



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

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ
ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ
(FPSE-HPLC) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ PARABENS ΣΕ
ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ

Άνθη Παρλά

Φαρμακοποιός, Ε.Κ.Π.Α.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αθήνα, 2020

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Παντερή Ειρήνη Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα)

Λουκάς Ιωάννης Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ντότσικας Ιωάννης Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο Σεπτέμβριος 2019 – Σεπτέμβριος 2020, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος διπλώματος ειδίκευσης «Φαρμακευτική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας» του Τμήματος Φαρμακευτικής. Με την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν, ο καθένας με τον τρόπο του, στην άρτια διεκπεραίωσή της.

Επομένως, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα αυτής της διπλωματικής εργασίας, Καθηγήτρια κα Ειρήνη Παντερή, η οποία με στήριξε από την πρώτη στιγμή, μου έδωσε την ευκαιρία και τη δυνατότητα να συνεργαστώ μαζί της και είναι στο πλευρό μου όλα αυτά τα χρόνια. Την ευχαριστώ για την καθοδήγηση, τη συμπαράσταση, την υπομονή καθώς και τις γνώσεις που μου παρείχε.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Αναπλ. Καθηγητές κ.κ. Ιωάννη Λουκά και Ιωάννη Ντότσικα για τη διόρθωση της παρούσας εργασίας και για τις εύστοχες παρατηρήσεις τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Καθηγήτρια του Τμήματος Χημείας του Α.Π.Θ κα Βικτωρία Σαμανίδου, για την άριστη συνεργασία που είχαμε στο πειραματικό μέρος.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά, όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές, υποψήφιους διδάκτορες και μεταδιδάκτορες, που ήταν μαζί μου στο εργαστήριο για την άριστη συνεργασία που είχαμε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Όλοι λένε ότι αυτό που μετράει είναι το ταξίδι και όχι ο προορισμός. Για εμένα αυτό που μετράει είναι η παρέα σε όλη αυτή τη διαδρομή. Για αυτό το λόγο θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου που κάνουν όλο αυτό το ταξίδι ευχάριστο και που είναι πάντα δίπλα μου να με στηρίζουν και να με ενθαρρύνουν. Τελειώνοντας θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με βοηθούν να πραγματοποιώ κάθε στόχο και όνειρό μου, την οικογένειά μου, στην οποία οφείλω τα πάντα και χωρίς αυτούς τίποτα δεν θα ήταν εφικτό.

Αθήνα, Νοέμβριος 2020

"Η έγκριση διατριβής ειδίκευσης από το Φαρμακευτικό Τμήμα του Πανεπιστημίου Αθηνών, δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα."

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	8
ABSTRACT.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	11
Υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)	11
1.2 Χρωματογραφία με μηχανισμό κατανομής (partition chromatography)	12
1.3 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.....	13
1.2 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.....	14
1.3 Επίδραση του pH της κινητής φάσης.....	15
1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας	15
1.5 Σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις	16
1.6 Οργανολογία	16
1.6.1 Ανιχνευτές.....	17
1.6.1.1 Ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis).....	17
1.6.1.2 Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος	19
1.7 Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού.....	20
1.8 Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού [1]	21
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	23
Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE).....	23
3.1 Εισαγωγή.....	23
3.2 Στάδια της FPSE.....	24
3.3 Πλεονεκτήματα της τεχνικής FPSE.....	25
3.4 Σημασία του πορώδους υποστρώματος	26
3.4.1 Υπόστρωμα κυτταρίνης.....	27
3.5 Sol-gel επικάλυψη στο μέσο FPSE	27
3.6 Προετοιμασία του μέσου FPSE	29
3.6.1 Προετοιμασία του υφασμάτινου υποστρώματος	29
3.6.2 Προετοιμασία του κολλοειδούς διαλύματος για τη διαδικασία sol-gel επίστρωσης.....	30
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ενδοκρινικοί διαταράκτες	30
4.1 Ενδοκρινικό σύστημα.....	30

4.2 Μηχανισμός δράσης	31
4.3 Πηγές έκθεσης.....	32
4.4 Επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία.....	33
4.5 Parabens.....	33
4.5.2 Ιδιότητες.....	35
4.5.3 Αντιμικροβιακή δράση.....	36
4.5.4 Πηγές των parabens	36
4.5.4.1 Τρόφιμα	36
4.5.4.2 Προϊόντα προσωπικής φροντίδας.....	36
4.5.4.3 Φαρμακευτικά προϊόντα	37
4.6 Απορρόφηση, Μεταβολισμός, Απέκκριση.....	37
4.7 Ενδοκρινικές και άλλες επιδράσεις της χρήσης των parabens στην ανθρώπινη φυσιολογία	39
4.7.1 Οιστρογονική δράση των parabens και του κύριου μεταβολίτη τους ΡΗΒΑ	39
4.7.2 Αντιανδρογόνο δράση και αναπαραγωγικές διαταραχές.....	41
4.7.3 Parabens και καρκίνος του δέρματος.....	41
4.8 Νομοθεσία	42
Κεφάλαιο 6	44
ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (FPSE-HPLC) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ.....	44
6.1 Εισαγωγή και σκοπός της εργασίας	44
6.2 Εξοπλισμός-Οργανολογία	49
6.2.1 Σύστημα HPLC-UV.....	49
6.3 Αντιδραστήρια-Διαλύτες.....	49
6.2 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας.....	50
6.2.1 Διαλύματα παρακαταθήκης.....	50
6.2.2 Μεικτά διαλύματα παρακαταθήκης.....	50
6.2.3 Μεικτά διαλύματα εργασίας	51
6.2.4 Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος	51
6.3 Ανάπτυξη της μεθόδου.....	53
6.3.1 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών συνθηκών	53
6.3.1.1 Επιλογή στατικής φάσης.....	56

