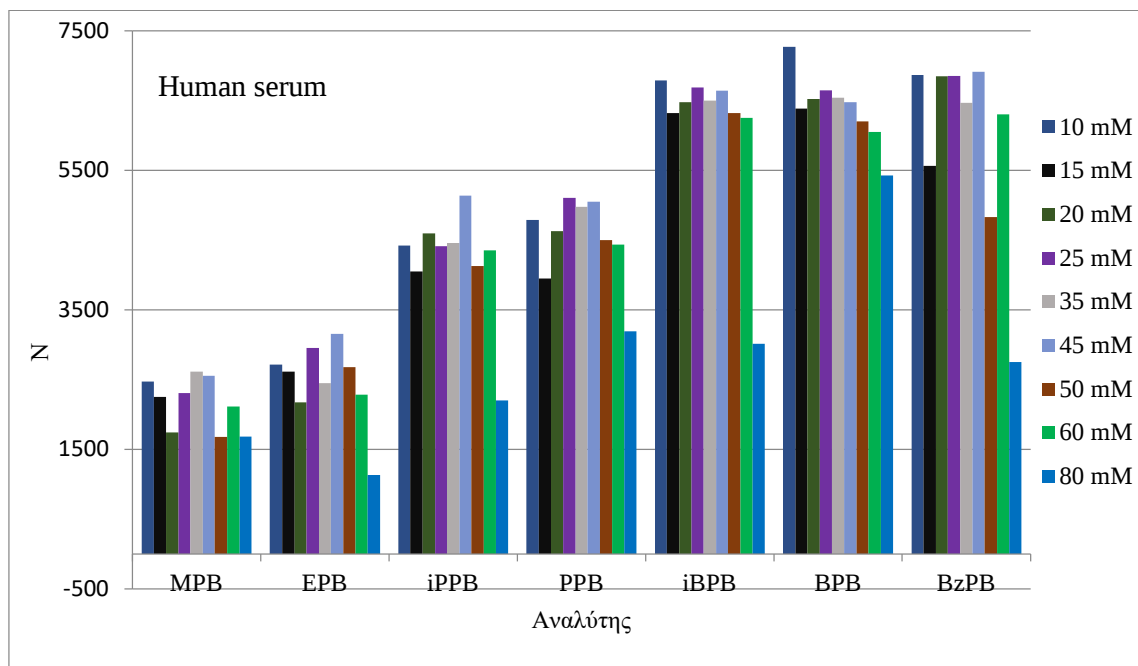


Σχήμα 5.11: Διάγραμμα σχέσης εμβαδού κορυφής και κάθε αναλύτη για τις διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού άλατος.

Το εμβαδόν κορυφής κάθε αναλύτη αντιπροσωπεύει το αντίστοιχο σήμα του, όσο μεγαλύτερο είναι το εμβαδόν κορυφής ενός αναλύτη τόσο μεγαλύτερη είναι η ανάκτηση του. Με συγκέντρωση ρυθμιστικού 10 mM παρατηρήθηκε ότι το σήμα των αναλυτών κυμαινόταν από 3.532 μέχρι 10.055. Με συγκέντρωση ρυθμιστικού 15 mM, παρατηρήθηκε ότι το σήμα των αναλυτών αυξήθηκε σε σχέση με πριν, με τις τιμές να κυμαίνονται από 3.644 μέχρι 13.722. Αξίζει να σημειωθεί ότι με συγκέντρωση ρυθμιστικού 15 mM παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ανάκτηση του MPB και του EPB. Αυξάνοντας την συγκέντρωση του ρυθμιστικού στα 20 mM παρατηρήθηκε ότι το σήμα των MPB και EPB αυξήθηκε, ενώ των υπόλοιπων πέντε μειώθηκε. Στα 25 mM μειώθηκε το σήμα όλων των αναλυτών εκτός από τα iPPB, iBPB, BPB και BzPB τα οποία αυξήθηκαν. Στα 35 mM μειώθηκε το σήμα όλων των αναλυτών, ενώ στα 50 mM αυξήθηκε το σήμα όλων των αναλυτών. Στα 60 mM παρατηρήθηκε μια πτώση στα σήματα, με εξαίρεση τα iBPB, BPB όπου υπήρχε μια ελάχιστη αύξηση. Τέλος, στα 80 mM παρατηρήθηκε μείωση του σήματος σε όλους τους αναλύτες, όπου και είχαμε την μικρότερη ανάκτηση.

Έτσι προκύπτει, ότι η βέλτιστη συγκέντρωση είναι τα 50 mM καθώς με την κινητή φάση AMF (50mM)/ACN , 65/35 + 0.1% HCOOH, παρουσιάστηκαν τα μεγαλύτερα εμβαδά κορυφών.

Στο σχήμα 5.12 παρουσιάζεται η σχέση θεωρητικών πλακών και κάθε αναλύτη για τις διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού άλατος.



Σχήμα 5.12: Διάγραμμα σχέσης θεωρητικών πλακών και κάθε αναλύτη για τις διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού άλατος.

Γενικά, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών τόσο πιο αποδοτική είναι η στήλη και τόσο πιο έντονες είναι οι χρωματογραφικές κορυφές.

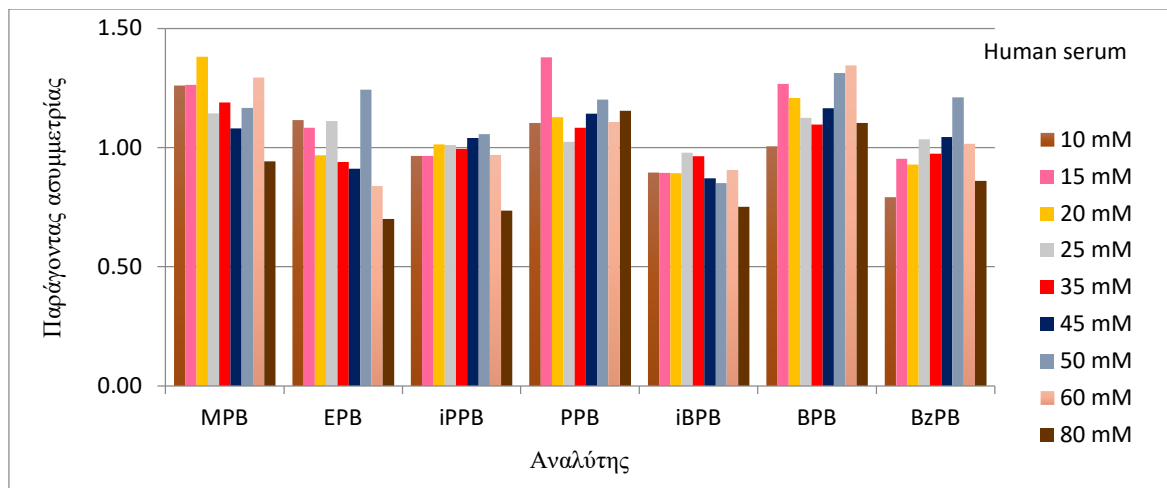
Με συγκέντρωση ρυθμιστικού 10 mM ο αριθμός των θεωρητικών πλακών κυμαινόταν από 2.476 μέχρι 6.869. Αυξάνοντας την συγκέντρωση στα 15 mM παρατηρήθηκε μείωση των θεωρητικών πλακών για όλους τους αναλύτες. Αυξάνοντας την συγκέντρωση στα 20 mM παρατηρήθηκε αύξηση του N για όλους τους αναλύτες, εκτός από τα MPB και EPB, όπου είχαμε μείωση. Στα 25 mM και στα 35 mM παρατηρήθηκε παρόμοια φθίνουσα συμπεριφορά. Στα 45 mM αυξάνεται κατά λίγο ο αριθμός N ($N_{\max}=6.913$) και στη συνέχεια στα 50 mM μειώνεται φτάνοντας τον αριθμό $N_{\min}=1.676$. Στα 60mM αυξάνεται ο αριθμός N για τα MPB, iBPB και BzPB και μειώνεται για τους υπόλοιπους αναλύτες. Τέλος στα 80 mM μειώνεται ο αριθμός των θεωρητικών πλακών σε όλους τους αναλύτες φτάνοντας τον αριθμό $N_{\min}=1.684$ και $N_{\max}=5.429$, αποτελώντας έτσι την συγκέντρωση που παρέχει τις χαμηλότερες τιμές του N συγκριτικά με τις άλλες συγκεντρώσεις.

Εξετάζοντας μεμονωμένα τους αναλύτες ο μέγιστος αριθμός θεωρητικών πλακών $N_{\max}$ στο MPB, επιτεύχθηκε στα 35 mM και αμέσως μετά με μικρή διαφορά στα 45 mM. Στα EPB, iPPB

και BzPB είχαμε $N_{\max}$ στα 45 mM. Στο PPB είχαμε $N_{\max}$ στα 25 mM και αμέσως μετά με μικρή διαφορά στα 45 mM και τέλος στα iBPB και BPB είχαμε $N_{\max}$ στα 10 mM.

Για να γίνει ο έλεγχος καταλληλότητας του συστήματος υπολογίζεται ο παράγοντας συμμετρίας. Η ιδανική τιμή είναι 1 και τα ανεκτά όρια είναι 0,8-1,5.

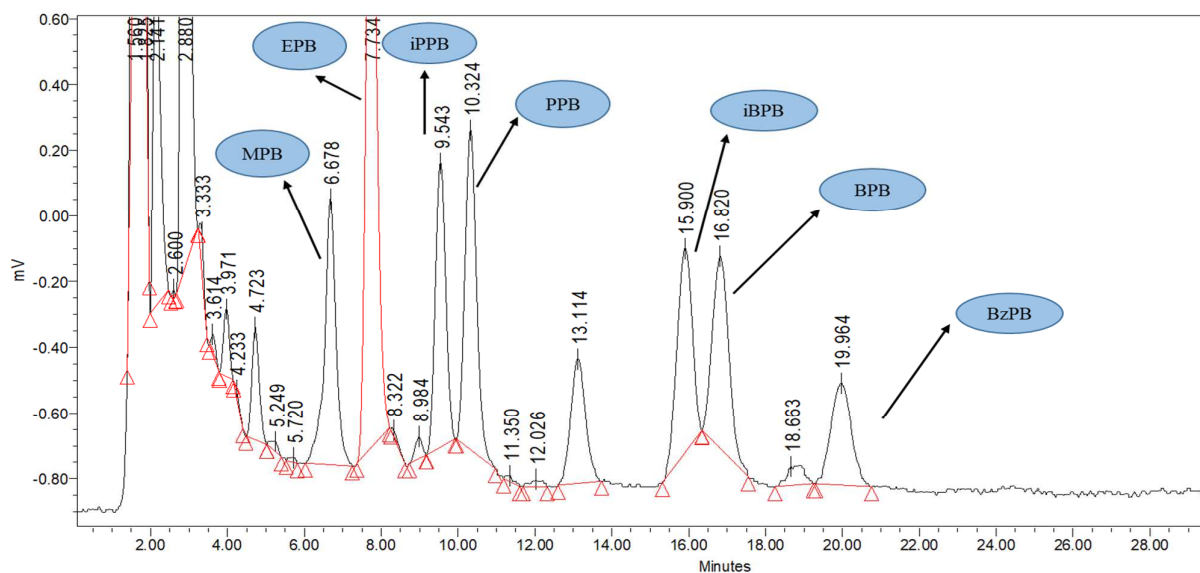
Στο σχήμα 5.13 παρουσιάζεται η σχέση του παράγοντα συμμετρίας και κάθε αναλύτη για τις διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού άλατος.



Σχήμα 5.13: Διάγραμμα σχέσης του παράγοντα συμμετρίας και κάθε αναλύτη για τις διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού άλατος.

Όταν η συγκέντρωση του ρυθμιστικού άλατος είναι 10mM οι τιμές του παράγοντα συμμετρίας κυμαίνονται από 0,79-1,26. Στα 15mM αυξάνεται η μικρότερη τιμή και το εύρος είναι 0,89-1,38. Στα 20mM είναι 0,89-1,38, στα 25mM είναι 0,98-1,14, στα 35mM είναι 0,94-1,19, στα 45mM είναι 0,87-1,17, στα 50mM είναι 0,85-1,31, στα 60mM είναι 0,84-1,34 και στα 80mM είναι 0,70-1,14.

Από την παραπάνω μελέτη διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση ρυθμιστικού άλατος για την κινητή φάση είναι 50mM. Στο σχήμα 5.14 παρουσιάζεται ενδεικτικά ο τελικός χρωματογραφικός διαχωρισμός των 7 αναλυτών χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση AMF (50 mM) /ACN 65/35 v/v + 0.1% HCOOH.



Σχήμα 5.14: Χρωματογραφικός διαχωρισμός των 7 αναλυτών χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση AMF (50 m□) /ACN 65/35 v/v + 0.1% □C□□□.

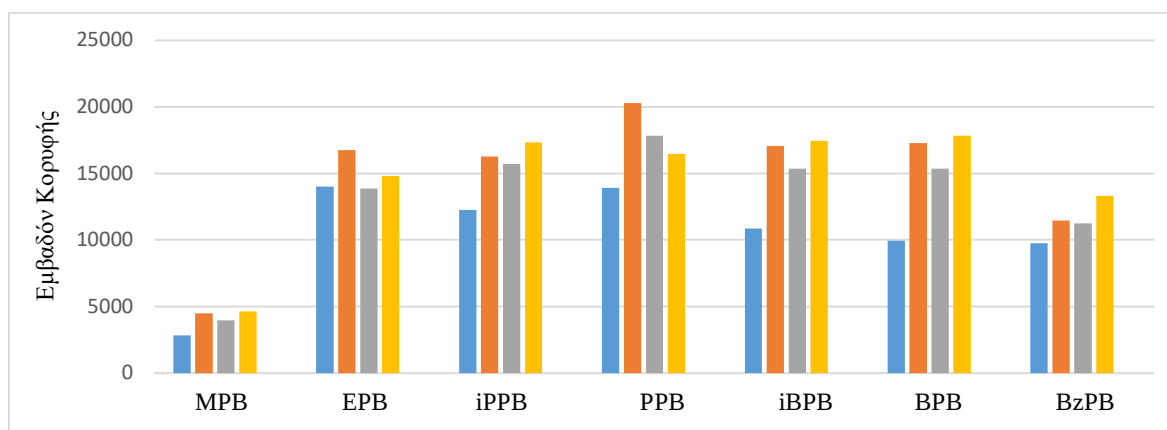
Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός είναι αρκετά ικανοποιητικός, επιτεύχθηκαν οξείες και συμμετρικές κορυφές και πραγματοποιείται σε σύντομο χρονικό διάστημα, εντός 20 λεπτών, κάτι το οποίο είναι θετικό στην χρωματογραφία.

5.4.2.3. Ποσοστό οργανικού τροποποιητή.

Το επόμενο βήμα, είναι να βρεθεί η βέλτιστη ποσότητα του οργανικού τροποποιητή-ACN στην κινητή φάση. Έτσι λοιπόν διατηρώντας σταθερά τα mmoles του AMF, δοκιμάστηκαν οι εξής αναλογίες στην κινητή φάση:

- ✓ □□ F 60 m□ /□C□ 65/35 v/v +0.1% □C□□□
- ✓ □□ F 50 m□ /□C□ 65/35 v/v +0.1% □C□□□
- ✓ □□ F 49 m□ /□C□ 66/34 v/v +0.1% □C□□□
- ✓ □□ F 59 m□ /□C□ 66/34 v/v +0.1% □C□□□

Στο σχήμα 5.15 παρουσιάζεται η σχέση του εμβαδού κορυφής κάθε αναλύτη για κάθε ποσοστό οργανικού τροποποιητή που μελετήθηκε.



AMF (59 mM)/ACN 66/34 v/v + 0.1% HCOOH
 AMF (50 mM)/ACN 65/35 v/v + 0.1% HCOOH
 AMF (49 mM)/ACN 66/34 v/v + 0.1% HCOOH
 AMF (60 mM)/ACN 65/35 v/v + 0.1% HCOOH

Σχήμα 5.15: Διάγραμμα σχέσης εμβαδού κορυφής κάθε αναλύτη για κάθε ποσοστό οργανικού τροποποιητή που μελετήθηκε.

Μελετώντας κάθε αναλύτη ξεχωριστά, διαπιστώνεται ότι η μεγαλύτερη ανάκτηση όλων των parabens πραγματοποιείται με τη συγκέντρωση του άλατος στα 50 mM και 60 mM, όπου και έχουμε τα υψηλότερα εμβαδά κορυφών (μεγαλύτερα σήματα), εκτός του PPB όπου τα μεγαλύτερα σήματα παρουσιάζονται στα 50 mM και 49 mM.

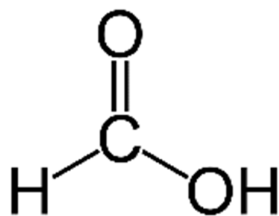
Επομένως, παρατηρείται ότι στην πλειονότητα τα μεγαλύτερα εμβαδά κορυφών λαμβάνονται με τις συγκεντρώσεις 50 mM και 60 mM, μ'αποτέλεσμα οι βέλτιστες συνθήκες κινητής στον ορό να είναι οι εξής:

- ✓ AMF (50 mM)/ACN 65/35 v/v + 0,1% HCOOH
- ✓ AMF (60 mM)/ACN 65/35 v/v + 0,1% HCOOH

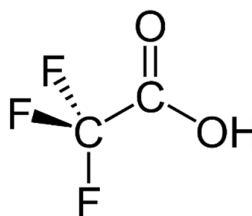
Ωστόσο επειδή στα πλαίσια αυτής της ερευνητικής διαδικασίας μελετήθηκαν παράλληλα και άλλα δύο βιολογικά υλικά, ανθρώπινο πλάσμα και μητρικό γάλα, επιλέχθηκε ως βέλτιστη κινητή φάση και για τα τρία βιολογικά υλικά, η εξής κινητή φάση, AMF (49 mM)/ACN 66/34 v/v + 0,1% HCOOH, η οποία παρείχε εξίσου ικανοποιητικό διαχωρισμό.

5.4.2.4. Ποσοστό και είδος των πρόσθετων στην κινητή φάση

Στη συνέχεια μελετήθηκε το είδος των πρόσθετων στην κινητή φάση καθώς και το ποσοστό τους. Εξετάστηκαν λοιπόν, το τριφθοραιθανικό οξύ ή τριφθοροξικό οξύ (TFA) και το μυρμηκικό οξύ (HCOOH).