6.3.1.2 Επιλογή κινητής φάσης.....	58
6.4 Ανάπτυξη της τεχνικής προκατεργασίας δείγματος.....	66
6.4.2.1 Επιλογή του είδους του προσροφητικού μέσου FPSE.....	67
6.4.2.2 Βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης.....	69
6.4.2.3 Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκπλυσης του προσροφητικού μέσου.....	72
6.4.2.4 Επιλογή διαλύτη έκλουσης.....	73
6.4.2.5 Βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής του εκλούσματος.....	74
6.6 Σύγκριση FPSE με κατακρήμνιση πρωτεϊνών (PP).....	80
6.7 Αξιολόγηση μεθόδου.....	82
6.7.1 Έλεγχος γραμμικότητας – καμπύλες αναφοράς.....	82
6.7.2 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας.....	92
6.7.3 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης.....	95
6.9 Συμπεράσματα.....	95
Βιβλιογραφία.....	97

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (FPSE-HPLC) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ

Τα συντηρητικά είναι απαραίτητα προκειμένου να μην αλλοιωθούν οι ιδιότητες των προϊόντων κατά το διάστημα αποθήκευσής τους και ώστε να έχουν και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Χωρίς συντηρητικά, τα περισσότερα φάρμακα, καλλυντικά ή και τρόφιμα θα έπρεπε να διατηρούνται στο ψυγείο προκειμένου η διάρκεια ζωής τους να είναι 1-2 εβδομάδες. Τα parabens χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά σε φάρμακα, καλλυντικά και τρόφιμα χάρη στο ευρύ αντιμικροβιακό τους φάσμα, στο ουδέτερο pH τους και στο γεγονός ότι είναι άχρωμα και άοσμα. 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. Ορισμένα από αυτά έχουν ενοχοποιηθεί ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs), καθώς μεταβάλλουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος. Η παρατεταμένη χρήση τους έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για την αξιολόγηση της ανθρώπινης έκθεσης στις ενώσεις αυτές. Επομένως είναι αναγκαία η ανάπτυξη βιοαναλυτικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των parabens σε βιολογικά υγρά.

Στην εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό μιας ομάδας ενώσεων parabens σε ανθρώπινο πλάσμα. Λόγω των χαμηλών επιπέδων των αναλυτών στο ανθρώπινο πλάσμα ήταν αναγκαία η προκατεργασία με τεχνική, η οποία θα συνδυάζει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Για το σκοπό αυτό τα δείγματα του πλάσματος, κατεργάζονται με την τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE). Η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο είναι μια νέα, πολλά υποσχόμενη τεχνική προκατεργασίας βιολογικού δείγματος η οποία επιστρατεύει την τεχνολογία επικάλυψης λύματος-πηκτής. Αρχικά 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 (ανθρώπινο πλάσμα), 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 παρεμποδίσεις από το υλικό μήτρας. Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητάς της, και εφαρμόστηκε με επιτυχία στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ, ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ, ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ, PARABENS, FPSE

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A NEW FPSE-HPLC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF SEVERAL PARABENS IN HUMAN PLASMA

Parabens are widely used to prolong the shelf life of foods, daily care products, and pharmaceutical preparations. These compounds are preservatives that exhibit a broad range of antimicrobial activity and chemical stability without imparting any taste or odor. The combination of these properties makes it relatively difficult to find a preservative, which will be a satisfactory replacement for parabens. Several studies revealed that they are absorbed through the skin and they can also enter the human body when pharmaceuticals or foods are swallowed or eaten. Research suggests that several parabens, have endocrine disrupting effects and they suspected to cause various health effects. Thus, there is an urgent need for the development of novel bioanalytical methods for the biomonitoring of these compounds.

In this study a novel fabric phase sorptive extraction-high performance liquid chromatography method (FPSE-HPLC) has been developed and validated for the quantification of parabens in human plasma. FPSE utilizes a natural or synthetic permeable and flexible fabric substrate chemically coated with a sol-gel organic-inorganic hybrid sorbent in the form of ultra-thin coating. Chromatographic separation was performed on a Spherisorb ODS1 C18 analytical column with isocratic elution using acetonitrile as solvent A and 49.2 mM ammonium formate buffer as solvent B at a flow rate of 0,25 mL min⁻¹. The assay was linear over a concentration range of 20 to 500 ng mL⁻¹ for all the analytes. A run time of less than 30 min for each sample made it possible to analyze many biological samples per day.

KEYWORDS: HPLC; BIOANALYSIS; HUMAN PLASMA, PARABENS, FPSE

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης (RP-HPLC)

1.1. Εισαγωγή

Ο Ρώσος βοτανολόγος Michael Tswett επιτυγχάνει το 1906 το διαχωρισμό μίγματος χλωροφυλλών σε στήλη CaCO_3 με διαλύτη πετρελαϊκό αιθέρα. Για πρώτη φορά τότε εμφανίζεται ο όρος χρωματογραφία. Κατά περίεργο τρόπο η ανακάλυψη του Tswett παρέμεινε ξεχασμένη περίπου 25 χρόνια, μέχρι τη στιγμή που οι βιοχημικοί Kuhh και Lederer ασχολήθηκαν με τη βελτίωση της αρχικής τεχνικής. Ενώ γύρω στο 1941 οι Martin και Synge υποστήριξαν την άποψη ότι η στατική φάση πρέπει να αποτελείται από πολύ μικρά σωματίδια και, ταυτόχρονα, να εφαρμόζεται υψηλή πίεση για να εξαναγκάσει την κινητή φάση να διέρχεται από τη στήλη. Για το λόγο αυτό η τεχνική αναφέρθηκε αρχικά ως υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography) με το αρκτικόλεξο HPLC. Επιπλέον, επειδή με την τεχνική αυτή επιτυγχάνονται γρήγοροι διαχωρισμοί και αναλύσεις, αναφέρθηκε και ως υγροχρωματογραφία υψηλής ταχύτητας (High Speed Liquid Chromatography, HSLC).

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού η οποία χρησιμοποιείται στην ανάλυση μίγματος ουσιών. Η ταχύτητα, η απόδοση καθώς και το ευρύ φάσμα εφαρμογής της την καθιστούν ένα χρήσιμο εργαλείο στην ανάλυση [1]. Από το 1937 μέχρι το 1972 έχουν απονεμηθεί συνολικά 12 βραβεία Νόμπελ στα οποία η τεχνική HPLC είχε κυρίαρχο ρόλο.

Η HPLC χρησιμοποιείται στην ανάλυση μίγματος αναλυτών παρέχοντας άμεσα τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό κάθε αναλύτη χωριστά, ο οποίος διαθέτει το δικό του χρόνο συγκράτησης και τη δική του χαρακτηριστική κορυφή. Την ιδιότητα αυτή εκμεταλλευόμαστε στη φαρμακευτική ανάλυση και στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων που περιέχουν τους αναλύτες, τα χορηγούμενα φάρμακα και τους μεταβολίτες τους, σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα η τεχνική αυτή να κατακτήσει την πρώτη θέση στις ενόργανες τεχνικές ανάλυσης.

Η εξέλιξη της τεχνικής HPLC στηρίχθηκε κυρίως στην ανάπτυξη πληρωτικών υλικών μεγάλης αποτελεσματικότητας. Στις μέρες χρησιμοποιούνται πληρωτικά υλικά με πολύ μικρές διαστάσεις σωματιδίων (2-10 μm) και κατασκευάζονται στήλες υψηλής απόδοσης. Ένα από τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα πληρωτικά υλικά είναι η πηκτή πυριτίας. Το υλικό αυτό έχει μεγάλη πολικότητα και αποτελεί τη βάση για την υγρή χρωματογραφία προσρόφησης. Με κατάλληλες τροποποιήσεις μειώνεται η πολικότητά της και προκύπτουν οι χημικά συνδεδεμένες στατικές φάσεις οι οποίες αποτελούν τη βάση της υγροχρωματογραφίας κατανομής. Μερικά από τα καθοριστικά για την ανάλυση χαρακτηριστικά της πηκτής πυριτίας είναι το εύρος των πόρων (>5 nm), η ολική έκταση επιφάνειας (μετράται σε $m^2 g^{-1}$), η διανομή του εύρους των πόρων (μικρές τιμές της οποίας χαρακτηρίζονται απαραίτητες για συμμετρικές κορυφές), η πυκνότητα και το σχήμα των σωματιδίων του πληρωτικού υλικού.

1.2 Χρωματογραφία με μηχανισμό κατανομής (partition chromatography)

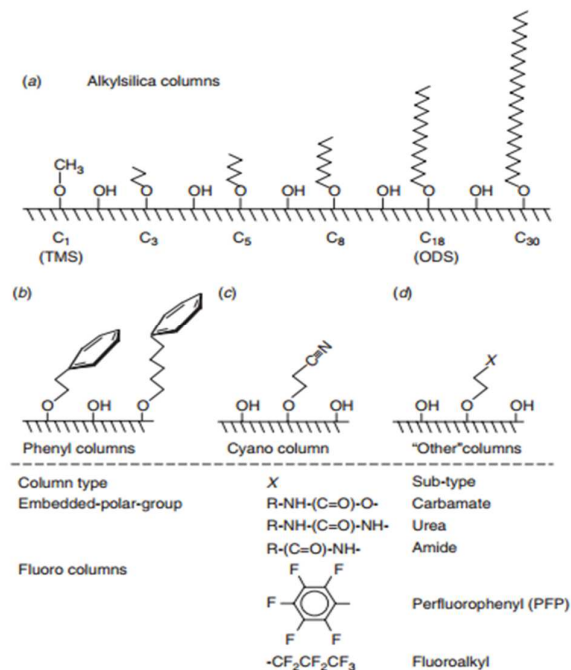
Η υγροχρωματογραφία κατανομής διακρίνεται σε δύο υποομάδες, τη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού και τη χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένης φάσης. Στη χρωματογραφία κατανομής υγρού-υγρού, η υγρή στατική φάση περιβάλλει με μορφή λεπτής στιβάδας ένα στερεό αδρανές υπόστρωμα. Τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται μεταξύ των δύο υγρών φάσεων, στατικής και κινητής οι οποίες δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Στη χρωματογραφία χημικά συνδεδεμένης φάσης, η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης και τα συστατικά ενός μίγματος κατανέμονται μεταξύ της στερεής στατικής φάσης και της υγρής κινητής φάσης [1].

Η χρωματογραφία κατανομής διακρίνεται στη χρωματογραφία κανονικής (NP-HPLC) και αντίστροφης (RP-HPLC) φάσης. Η υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης αποτελεί συνήθως πρώτη επιλογή για την ανάλυση δειγμάτων. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση και έτσι εκλούνται πρώτα οι αναλύτες που είναι περισσότερο πολικοί, καθώς αυτοί είναι περισσότερο διαλυτοί στην κινητή φάση [2] [3].

Ο χρόνος συγκράτησης αυξάνεται με την αύξηση του αριθμού των ανθράκων. Ενώσεις με αλειφατικό τμήμα σε ευθεία αλυσίδα εκλούνται νωρίτερα από τα κανονικά τους ισομερή. Συγκρατούνται περισσότερο στη στατική φάση τα λιγότερο πολικά συστατικά. Η συγκράτηση μειώνεται με την ακόλουθη σειρά: αλειφατικές ενώσεις > ενώσεις επαγωγής διπόλων > ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή > ενώσεις ασθενείς βάσεις κατά Lewis (αιθέρες, αλδεΐδες, κετόνες) > ενώσεις ισχυρές βάσεις κατά Lewis (αμίνες) > ενώσεις ασθενή οξέα κατά Lewis (αλκοόλες, φαινόλες) > ενώσεις ισχυρά οξέα κατά Lewis (καρβοξυλικά οξέα) [4].