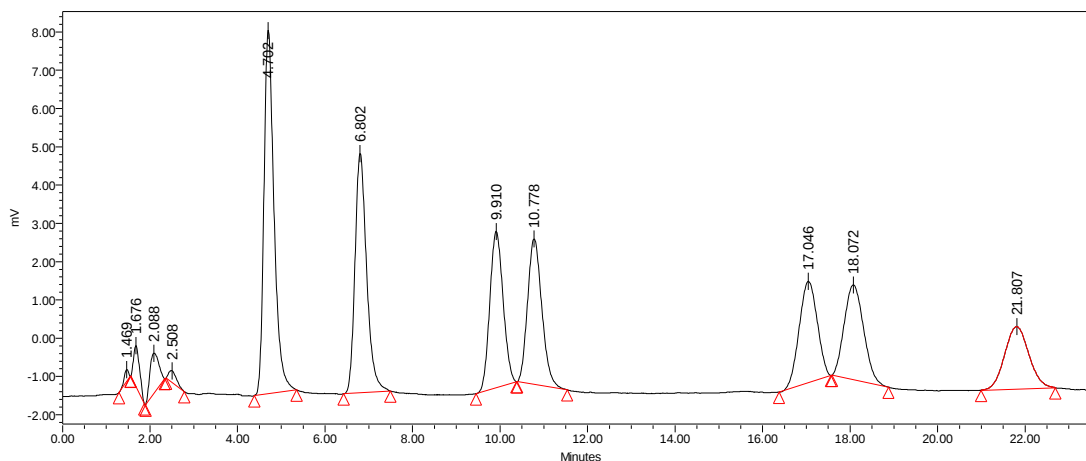


Μυρμηκικό οξύ (HCOOH)



Τριφθοροξικό οξύ (TFA)

Για να γίνει η σύγκριση των δυο πρόσθετων της κινητής φάσης συγκρίθηκαν δύο πρότυπα διαλύματα εργασίας, τα οποία παρασκευάστηκαν με τον εξής τρόπο: 20 μ L WS (working solution) 2,5 μ g/mL in H_2O + 130 μ L ACN (5 mM). Τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν είναι τα παρακάτω για κάθε είδος οξέος αντίστοιχα. (σχήμα 5.16)

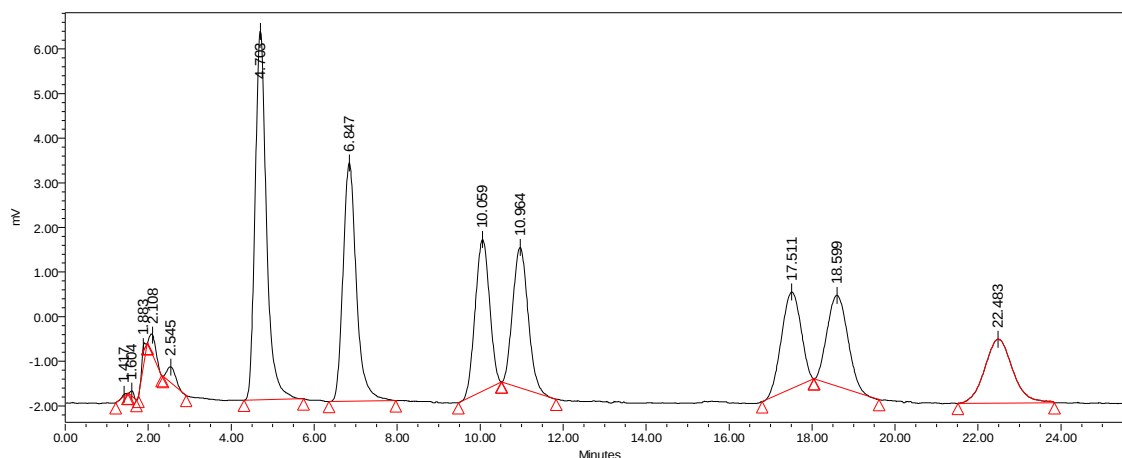


Σχήμα 5.16: Χρωματογραφικός διαχωρισμός των parabens με χρήση κινητής φάσης, H_2O (49 mM) / ACN 66/34 v/v + 0,1% TFA.

Ωστόσο κατά την διάρκεια της μελέτης, είχε αυξηθεί αρκετά η πίεση της στήλης με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται προβλήματα στον διαχωρισμό. Έτσι λοιπόν σύμφωνα με τις οδηγίες της στήλης, η στήλη πλύθηκε με TFA, πιο αναλυτικά πλύθηκε με το εξής διάλυμα: $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ 5/95 v/v + 0,1% TFA. Για να μην παρουσιαστεί ξανά κάποιο πρόβλημα με την

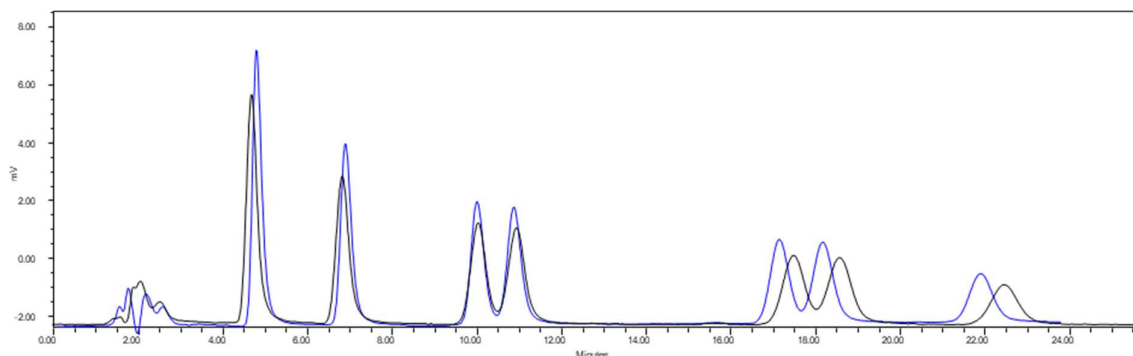
πίεση της στήλης, η μελέτη του είδους των πρόσθετων στην κινητή πραγματοποιήθηκε με την χρήση AMF σε χαμηλή συγκέντρωση (15mM). Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκε η εξής κινητή φάση: □□ F (15 m□) / □C□ 66/34 v/v +0,1% □F□.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός που επιτεύχθηκε με αυτήν την κινητή φάση παρουσιάζεται στο σχήμα 5.17.



Σχήμα 5.17: Χρωματογραφικός διαχωρισμός των parabens με χρήση κινητής φάσης, □□ F (15 m□) / □C□ 66/34 v/v + 0,1% □F□.

Στο σχήμα 5.18 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα αλληλοεπικάλυψης των χρωματογραφημάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του μίγματος των αναλυτών στις δύο αυτές κινητές φάσεις προκειμένου να φανεί πιο παραστατικά η επίδραση των ειδών των πρόσθετων, της κινητής φάσης, στη συγκράτηση των αναλυτών

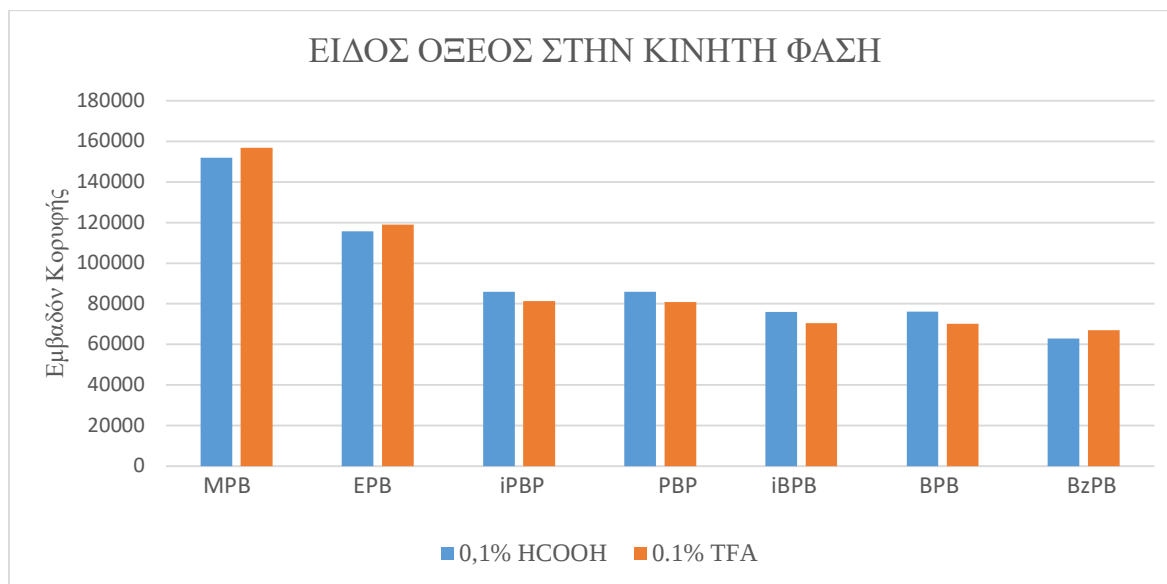


Σχήμα 5.18: Σύγκριση των χρωματογραφημάτων που προκύπτουν από την ανάλυση του μίγματος των αναλυτών στις κινητές φάσεις:

□□ F (49 m□) / □C□ 66/34 v/v +0.1% □C□□□

□□ F (15m□) / □C□ 66/34 v/v +0.1% □F□

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα, παρατηρείται ότι με προσθήκη 0,1% HCOOH στην κινητή φάση, ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται σε συντομότερο χρονικό διάστημα έναντι του TFA.



Σχήμα 5.19: Διάγραμμα σύγκρισης των δυο κινητών φάσεων με χρήση διαφορετικού οξέος σε βιολογικό δείγμα ορού, συγκέντρωσης 100 ng/mL στον ορό.

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα φαίνεται ότι η προσθήκη τριφθοροξικού οξέος στην κινητή φάση, δίνει μεγάλα εμβαδά κορυφών. Ωστόσο, έγινε καμπύλη αναφοράς στον ορό με την χρήση τριφθοροξικού οξέος και τα αποτελέσματα δεν παρουσίασαν καλή γραμμικότητα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι αλλάζει η γραμμή βάσης (baseline) μ' αποτέλεσμα να καθιστά δύσκολη την σωστή ολοκλήρωση των κορυφών. Έτσι λοιπόν επιλέχθηκε η προσθήκη μυρμηκικού οξέος στην κινητή φάση.