1.3 Στατικές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

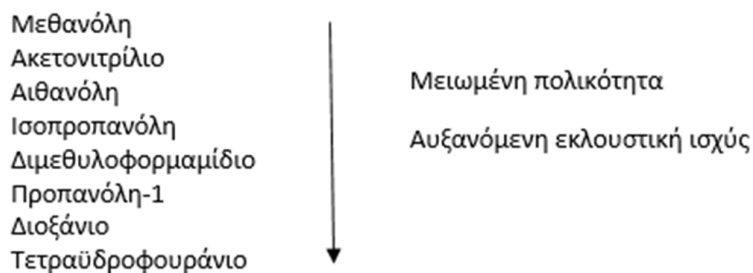
Η εισαγωγή των χημικά τροποποιημένων στατικών φάσεων είχε αξιοσημείωτο αντίκτυπο στην υδροχρωματογραφία. Συνήθως τα πληρωτικά υλικά έχουν ως υπόστρωμα την πηκτή πυριτίας, η οποία φέρει στην επιφάνειά της ομάδες σιλανόλης και μέσω αυτών μπορεί να τροποποιηθεί χημικά σχηματίζοντας έτσι χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη στατική φάση είναι η ODS C18 η οποία φέρει υποκαταστάτες $-(CH_2)_{17}CH_3$. Άλλες εναλλακτικές αποτελούν οι ODS C8 και μικρότερες αλυσίδες αλκυλίων, ομάδες φαινυλίου, ομάδες νιτριλίου και που φαίνονται στο Σχήμα 1.0 [5]



Σχήμα 1.1 Παράδειγματα στατικών φάσεων αντίστροφης φάσης, ΠΗΓΗ:βιβλιογραφική αναφορά 5

1.2 Κινητές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Οι κινητές φάσεις στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αποτελούνται από μίγματα νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος με διάφορους οργανικούς διαλύτες Σχήμα 1.1 οι οποίοι αναμειγνύονται με το νερό. Οι οργανικοί διαλύτες οι οποίοι χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι υψηλής καθαρότητας.



Σχήμα 1.2 Οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση. ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 4

Τα μίγματα νερού με οργανικό διαλύτη έχουν μεγαλύτερο ιξώδες από ότι το νερό και ο οργανικός διαλύτης από μόνα τους. Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιούνται

πιο πολύ στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο και το τετραυδροφουράνιο, με τη μεθανόλη να έχει το μεγαλύτερο ιξώδες και το ακετονιτρίλιο το χαμηλότερο. Η πίεση της στήλης είναι ανάλογη με το ιξώδες.

Σε αρκετές περιπτώσεις δεν συνίσταται η χρήση κινητής φάσης με λιγότερο από 10% οργανικού τροποποιητή γιατί σε αυτές τις περιπτώσεις οι αλυσίδες αλκυλίου βρίσκονται σε κακή διμόρφωση και καθυστερεί να γίνει η εξισορρόπηση της στήλης.

Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης το νερό δεν μπορεί να αλληλεπιδράσει με τις μη πολικές ομάδες της στατικής φάσης. Για αυτό το νερό θεωρείται ότι έχει τη χαμηλότερη εκλουστική ισχύ από τους υπόλοιπους διαλύτες. Όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό νερού στην κινητή φάση τόσο μεγαλύτεροι είναι οι χρόνοι συγκράτησης των αναλυτών. [2]

1.3 Επίδραση του pH της κινητής φάσης

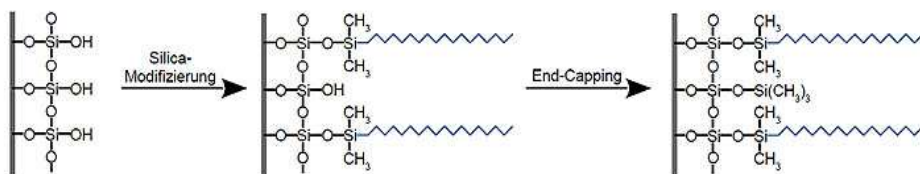
Το pH της κινητής φάσης επηρεάζει τη συγκράτηση των όξινων και βασικών ενώσεων. Προκειμένου να παρασκευαστούν κινητές φάσεις συγκεκριμένου pH χρησιμοποιούνται ρυθμιστικά διαλύματα. Η επίδραση του pH στο χρόνο συγκράτησης των αναλυτών είναι εντονότερη σε τιμή $pH \pm 1$ από την τιμή pK_a , όπου είναι εντονότερη η μεταβολή του βαθμού ιοντισμού του κάθε αναλύτη. Μείωση της τιμής του pH της κινητής φάσης αυξάνει τη συγκράτηση όξινων αναλυτών και μειώνει τη συγκράτηση βασικών αναλυτών. Αύξηση του ιοντισμού προκαλεί γρηγορότερη έκλυση.

1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η αύξηση της θερμοκρασίας στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης αυξάνει την αποδοτικότητα της στήλης λόγω μείωσης του ιξώδους της κινητής φάσης. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει το βαθμό διαχωρισμού των αναλυτών και να οδηγήσει σε ανώμαλη συμπεριφορά συγκράτησής τους. Με αύξηση της θερμοκρασίας υπάρχει πιθανότητα διάσπασης των αναλυτών ή των διαλυτών.

1.5 Σιλανόφιλες αλληλεπιδράσεις

Βασικοί αναλύτες μπορούν να αντιδράσουν με τα ελεύθερα υδροξύλια που μπορεί να υπάρχουν στη στατική φάση. Αυτό πιθανόν να οδηγήσει σε αυξημένο χρόνο συγκράτησης των αναλυτών και ασυμμετρία κορυφών. Αυτό μπορεί να επιλυθεί με προσθήκη αμινών στη κινητή φάση ή με τη διαδικασία ακροκάλυψης κατά την παρασκευή των στατικών φάσεων. Κατά τη διαδικασία ακροκάλυψης εξουδετερώνονται τα ελεύθερα υδροξύλια της πηκτής πυριτίας με παραγωγοποίηση με κάποιο δραστικό και ευκίνητο αντιδραστήριο παρόμοιας χημικής φύσης συνήθως χλωροτριμεθυλοσιλάνιο Σχήμα 1.2



Σχήμα 1.3 Χημικά τροποποιημένη πηκτή πυριτίας με ακροκάλυψη

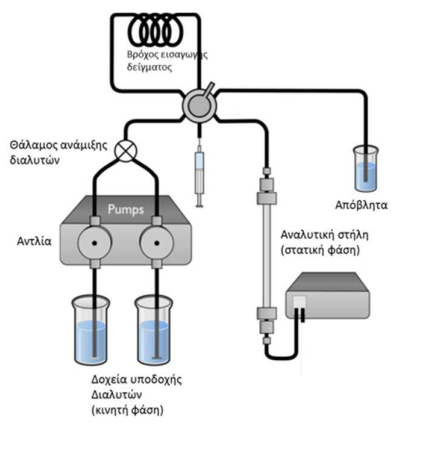
1.6 Οργανολογία

Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται ένα χρωματογραφικό σύστημα είναι τα ακόλουθα (σχήμα 1.4):