Στη συνέχεια μελετήθηκε το ποσοστό του οξέος που έπρεπε να προστεθεί στην κινητή φάση. Για αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν δύο ποσοστά οξέος, 0,1% και 0,2% HCOOH και παρατηρήθηκε ότι το μικρό ποσοστό οξέος δηλαδή το 0,1% HCOOH, έδινε καλύτερα εμβαδά κορυφών από το 0,2% HCOOH, για το ίδιο δείγμα και διατηρώντας όλες τις υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος σταθερές.

Επομένως, οι βέλτιστες συνθήκες της κινητής φάσης μέχρι τώρα είναι:

- ✓ AMF (49mM)/ACN 66/34 v/v + 0.1% HCOOH

5.4.3. Βελτιστοποίηση Προκατεργασίας βιολογικού δείγματος με την διαδικασία FPSE.

Το αρχικό πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την προκατεργασία του ανθρώπινου ορού με την τεχνική προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο αποτελείται από τα εξής στάδια:

① Ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου FPSE

- Εμβάπτιση του μέσου FPSE σε 2 mL διαλύματος ACN/H₂O για 5 λεπτά, για την απομάκρυνση τυχόν ανεπιθύμητων ακαθαρσιών από το υλικό και την ενεργοποίηση του μέσου για την εκχύλιση.
- Έκπλυση του μέσου FPSE με 2 mL απιονισμένου νερού.

② Εκχύλιση των αναλυτών

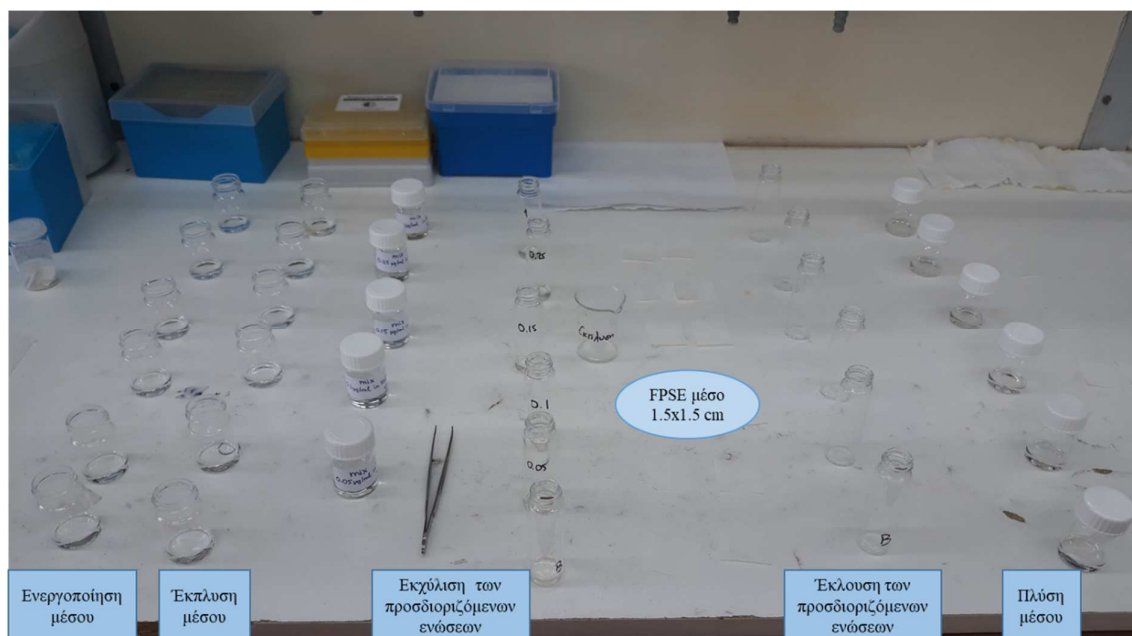
- Προσθήκη 50 μ L ορού, 500 μ L πρότυπου διαλύματος των ενώσεων και 450 μ L απιονισμένου νερού σε γυάλινο φιαλίδιο
- Ανάδευση με την χρήση μαγνήτη για 15 λεπτά

③ Έκλουση των αναλυτών

- Προσθήκη 500 μ L διαλύματος MeOH/ACN (50/50 v/v) σε γυάλινο φιαλίδιο
- Τοποθέτηση του μέσου στο φιαλίδιο για 15 λεπτά
- Παραλαβή του εκλούσματος και διήθηση σε σύριγγα με φίλτρο, εάν απαιτείται
- Έγχυση του εκλούσματος στο σύστημα HPLC

④ Πλύση του μέσου για μελλοντική χρήση

Στο σχήμα 5.20 απεικονίζεται η διαδικασία της τεχνικής προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο.



Σχήμα 5.20: Απεικόνιση διαδικασίας της τεχνικής προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο.

Για τη βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας του δείγματος για την εκχύλιση των parabens, εξετάστηκαν και αξιολογήθηκαν διάφοροι πειραματικοί παράγοντες. Ο κάθε παράγοντας μελετήθηκε διατηρώντας τους υπόλοιπους σταθερούς. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν είναι οι εξής:

- ☒ Το είδος του προσροφητικού μέσου FPSE
- ☒ Ο χρόνος εκχύλισης και η ανάδευση κατά την εκχύλιση
- ☒ Ο διαλύτης εκχύλισης
- ☒ Ο χρόνος έκλυσης και η ανάδευση κατά την έκλυση
- ☒ Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων

5.4.3.1. Επιλογή του προσροφητικού μέσου FPSE.

Το υφασμάτινο υπόστρωμα είναι ένα σημαντικό δομικό στοιχείο των μεμβρανών FPSE. Λαμβάνοντας υπόψη την πολικότητα των parabens, επιλέχθηκε ένα υδρόφιλο υπόστρωμα (100% βαμβακερή κυτταρίνη) για τη μεμβράνη FPSE. Το προσροφητικό μέσο FPSE που χρησιμοποιήθηκε είχε επικάλυψη sol-gel CW-20. Για την επιλογή του βέλτιστου μέσου μελετήθηκαν 2 προσροφητικά μέσα: sol-gel CW-20 και sol-gel F. Επίσης μελετήθηκαν

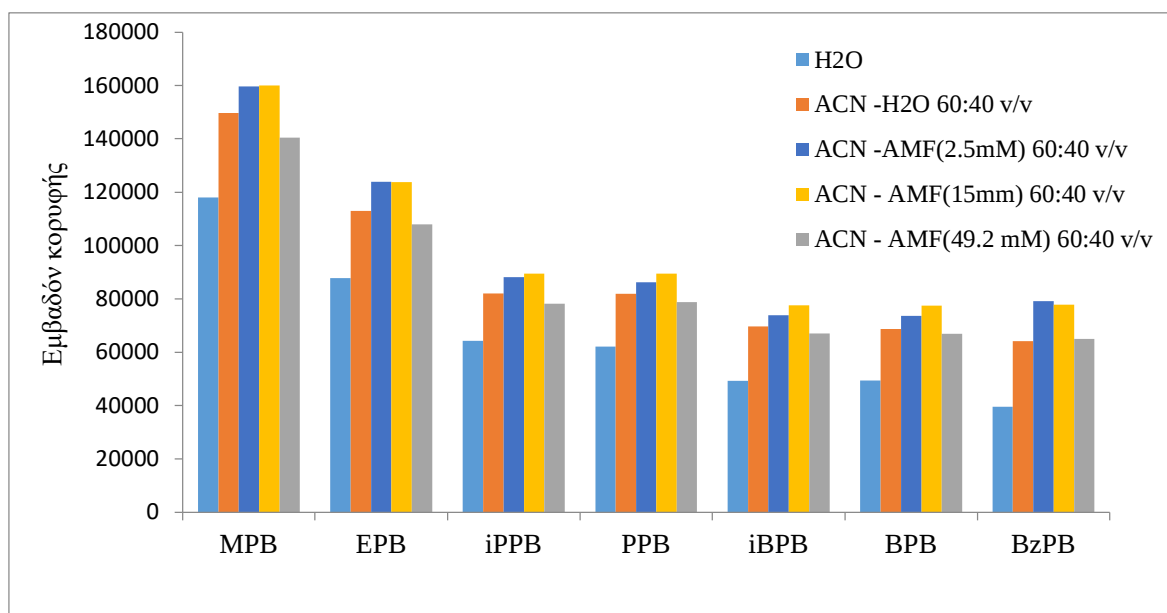
και οι βέλτιστες διαστάσεις του μέσου, πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν οι εξής διαστάσεις: 1,5 x 1,5 cm, 1 x 1 cm και 2 x 2 cm. Οι μελέτες αυτές πραγματοποιήθηκαν στο πλάσμα, το οποίο παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με τον ορό. Η καλύτερη ανάκτηση παρουσιάστηκε στις εξής συνθήκες οι οποίες και επιλέχθηκαν ως βέλτιστες για το μέσο που θα χρησιμοποιούταν στην έρευνα: sol-gel CW-20, εμβαδού 2,25 cm².

5.4.3.2. Επιλογή διαλύτη έκλουσης των αναλυτών.