- Αντλία ισοκρατικής ή βαθμιδωτής έκλουσης η οποία διοχετεύει με ακρίβεια καθορισμένη ροή κινητής φάσης στη χρωματογραφική στήλη.
- Σύστημα έγχυσης δείγματος.
- Χρωματογραφική στήλη που περιέχει τη στατική φάση.
- Ανιχνευτής ο οποίος ανιχνεύει τους αναλύτες μετά τη δίοδο τους από τη χρωματογραφική στήλη.
- Η/Υ ο οποίος ρυθμίζει με το κατάλληλο λογισμικό όλη τη λειτουργία του συστήματος HPLC.

Κατά τη σύνδεση των τμημάτων αυτών μεταξύ τους λαμβάνεται μέριμνα για την ελαχιστοποίηση των “νεκρών όγκων” μεταξύ βαλβίδας εισαγωγής δείγματος και

εισόδου της στήλης και μεταξύ εξόδου της στήλης και ανιχνευτή, ώστε να μειώνεται η διεύρυνση των ζωνών των αναλυτών και να αυξάνεται η διαχωριστικότητα.



Σχήμα 1.4 Σχηματικό διάγραμμα συσκευής HPLC βαθμιδωτής έκλουσης.

1.6.1 Ανιχνευτές

1.6.1.1 Ανιχνευτής υπεριώδους-ορατού (UV-Vis)

Οι ανιχνευτές είναι τα όργανα που κάνουν ορατό τον διαχωρισμό που γίνεται στη στήλη και επιτρέπουν την αξιοποίησή του στην ανάλυση. Μετράνε την αλλαγή μιας φυσικοχημικής ιδιότητας των αναλυόμενων συστατικών και την μετατρέπουν σε ηλεκτρικό σήμα. Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας ιδανικός ανιχνευτής για την HPLC είναι:

- Αποκρίνεται σε όλα τα συστατικά του μείγματος (γενικός ανιχνευτής) ή να έχει γνωστή εκλεκτικότητα αποκρίσεως (ειδικός ανιχνευτής)
- Επιτρέπει χαμηλά όρια ανίχνευσης (ng-μg)
- Να μην αποκρίνεται στην κινητή φάση
- Παρέχει γραμμική απόκριση στην περιοχή συγκεντρώσεων των διαχωριζόμενων συστατικών (χρήση στην ποσοτική ανάλυση)
- Να μην επηρεάζεται από μεταβολές θερμοκρασίας και ταχύτητας ροής κινητής φάσης

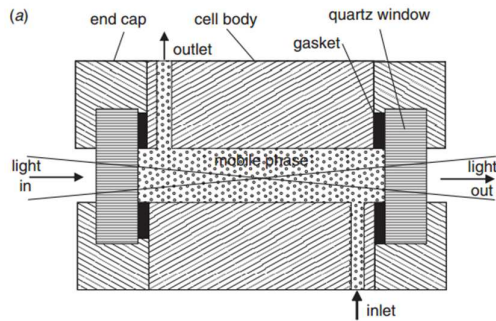
- Έχει αμελητέο νεκρό όγκο, δεν συμμετέχει στη διεύρυνση ζώνης συστατικών και της κορυφής του

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι ανιχνευτές στην HPLC είναι οι ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν. Έχουν υψηλή ευαισθησία και τα δείγματα πρέπει να απορροφούν στην περιοχή υπεριώδους-ορατού (190-600 nm). Αποκρίνεται σε μεγάλο αριθμό οργανικών ενώσεων. Οι ανιχνευτές UV-Vis δεν επηρεάζονται από μεταβολές της ροής και της θερμοκρασίας. Πλέον υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμοι ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού με απορρόφηση >2 μονάδων AUFs και θόρυβο < 1×10^{-5} AU, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων αναλυτών της τάξης των νανογραμμαρίων. Το μεγάλο εύρος των ανιχνευτών $\approx 10^5$ καθιστά δυνατό τον ποσοτικό προσδιορισμό τόσο ιχνοποσοτήτων όσο και κύριων συστατικών στο ίδιο χρωματογράφημα.

Υπάρχουν τέσσερα είδη ανιχνευτή UV-Vis :

1. Σταθερού μήκους κύματος, ο οποίος μετράει απορρόφηση σε σταθερό μήκος κύματος της ακτινοβολίας UV συνήθως στα 254 nm.
2. Πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος. Με τη βοήθεια φίλτρων υπάρχει η δυνατότητα επιλογής περισσότερων μηκών κύματος UV-Vis.
3. Μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. Πλήρες φασματοφωτόμετρο με μονοχρωμάτορα για την επιλογή οποιουδήποτε μήκους κύματος στο UV-Vis.
4. Σειράς φωτοδιόδων (PDA), ο οποίος παρέχει τη δυνατότητα λήψης φάσματος απορρόφησης κάθε εξερχόμενου συστατικού και δυνατότητα προσδιορισμού καθαρότητας κορυφής (peak purity).