Ο διαλύτης έκλουσης είναι μία ακόμα σημαντική παράμετρος που επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της τεχνικής προκατεργασίας του δείγματος FPSE. Έχοντας ως σημείο αναφοράς τις εξής συνθήκες για την παρασκευή του εμβολιασμένου δείγματος ορού: 100 μL ορού + 20 μL πρότυπου διαλύματος (2,5 μg/mL in H₂O) + 280 μL υπερκάθαρου νερού, μελετήθηκε ποιος είναι ο κατάλληλος διαλύτης για να παραληφθούν οι αναλύτες. Η πρώτη σκέψη ήταν να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης παραλαβής ένα σύστημα που θα είχε παρόμοια συμπεριφορά με την κινητή φάση. Έτσι, διατηρήθηκαν τα διαλύματα της κινητής φάσης καθώς και η αναλογία 60/40 v/v, ωστόσο θα έπρεπε να διερευνηθεί η συγκέντρωση του ρυθμιστικού AMF που θα οδηγούσε στην καλύτερη ανάκτηση των επτά αναλυτών. Έτσι, έγιναν πρώτα κάποιες δοκιμές σε πρότυπα διαλύματα. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν και ενέθηκαν τα εξής πρότυπα διαλύματα:

1. 20μL πρότυπου υδατικού διαλύματος + 130 μL H₂O
2. 20μL πρότυπου υδατικού διαλύματος + 40 μL H₂O + 90μL ACN
3. 20μL πρότυπου υδατικού διαλύματος + 40 μL AMF (2,5 mM) + 90μL ACN
4. 20μL πρότυπου υδατικού διαλύματος + 40 μL AMF (15 mM) + 90μL ACN
5. 20μL πρότυπου υδατικού διαλύματος + 40 μL AMF (49 mM) + 90μL ACN

Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από την ένεση των πρότυπων διαλυμάτων φαίνονται στο σχήμα 5.21.



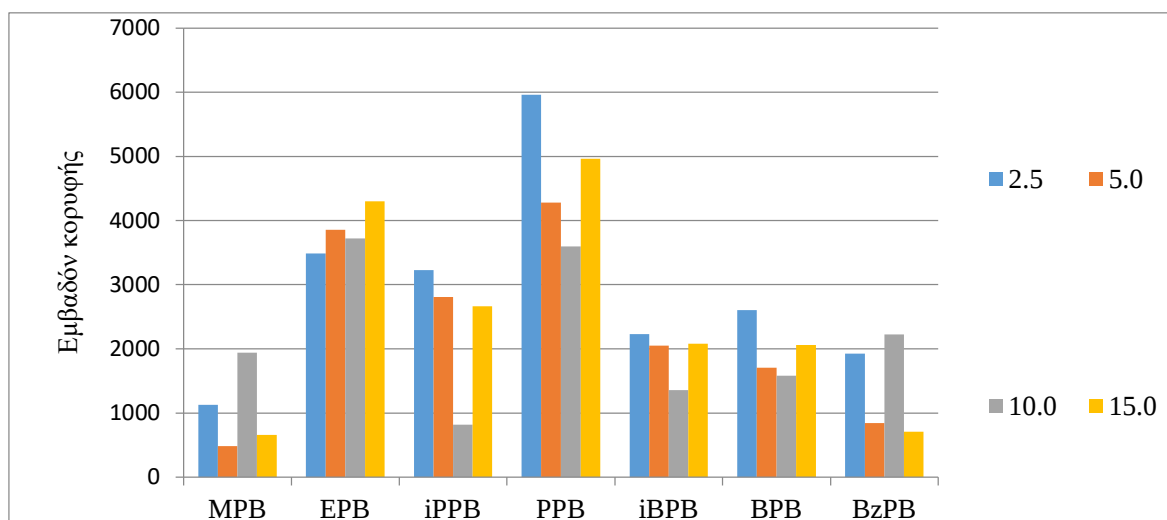
Σχήμα 5.21: Διάγραμμα μελέτης επίδρασης τεσσάρων διαλυτών στο σήμα.

Από το παραπάνω διάγραμμα συμπεραίνεται ότι τα καλύτερα εμβαδά κορυφών λαμβάνονται με την χρήση 20μL πρότυπου υδατικού διαλύματος + 40 μL AMF (15 mM) + 90μL ACN, καθώς όπως φαίνεται παρουσιάζει το μεγαλύτερο σήμα σε όλους τους αναλύτες και συνεπώς επιτυγχάνεται η καλύτερη ανάκτηση τους, με το εύρος των εμβαδών κορυφών να κυμαίνεται από 77832 για το BzPB έως 160074 για το MPB.

Η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε και σε εμβολιασμένα δείγματα ορού. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν τέσσερα δείγματα ορού (S1, S2, S3, S4) όπου το στάδιο της παραλαβής άλλαξε ως εξής:

1. Serum S1: 500 μL ACN/AMF (2,5 mM) 60/40 v/v για 20 λεπτά
2. Serum S2: 500 μL ACN/AMF (5 mM) 60/40 v/v για 20 λεπτά
3. Serum S3: 500 μL ACN/AMF (10 mM) 60/40 v/v για 20 λεπτά
4. Serum S4: 500 μL ACN/AMF (15 mM) 60/40 v/v για 20 λεπτά

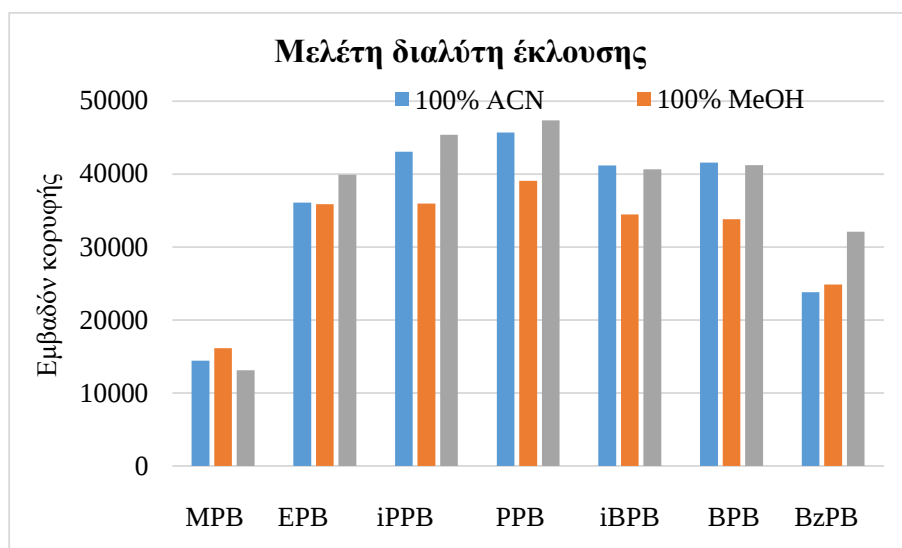
Ακολουθεί διήθηση από μικρόφιλτρα και τέλος πλύση του μέσου. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτήν την μελέτη φαίνονται στο σχήμα 5.22.



Σχήμα 5.22: Διάγραμμα μελέτης επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου που χρησιμοποιείται στην παραλαβή στο σήμα των αναλυτών.

Παρατηρείται ότι η βέλτιστη ανάκτηση των MPB και BzPB πραγματοποιείται με ρυθμιστικό συγκέντρωσης 10 mM AMF, του EPB με 15 mM AMF και των iPPB, PPB, iBPB με 2,5 mM AMF. Έτσι συμπεραίνεται ότι τα καλύτερα σήματα στην πλειονότητα λαμβάνονται με τις συγκεντρώσεις 2,5 και 10 mM. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν και άλλοι διαλύτες έκλουσης όπως η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο καθώς και μίγμα αυτών των δύο. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν τρία δείγματα ορού (S1, S2, S3) όπου κατά την παραλαβή χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη διαλυτών, για το δείγμα S1 χρησιμοποιήθηκαν 600μL ACN, για το δείγμα S2 χρησιμοποιήθηκαν 600 μL MeOH και για το δείγμα S3 χρησιμοποιήθηκαν 600 μL ACN/MeOH σε αναλογία 60/40 v/v (χρόνος παραμονής 20 λεπτά) Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στο σχήμα 5.23.

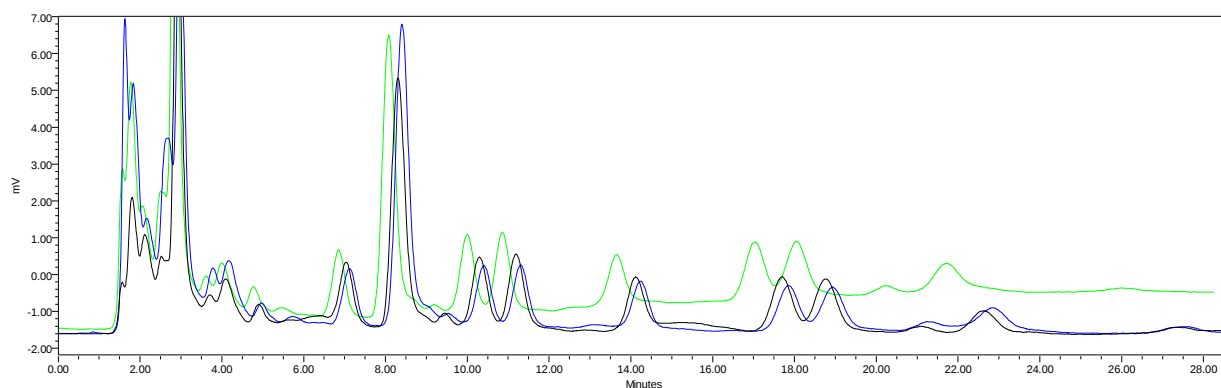
Στη συνέχεια ακολουθεί διήθηση από μικρόφιλτρα και λαμβάνονται 550μL από κάθε δείγμα για συμπύκνωση με άζωτο και ανασύσταση με ACN/AMF σε αναλογία 60/40 v/v. Τέλος, ακολουθεί το στάδιο πλύσης του μέσου.



Σχήμα 5.23: Διάγραμμα σύγκρισης των τριών διαλυτών που μελετήθηκαν κατά το στάδιο της παραλαβής των αναλυτών.