Η απορρόφηση υπολογίζεται από τον νόμο του Beer $A = \log(I_0/I) = \epsilon bc$ όπου A είναι η απορρόφηση, I_0 είναι η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I η ένταση της εξερχόμενης από την κυψελίδα ακτινοβολίας, ϵ είναι η μοριακή απορροφητικότητα του αναλύτη, b είναι η διαδρομή του φωτός σε cm κατά τη διελεύσή του από την κυψελίδα και c η συγκεντρωσή σε mol/L του αναλύτη στο δείγμα. [6]

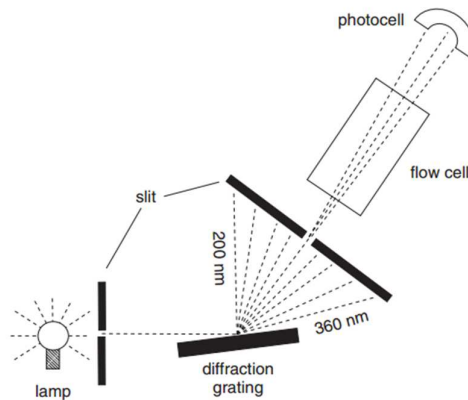


Σχήμα 1.5 Σχηματικό διάγραμμα κυψελίδας. ΠΗΓΗ:βιβλιογραφική αναφορά 5

Οι κυψελίδες αυτών των ανιχνευτών έχουν συνήθως σχήμα Z Σχήμα 2.1, με εσωτερική διάμετρο 1 mm, μήκος 10 mm και χωρητικότητα όγκου δείγματος περίπου 8 μl. Αυτός ο όγκος κυψελίδας είναι κατάλληλος για στήλες με διαστάσεις $\geq 100 \times 4.6$ mm και μέγεθος σωματιδίων ≥ 3 μm.

1.6.1.2 Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος

Αυτοί οι ανιχνευτές παρέχουν τη δυνατότητα αλλαγής του μήκους κύματος κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής διαδικασίας, επιπλέον έχουν την ευελιξία να λειτουργούν στο μήκος κύματος στο οποίο οι αναλύτες παρουσιάζουν τη μέγιστη απορρόφηση ή στο μήκος κύματος που προσφέρει τη μέγιστη εκλεκτικότητα.



Σχήμα 1.6 Ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος. ΠΗΓΗ:βιβλιογραφική αναφορά 5

Ο ανιχνευτής μεταβαλλόμενου μήκους κύματος που είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος στην HPLC απεικονίζεται στο Σχήμα 1.6. Μια λάμπα συνήθως δευτερίου ή (βολφραμίου) εκπέμπει ακτινοβολία η οποία κατευθύνεται δια μέσου μιας σχισμής πάνω σε μια επιφάνεια διαθλάσεως. Η επιφάνεια διασκορπίζει την ακτινοβολία στα μήκη κύματος που την συνιστούν και στη συνέχεια η επιφάνεια περιστρέφεται για να κατευθύνει τη δέσμη ακτινοβολίας ενός μήκους κύματος ή ενός στενού εύρους από μήκη κύματος δια μέσου της σχισμής και μετά της κυψελίδας για να φτάσει στον ανιχνευτή. [4] [5]

1.7 Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού

Εισάγουμε στη χρωματογραφική στήλη μίγμα δύο αναλυτών **A** (■) και **B** (○), σχήμα 1.7.



Σχήμα 1.7 Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού δύο αναλυτών **A** (■) και **B** (○).

Αρχικά τα συστατικά κατανέμονται στις δύο φάσεις. Η εκλεκτικότητα της στήλης εκφράζεται από το συντελεστή κατανομής.

$$K=C_s/C_m$$

όπου C_s είναι η συγκέντρωση ουσίας στη στατική φάση (stationary phase) και C_m η συγκέντρωση ουσίας στη κινητή φάση (mobile phase). Ακολουθεί η μετακίνηση των αναλυτών κατά μήκος της στήλης και τέλος διαχωρίζονται λόγω της διαφορετικής ταχύτητας μετακίνησης. Ο αναλύτης **A** βρίσκεται σε μεγαλύτερο

ποσοστό στη στατική φάση, ενώ ο αναλύτης **B** βρίσκεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στην κινητή φάση. Η νέα ισορροπία εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά των δύο αναλυτών. Ο αναλύτης **A** παραμένει στη στήλη μας περισσότερο από ότι ο αναλύτης **B**. Επομένως ο αναλύτης **B** εκλύεται πρώτος ενώ η έκλυση του αναλύτη **A** καθυστερεί λόγω της συγκράτησης του στη στατική φάση. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.7 η νέα ισορροπία αποκαθίσταται σε ένα τμήμα το οποίο αντιστοιχεί περίπου σε 3,5 μοριακές διαμέτρους της στατικής φάσης. Το εύρος της ζώνης αυτής στην οποία περιέχεται ο αναλύτης καλείται θεωρητική πλάκα. Διαιρώντας το μήκος της στήλης με το μήκος της θεωρητικής πλάκας υπολογίζουμε τον αριθμό των θεωρητικών πλακών. Γίνεται εύκολα αντιληπτό ότι αυξανόμενου του μήκους της στήλης και με σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους, αυξάνεται ο αριθμός των θεωρητικών πλακών, h , με αποτέλεσμα να έχουμε καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος.

Το ύψος, h , το ισοδύναμο με κάθε θεωρητική πλάκα παρέχεται από τη σχέση:

$$h = \frac{L}{N}$$

Η αποτελεσματικότητα στήλης συνήθως εκφράζεται ως αριθμός θεωρητικών πλακών ανά μέτρο: $n \times 100/L$, όπου L είναι το μήκος της στήλης σε cm.

Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών n για έναν αναλύτη υπολογίζεται από τη σχέση:

$$n = 5,54 \left(\frac{tR}{w_{b,1/2}} \right)^2$$

Όπου $w_{b,1/2}$ είναι το εύρος της κορυφής στο ήμισυ του ύψους της και tR είναι ο χρόνο κατακράτησης.

1.8 Πορεία χρωματογραφικού διαχωρισμού [1]

Νεκρός χρόνος, t_0 , είναι ο χρόνος στον οποίο ένας αναλύτης που δε συγκρατείται καθόλου από τη στατική φάση θα διατρέξει τη χρωματογραφική στήλη με ταχύτητα ίση με την ταχύτητα της κινητής φάσης. Ο νεκρός όγκος οφείλεται στις

σωληνώσεις που υπάρχουν ανάμεσα στο σύστημα εισαγωγής δείγματος και τον ανιχνευτή και αντιστοιχεί στον όγκο που αυτές περιέχουν.

Χρόνος κατακράτησης, t_R , ενός αναλύτη είναι ο χρόνος στον οποίο αυτός διατρέχει το μήκος της στήλης L με ταχύτητα u της κινητής φάσης.

Ο **παράγοντας χωρητικότητας** αποτελεί μέτρο της συγκράτησης ενός αναλύτη στην αναλυτική στήλη και υπολογίζεται από το λόγο της διαφοράς του νεκρού χρόνου (t_0) από το χρόνο κατακράτησης του αναλύτη (t_R) προς το νεκρό χρόνο.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Η διαφορετική συγκράτηση δύο αναλυτών με στόχο το διαχωρισμό τους αποδίδεται με τον όρο **παράγοντας εκλεκτικότητας, α** .

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} = \frac{K_2}{K_1}$$

και αποτελεί το μέτρο του διαχωρισμού δύο αναλυτών. Δηλαδή αν $\alpha = 1$ είναι προφανές ότι οι δύο κορυφές θα συμπίπτουν οπότε δε γίνεται διαχωρισμός. Επιπλέον γίνεται αντιληπτό ότι καθώς αυξάνεται ο παράγοντας εκλεκτικότητας α έχουμε και καλύτερο διαχωρισμό.

Η **διαχωριστική ικανότητα, R** , δύο γειτονικών κορυφών A και B αποτελεί μέτρο του βαθμού διαχωρισμού δύο κορυφών και ορίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$R = \frac{t_{R,B} - t_{R,A}}{0,5(w_A + w_B)} = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_A + w_B}$$

Όπου $t_{R,B}$ και $t_{R,A}$ είναι οι χρόνοι ανασχεσης των ουσιών B και A (η A εξέρχεται από τη στήλη πρώτη).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE)

3.1 Εισαγωγή

Μια πολύ σημαντική και ταυτόχρονα αναπόφευκτη διαδικασία, η οποία πρέπει να πραγματοποιείται πριν την ένεση των δειγμάτων στο όργανο είναι η προκατεργασία τους. Ειδικά σε περιπτώσεις πολύπλοκων δειγμάτων όπως είναι για παράδειγμα τα βιολογικά τα οποία περιέχουν πρωτεΐνες, λιπίδια κ.α. Άλλες τέτοιες περιπτώσεις είναι τα περιβαλλοντικά δείγματα, τα φαρμακευτικά σκευάσματα και τα τρόφιμα. Αυτά τα δείγματα δεν μπορούν να ενεθούν κατευθείαν στο αναλυτικό όργανο για τους εξής λόγους: το μητρικό υλικό μπορεί να έχει επιβλαβή επίδραση στην απόδοση του οργάνου ή να επηρεάζει την ανάλυση των προσδιοριζόμενων ουσιών, η συγκέντρωση των αναλυτών στο μητρικό υλικό μπορεί να είναι κάτω από το όριο ανίχνευσης του οργάνου και τέλος μπορεί το μητρικό υλικό να μην συμβαδίζει με το όργανο. Έτσι λοιπόν ο στόχος της κατεργασίας των δειγμάτων είναι η απελευθέρωση και η απομόνωση των αναλυτών και ο καθαρισμός των δειγμάτων έτσι ώστε αυτά να μπορούν να εισαχθούν στο όργανο για να επιτευχθεί διαχωρισμός, προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση.

Το γεγονός ότι οι κλασικές μέθοδοι κατεργασίας δειγμάτων όπως η υγρό-υγρό εκχύλιση (LLE) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) αποτελούνται από πολλά βήματα, είναι χρονοβόρες, επίπονες, χρησιμοποιούν μεγάλο όγκο τοξικών οργανικών διαλυτών και περιλαμβάνουν στάδια τα οποία είναι επιρρεπή σε σφάλματα, οδήγησε στην ανάπτυξη νέων τεχνικών μικροεκχύλισης βασισμένες στην προσρόφηση, όπως είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), η μικροεκχύλιση σε πληρωμένη σύριγγα (MEPS), η εκχύλιση μέσω προσροφητικής ανάδευσης (SBSE) και η μαγνητική εκχύλιση στερεάς φάσης.

Τα μειονεκτήματα που εμφανίζουν οι περισσότερες τεχνικές μικροεκχύλισης οφείλονται στην τεχνολογία επικάλυψης που χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση του προσροφητικού μέσου πάνω στην επιφάνεια του υποστρώματος και στην κύρια επιφάνεια επαφής (PCSA) της συσκευής. Η κύρια επιφάνεια επαφής ορίζεται ως η

επιφάνεια του μέσου εκχύλισης η οποία έρχεται σε άμεση επαφή με το δείγμα που περιέχει τους αναλύτες κατά τη διάρκεια της διαδικασίας εκχύλισης. Με αύξηση της κύριας επιφάνειας επαφής αυξάνεται η προσροφητική ικανότητα με αποτέλεσμα να απορροφούνται περισσότεροι αναλύτες. Όσον αφορά την τεχνολογία επικάλυψης του μέσου, η επικάλυψη sol-gel (λύματος-πηκτής) είναι η πιο βολική και ευέλικτη και ο ισχυρός χημικός δεσμός ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ αυτής και του υποστρώματος οδηγεί σε υψηλή χημική σταθερότητα. Για να είναι λοιπόν γρήγορη και ευαίσθητη η τεχνική κατεργασίας πρέπει να αυξηθεί τόσο η τεχνολογία επικάλυψης όσο και η κύρια επιφάνεια επαφής.

Το 2014, ο Kabir και ο Furton ανέπτυξαν μια νέα, οικολογική, καινοτόμο και πολλά υποσχόμενη τεχνική η οποία ονομάστηκε εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (fabric phase sorptive extraction FPSE). Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ένα φυσικό ή συνθετικό υφασμάτινο μέσο ως υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό είναι χημικά επικαλυμμένο με τη μορφή μιας πολύ λεπτής επίστρωσης sol-gel οργανικό-ανόργανο υβριδικό προσροφητικό. Η επιλογή του υποστρώματος που θα χρησιμοποιηθεί είναι πολύ σημαντική καθώς καθορίζει την πολικότητα και την εκλεκτικότητα του μέσου. Το υπόστρωμα μπορεί να είναι υδρόφοβο (π.χ πολυεστέρας), υδρόφιλο (π.χ κυτταρίνη) ή συνδιασμός αυτών. Ο ισχυρός χημικός δεσμός ο οποίος σχηματίζεται μεταξύ του υποστρώματος και της επικάλυψης sol-gel προσφέρει υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα.