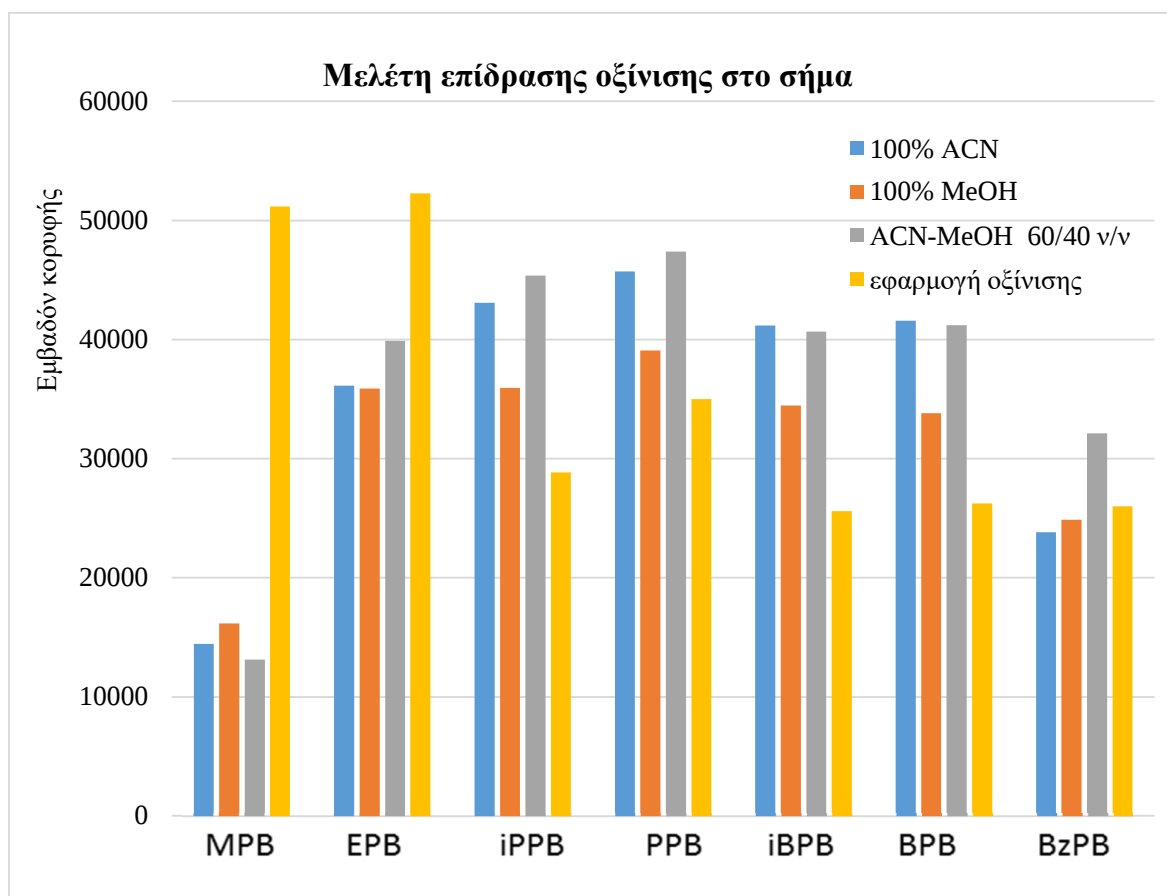
Παρατηρήθηκε, ότι η νέα μελέτη οδήγησε σε υψηλότερες ανακτήσεις, όπως διαπιστώνεται και στο σχήμα 5.23. Τα μεγαλύτερα σήματα για τα MPB, EPB, iPPB, PPB και BzPB επιτεύχθηκαν με τη χρήση διαλύτη έκλουσης ACN/MeOH σε αναλογία 60/40 v/v, ενώ στα iBPB και BPB παρουσιάστηκε παρόμοια συμπεριφορά στα σήματα είτε με τη χρήση ACN/MeOH είτε με τη χρήση 100% ACN ως διαλύτες παραλαβής.

Στο σχήμα 5.24 παρουσιάζεται ένα διάγραμμα αλληλοεπικάλυψης των χρωματογραφημάτων που πάρθηκαν πειραματικά με στόχο τη σύγκριση των τριών διαλυτών που μελετήθηκαν κατά το στάδιο της παραλαβής των αναλυτών.



Σχήμα 5.24: Διάγραμμα αλληλοεπικάλυψης χρωματογραφημάτων των δειγμάτων S1 ACN/AMF (2,5 mM) 60/40 v/v, S2 ACN/AMF (5 mM) 60/40 v/v, S3 ACN/AMF (10 mM).

Στη συνέχεια, προέκυψε το ερώτημα κατά πόσο η οξίνιση του εμβολιασμένου δείγματος θα επηρέαζε τα εμβαδά κορυφών και αντίστοιχα τον διαχωρισμό των αναλυτών. Έτσι λοιπόν, δοκιμάστηκε και αυτό το στάδιο. Πιο συγκεκριμένα, παρασκευάστηκε το εξής δείγμα: 100 μL ορού + 20 μL πρότυπου διαλύματος (2,5 $\mu\text{g/mL}$ in H_2O) + 180 μL υπερκάθαρου νερού + 100 μL HCOOH 0.1%. Επίσης επιλέχθηκε δοκιμαστικά, ως διαλύτης έκλουσης η μεθανόλη καθώς εξατιμίζεται γρηγορότερα. Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν ήταν αρκετά εντυπωσιακά (σχήμα 5.25).



Σχήμα 5.25: Διάγραμμα σύγκρισης του σήματος των αναλυτών με την εφαρμογή του σταδίου της οξίνισης.

Παρατηρήθηκε, ότι με την οξίνιση επιτεύχθηκε καλύτερος χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών, όπου το □□□ και □□□ είχαν μεγαλύτερο σήμα σε σχέση με πριν. Έτσι λοιπόν μέσω αυτής της δοκιμής διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη οξέος στο εμβολιασμένο δείγμα προσδίδει καλύτερες κορυφές με υψηλά σήματα και γι' αυτό και επιλέχθηκε ως επιπρόσθετο στάδιο στην

τελική προκατεργασία. Τέλος, ως διαλύτης στην έκλουση των αναλυτών επιλέχθηκε η μεθανόλη καθώς όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα ενισχύει το στάδιο της οξίνισης, συμπυκνώνεται γρηγορότερα λόγω σημείου ζέσεως και τέλος παρουσίασε παρόμοια καλή συμπεριφορά και στα τρία βιολογικά δείγματα που μελετώνται στα πλαίσια αυτής της έρευνας. Σχετικά με τον χρησιμοποιούμενο όγκο του διαλύτη έκλουσης, δοκιμάστηκαν τα 500 μL και τα 600 μL . Ο όγκος που επιλέχθηκε ήταν τα 600 μL , καθώς παρατηρήθηκε καλύτερη ανάκτηση των αναλυτών και καλύτερη προσυγκέντρωση τους.

5.4.3.3. Ποσότητα βιολογικού υλικού.

Αρχικά, μελετήθηκε η ποσότητα του βιολογικού δείγματος που επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση. Έτσι λοιπόν δοκιμάστηκαν τρεις πιθανές ποσότητες: 50 μL , 100 μL και 200 μL . Επιλέχθηκε ως βέλτιστος ο όγκος των 100 μL ορού που έδιναν καλύτερη ανάκτηση και εν τέλει χρησιμοποιήθηκαν και για την καμπύλη αναφοράς που θα παρουσιαστεί στη συνέχεια της παρούσας εργασίας. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, προκύπτουν οι συγκεντρώσεις του πίνακα 5.3.

Πίνακας 5.3: Εμβολιασμένα δείγματα ορού.

$C_{\text{τελ}}$ ng/mL	Όγκος μL	Ποσότητα αναλυτών μg	Όγκος ορού	C στον ορό ng/mL
50	10	0,5	100	5
100	10	1	100	10
150	10	1,5	100	15
250	10	2,5	100	25
500	10	5	100	50
1000	10	10	100	100
2500	10	25	100	250

5.4.3.4. Χρόνος εκχύλισης των ενώσεων.

Προκειμένου να εξεταστεί η επίδραση του χρόνου εκχύλισης των προσδιοριζόμενων ενώσεων με την τεχνική προκατεργασίας FPSE, δοκιμάστηκαν οι χρόνοι 20, 40 και 60 λεπτά. Η ανακίνηση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στην συσκευή του σχήματος 5.26 (vertical rotator) και λαμβάνεται υπόψιν ως μέτρια ανάδευση. Η ισορροπία στην εκχύλιση των ενώσεων από το δείγμα παρατηρήθηκε στα 20 λεπτά και αυτός επιλέχθηκε ως βέλτιστος χρόνος εκχύλισης.



Σχήμα 5.26: Συσκευή ανάδευσης, vertical rotator, κατά την εκχύλιση και έκλουση των αναλυτών.

5.5. Τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης των προσδιοριζόμενων parabens από τον ανθρώπινο ορό του αίματος με την τεχνική προκατεργασίας FPSE.

Η διαδικασία προκατεργασίας του εμβολιασμένου ανθρώπινου ορού, που χρησιμοποιήθηκε ύστερα από την βελτιστοποίηση της τεχνικής FPSE (σχήμα 5.27) είναι η ακόλουθη:

① Ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου FPSE

- Εμβάπτιση του μέσου FPSE σε 2 mL διαλύματος ACN/H₂O για 5 λεπτά, για την απομάκρυνση τυχόν ανεπιθύμητων ακαθαρσιών από το υλικό και την ενεργοποίηση του μέσου για την εκχύλιση.
- Έκπλυση του μέσου FPSE με 2 mL απιονισμένου νερού.

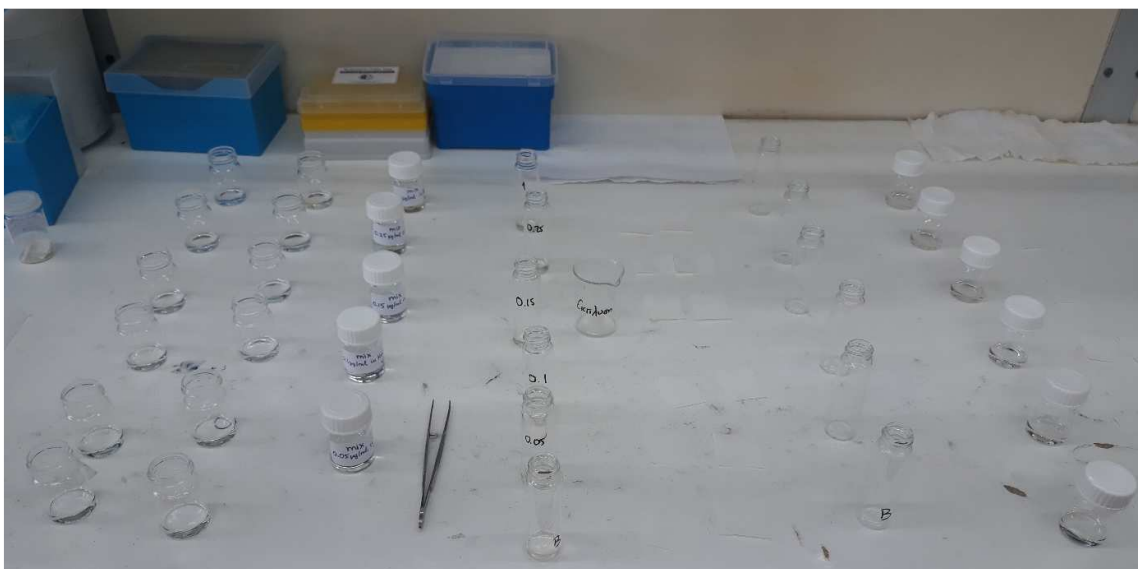
② Εκχύλιση των αναλυτών

- Προσθήκη 100 μL ορού, 20 μL πρότυπου διαλύματος των ενώσεων και 180 μL απιονισμένου νερού, 100 μL HCOOH 0,1%, σε γυάλινο φιαλίδιο
- Μέτρια ανάδευση για 20 λεπτά

③ Έκλυση των αναλυτών

- Έκπλυση του μέσου με απιονισμένο νερό και ξήρανση πάνω σε διηθητικό χαρτί για 5 λεπτά.
- Προσθήκη 600 μL διαλύματος MeOH σε γυάλινο φιαλίδιο
- Παραλαβή του εκλούσματος και διήθηση από φίλτρο σύριγγας Hydrophilic PTFE, μέγεθος πόρων 0,22 μm
- Έγχυση του εκλούσματος στο σύστημα HPLC

④ Πλύση του μέσου για μελλοντική χρήση



Σχήμα 5.27: Διαδικασία προκατεργασίας του ορού που χρησιμοποιήθηκε πειραματικά.

5.6. Καμπύλες αναφοράς – έλεγχος γραμμικότητας

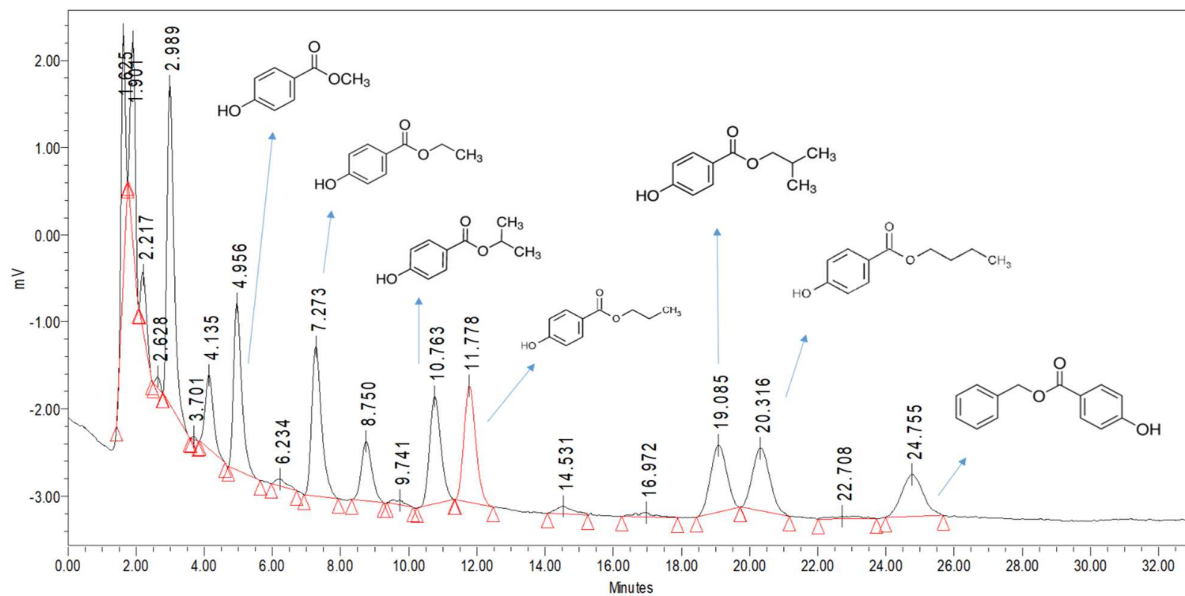
Χρησιμοποιήθηκαν τα 7 πρότυπα υδατικά διαλύματα εργασίας των εξεταζόμενων ενώσεων σε συγκεντρώσεις 50, 100, 150, 250, 500, 1000, 2500 ng/mL . Έπειτα, ακολούθησε προκατεργασία του ορού αίματος εμβολιασμένου με το κάθε πρότυπο διάλυμα, σύμφωνα με το τελικό πρωτόκολλο προκατεργασίας FPSE που προέκυψε μετά τη βελτιστοποίηση της

διαδικασίας. Τα δείγματα ενέθηκαν δύο φορές το καθένα και με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς για την κάθε προσδιοριζόμενη ένωση. Επίσης, εξήχθη η εξίσωση και ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) για κάθε καμπύλη αναφοράς, ο οποίος κυμάνθηκε από 0,98 έως 0,9995. Στον πίνακα 5.4. παρουσιάζονται οι εξισώσεις για κάθε καμπύλη αναφοράς, όπου y είναι το εμβαδόν της κορυφής της κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης και x είναι η συγκέντρωση της ένωσης σε $\text{ng}/\mu\text{L}$, καθώς και ο συντελεστής προσδιορισμού.

Πίνακας 5.4: Καμπύλες αναφοράς των 7 parabens σε εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος.

Ένωση	Εξίσωση καμπύλης αναφοράς	Συντελεστής προσδιορισμού (R^2)
MPB	$y = 60,35 x + 1585$	0,9995
EPB	$y = 68,77x + 277$	0,9991
iPPB	$y = 57,69 x - 288$	0,998
PPB	$y = 55,03 x + 5233$	0,98
iBPB	$y = 50,39 x - 133$	0,999
BPB	$y = 50,29 x + 317$	0,994
BzPB	$y = 25,71 x + 7876$	0,999

Ο τελικός χρωματογραφικός διαχωρισμός που επιτεύχθηκε παρουσιάζεται στο χρωματογράφημα του σχήματος 5.28.



Σχήμα 5.28: Τελικός χρωματογραφικός διαχωρισμός των parabens.

VI. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αναπτύχθηκε μια μέθοδος για τον προσδιορισμό επτά συντηρητικών, των Methylparaben (MPB), Ethylparaben (EPB), Propylparaben (PPB), Iso-propylparaben (iPPB), Butylparaben (BPB) iso-butylparaben (iBPB) και benzylparaben (BzPB) σε δείγματα ανθρώπινου ορού αίματος με την τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) και την τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή ορατού υπεριώδους φωτός (UV-VIS) ρυθμισμένο να μετρά την απορρόφηση του εκλούσματος στα 257 nm.

Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εν λόγω μελέτη, συμπεραίνεται ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από τα εξής χαρακτηριστικά:

- ✓ Ικανοποιητικές ανακτήσεις των αναλυτών, μετά τη βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας δείγματος FPSE.
- ✓ Απλότητα, καθώς δεν απαιτείται κάποια διαδικασία για την κατακρήμνιση πρωτεϊνών του ορού αίματος κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας.
- ✓ Χαμηλό κόστος, καθώς χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών και βασικός/κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός.
- ✓ Ταχύτητα, καθώς ο συνολικός χρόνος προκατεργασίας είναι μικρός, με την εκχύλιση των ενώσεων να ολοκληρώνεται στα 20 min και την έκλυση στα 20 min.
- ✓ Εναρμόνιση με τις Αρχές της Πράσινης Χημείας, καθώς χρησιμοποιεί ελάχιστη ποσότητα οργανικών διαλυτών, παράγει μειωμένο όγκο αποβλήτων και δεν χρησιμοποιεί επικίνδυνες τοξικές ουσίες.
- ✓ Αποτελεσματικός χρωματογραφικός διαχωρισμός και ταυτόχρονος προσδιορισμός 7 ενώσεων σε 25 min.
- ✓ Εκλεκτικότητα, καθώς δεν υπήρχαν παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό των ενώσεων.
- ✓ Επαναχρησιμοποίηση του μέσου προσρόφησης FPSE για τουλάχιστον τριάντα φορές, χωρίς να παρατηρηθεί απώλεια της προσροφητικής του ικανότητας.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ / ΧΑΤΖΗΙΩΑΝΝΟΥ Π. Θ. , ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ Α.Μ.
<https://www.politeianet.gr/books/9789602207505-chatziioannou-p-th-idiotiki-enorgani-analusi-226052>.
2. Skoog Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης | ΚΩΣΤΑΡΑΚΗ. <http://kostaraki.gr/wordpress/skoog-principlesinstrumentalanalysis/>.
3. Αποθετήριο Κάλλιπος: Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας.
<https://repository.kallipos.gr/handle/11419/5382>.
4. Ειρήνη Παντερή & Μ. Π.-Π. ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ. vol. 53 (2015).
5. Καρκαλούσος, Π. *et al.* Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. (2015).
6. Ενόργανη χημική ανάλυση - Ι. Παπαδογιάννης, Βικτωρία Σαμανίδου - 9789603170587 | Protoporia.gr. <https://www.protoporia.gr/samanidou-biktwria-enorganh-xhmikh-analysh-9789603170587.html>.
7. Difference Between Reverse Phase and Normal Phase HPLC | Compare the Difference Between Similar Terms. <https://www.differencebetween.com/difference-between-reverse-phase-and-normal-phase-hplc/>.
8. My Scientific Blog - Research and Articles: ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY.
<http://upendratts.blogspot.com/2013/05/ion-exchange-chromatography.html>.
9. Πουλάς, Κ. & Σιδέρης, Σ. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΙΟΝΤΟΑΝΤΑΛΛΑΓΗΣ. (2015).
10. Kumar Ajith. Bio-Resource: Gel Filtration Chromatography (GF) / Size Exclusion Chromatography (SEC). (2016).
11. Successful Operation of HPLC System | shula-lc. <http://shula-lc.co.il/successful-operation-of-hplc-system/>.
12. UV absorption detectors - UV absorption detectors - Chromedia. 2–3 (2010).
13. Kabir, A., Mesa, R., Jurmain, J. & Furton, K. G. Fabric phase sorptive extraction explained. *Separations* **4**, (2017).
14. Majors, R. SAMPLE PREPARATION FUNDAMENTALS FOR CHROMATOGRAPHY For more information. 78–93.
15. Raza, N., Kim, K. H., Abdullah, M., Raza, W. & Brown, R. J. C. Recent developments in analytical quantitation approaches for parabens in human-associated samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **98**, 161–173 (2018).
16. Cabaleiro, N., De la Calle, I., Bendicho, C. & Lavilla, I. An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **57**, 34–46 (2014).
17. Kole, P. L., Venkatesh, G., Kotecha, J. & Sheshala, R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed. Chromatogr.* **25**, 199–217 (2011).
18. Shutterstock - PuzzlePix. [http://shutterstock.puzzlepix.hu/kereses?query=precipitation beaker](http://shutterstock.puzzlepix.hu/kereses?query=precipitation%20beaker).

19. Yamini, Y., Rezazadeh, M. & Seidi, S. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 112 264–272 (2019).
20. ZabMilenko. Diagram showing the differences between a compound, a precipitate, a supernate, and a suspension. <https://commons.wikimedia.org/>.
21. Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M. & Namieśnik, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* vol. 73 19–38 (2015).
22. The steps of SPME technique | Download Scientific Diagram. https://www.researchgate.net/figure/The-steps-of-SPME-technique_fig1_242140258.
23. Kabir, A., & Furton, K. J. Thermal techniques and their applications. in *Analytical Chemistry: Developments, Applications and Challenges in Food Analysis*; (2017).
24. Kabir, A., Locatelli, M. & Ulusoy, H. I. Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation. *Separations* 36 (2017) doi:10.3390/separations4040036.
25. Roldán-Pijuán, M. *et al.* Stir fabric phase sorptive extraction for the determination of triazine herbicides in environmental waters by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1376**, 35–45 (2015).
26. Rotating Disk Sorptive Extraction. <https://microextraction.blogspot.com/2014/11/rotating-disk-sorptive-extraction.html>.
27. Lakade, S. S. *et al.* Dynamic fabric phase sorptive extraction for a group of pharmaceuticals and personal care products from environmental waters. *J. Chromatogr. A* **1456**, 19–26 (2016).
28. Anthemidis, A., Kazantzi, V., Samanidou, V., Kabir, A. & Furton, K. G. An automated flow injection system for metal determination by flame atomic absorption spectrometry involving on-line fabric disk sorptive extraction technique. *Talanta* **156–157**, 64–70 (2016).
29. Kazantzi, V., Samanidou, V., Kabir, A., Furton, K. G. & Anthemidis, A. On-line fabric disk sorptive extraction via a flow preconcentration platform coupled with atomic absorption spectrometry for the determination of essential and toxic elements in biological samples. *Separations* **5**, 34 (2018).
30. Difference between Blood and Serum | Blood vs Serum. <http://www.differencebetween.info/difference-between-blood-and-serum>.
31. Differences between Serum and Plasma. <https://microbiologynotes.com/differences-between-serum-and-plasma/>.
32. The Importance of Human Serum – Innovative Research. <https://www.innov-research.com/blogs/news/the-importance-of-human-serum>.
33. Błedzka, D., Gromadzińska, J. & Wasowicz, W. Parabens. From environmental studies to human health. *Environ. Int.* **67**, 27–42 (2014).
34. Soni, M. G., Carabin, I. G. & Burdock, G. A. Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* **43**, 985–1015 (2005).
35. Nowak, K., Ratajczak-Wrona, W., Górská, M. & Jabłońska, E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol. Cell. Endocrinol.* **474**, 238–251 (2018).
36. Tartaglia, A. *et al.* FPSE-HPLC-PDA analysis of seven paraben residues in human whole blood, plasma, and urine. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1125**, 121707 (2019).

37. Golden, R., Gandy, J. & Vollmer, G. A review of the endocrine activity of parabens and implications for potential risks to human health. *Crit. Rev. Toxicol.* **35**, 435–458 (2005).
38. Fransway, A. F. *et al.* Parabens. *Dermatitis* **30**, 3–31 (2019).
39. Gabb, H. A. & Blake, C. An informatics approach to evaluating combined chemical exposures from consumer products: A case study of asthma-associated chemicals and potential endocrine disruptors. *Environ. Health Perspect.* **124**, 1155–1165 (2016).
40. Angerer, J., Dierkes, G., Brüning, T. & Koch, H. M. Article in Archives of Toxicology. (2016) doi:10.1007/s00204-015-1636-0.
41. Soni, M. G., Taylor, S. L., Greenberg, N. A. & Burdock, G. A. Evaluation of the health aspects of methyl paraben: A review of the published literature. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1335–1373 (2002).
42. Ma, W. L. *et al.* A survey of parabens in commercial pharmaceuticals from China and its implications for human exposure. *Environ. Int.* **95**, 30–35 (2016).
43. Moreta, C., Tena, M. T. & Kannan, K. Analytical method for the determination and a survey of parabens and their derivatives in pharmaceuticals. *Environ. Res.* **142**, 452–460 (2015).
44. Sources of Water Pollution - Environmental Science.
<http://shssenvironmentalscience.weebly.com/sources-of-water-pollution.html>.
45. Albero, B., Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C. & Tadeo, J. L. Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). *J. Hazard. Mater.* **239–240**, 48–55 (2012).
46. Rudel, R. A., Camann, D. E., Spengler, J. D., Korn, L. R. & Brody, J. G. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 4543–4553 (2003).
47. Matwiejczuk, N., Galicka, A. & Brzóska, M. M. Review of the safety of application of cosmetic products containing parabens. *J. Appl. Toxicol.* **40**, 176–210 (2020).
48. Pycke, B. F. G., Geer, L. A., Dalloul, M., Abulafia, O. & Halden, R. U. Maternal and fetal exposure to parabens in a multiethnic urban U.S. population. *Environ. Int.* **84**, 193–200 (2015).
49. Fransway, A. F., Fransway, P. J., Belsito, D. V. & Yiannias, J. A. Paraben Toxicology. *Dermatitis* **30**, 32–45 (2019).
50. Routledge, E. J., Parker, J., Odum, J., Ashby, J. & Sumpter, J. P. Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**, 12–19 (1998).
51. Byford, J. R. *et al.* Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **80**, 49–60 (2002).
52. Wróbel, A. M. & Gregoraszczuk, E. Ł. Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor- α and - β and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and non-cancerous MCF-10A cells. *Toxicol. Lett.* **230**, 375–381 (2014).
53. Darbre, P. D. & Harvey, P. W. Paraben esters: Review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks. *Journal of Applied Toxicology* vol. 28 561–578 (2008).
54. Wróbel, A. M. & Gregoraszczuk, E. L. Differential effect of methyl-, butyl- and propylparaben

- and 17 β -estradiol on selected cell cycle and apoptosis gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells and MCF-10A non-malignant cells. *J. Appl. Toxicol.* **34**, 1041–1050 (2014).
55. Charles, A. K. & Darbre, P. D. Combinations of parabens at concentrations measured in human breast tissue can increase proliferation of MCF-7 human breast cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 390–398 (2013).
 56. Barr, L., Metaxas, G., Harbach, C. A. J., Savoy, L. A. & Darbre, P. D. Measurement of paraben concentrations in human breast tissue at serial locations across the breast from axilla to sternum. *J. Appl. Toxicol.* **32**, 219–232 (2012).
 57. Vela-Soria, F. *et al.* A new treatment by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of parabens in human serum samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 7259–7267 (2013).
 58. Azzouz, A., Rascón, A. J. & Ballesteros, E. Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **119**, 16–26 (2016).
 59. Carrasco-Correa, E. J., Vela-Soria, F., Ballesteros, O., Ramis-Ramos, G. & Herrero-Martínez, J. M. Sensitive determination of parabens in human urine and serum using methacrylate monoliths and reversed-phase capillary liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1379**, 65–73 (2015).
 60. Ye, X., Wong, L. Y., Jia, L. T., Needham, L. L. & Calafat, A. M. Stability of the conjugated species of environmental phenols and parabens in human serum. *Environ. Int.* **35**, 1160–1163 (2009).
 61. Karageorgou, E., Manousi, N., Samanidou, V., Kabir, A. & Furton, K. G. Fabric phase sorptive extraction for the fast isolation of sulfonamides residues from raw milk followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Food Chem.* **196**, 428–436 (2016).