3.2 Στάδια της FPSE

Η προκατεργασία με FPSE ξεκινάει με την τοποθέτηση του υφασμάτινου μέσου σε ένα σύστημα διαλυτών έτσι ώστε να καθαρίσει από ανεπιθύμητα υπολείμματα ή ακαθαρσίες και αμέσως μετά ξεπλένεται με απιοντισμένο νερό για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα από οργανικούς διαλύτες. Μια ποσότητα αρχικού δείγματος που περιέχει τους αναλύτες μεταφέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο με βιδωτό κάλυμμα. Το μέσο FPSE εισάγεται στο φιαλίδιο μαζί με ένα καθαρό μαγνητάκι και το δείγμα αναδεύεται για καθορισμένο χρονικό διάστημα για βέλτιστη εκχύλιση μέχρι να πραγματοποιηθεί η προσρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Στη συνέχεια το

μέσο αφαιρείται από το φιαλίδιο εκχύλισης και βυθίζεται σε ένα άλλο φιαλίδιο το οποίο περιέχει τον διαλύτη έκλουσης. Σε αυτό το στάδιο επιτυγχάνεται έκλυση των ουσιών από το μέσο στον διαλύτη. Έπειτα το εκχύλισμα φυγοκεντρείται και διηθείται από φίλτρο για την απομάκρυνση σωματιδίων πριν εγχυθεί στο αναλυτικό όργανο. Σύμφωνα με τη διαδικασία το μέσο της FPSE πλένεται με κατάλληλο σύστημα διαλυτών, στεγνώνει σε ύαλο ωρολογίου και φυλάσσεται σε γυάλινο αεροστεγές δοχείο για μελλοντική χρήση. Μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αρκετές φορές και να εκτεθεί σε οποιοδήποτε οργανικό διαλύτη ή χημικό περιβάλλον χωρίς να επηρεάζεται η προσροφητική του ικανότητα. [7] [8] [9] [10]

3.3 Πλεονεκτήματα της τεχνικής FPSE

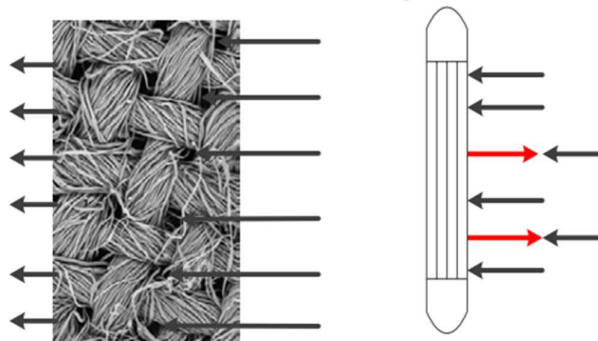
Τα πλεονεκτήματα τα οποία παρουσιάζει η μέθοδος FPSE είναι τα εξής:

- Απλή μέθοδος, χαμηλό κόστος, ελάχιστη κατανάλωση διαλυτών
- Εύκαμπτο υπόστρωμα το οποίο επιτρέπει την κάμψη, περιστροφή και συμπίεση του μέσου με αποτέλεσμα να είναι συμβατό με οποιοδήποτε τύπο δοχείου
- Αυξημένη κύρια επιφάνεια επαφής που επιτρέπει την άμεση αλληλεπίδραση προσροφητικού-αναλύτη και εξασφαλίζει γρήγορη ισορροπία στα στάδια συγκράτησης και έκλουσης των αναλυτών
- Λόγω ισχυρής ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ του υποστρώματος και της επίστρωσης δεν υπάρχει περιορισμός στην επιλογή διαλύτη έκλουσης
- Διατίθεται μεγάλη ποικιλία για επιλογή sol-gel προσροφητικού
- Υψηλή σταθερότητα σε μεγάλο εύρος pH 1-13
- Η προκατεργασία μπορεί να ολοκληρωθεί εισάγοντας απευθείας το μέσο FPSE στο δείγμα με το μητρικό υλικό, χωρίς καμία τροποποίηση του αρχικού δείγματος
- Βελτίωση της απόδοσης της τεχνικής με χρήση υπερήχων και μαγνητικής ανάδευσης
- Απλός τρόπος σχεδιασμού και σύνθεσης προσροφητικού για κάθε είδος αναλύτη

- Υψηλή ευαισθησία. Ικανότητα παραλαβής των αναλυτών σε επίπεδο συγκεντρώσεων ppt/ppb
- Ελαχιστοποίηση των σταδίων προκατεργασίας, μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης σφαλμάτων [11]

3.4 Σημασία του πορώδους υποστρώματος

Η διαπερατότητα του υποστρώματος παίζει καθοριστικό ρόλο στον ρυθμό με τον οποίο προσροφούνται οι ουσίες. Υπάρχουν δύο είδη υποστρώματος, το αδιαπέραστο και το διαπερατό τα οποία απεικονίζονται στο Σχήμα 3.2.



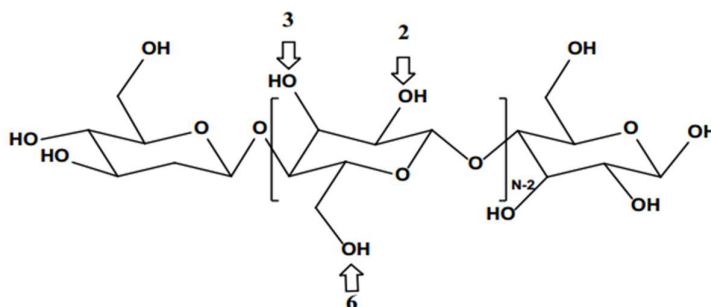
Σχήμα 3.2 Ροή δείγματος μέσω (α) διαπερατού υποστρώματος και (β) αδιαπέραστου υποστρώματος. ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 11

Από όλες τις τεχνικές μικροεκχύλισης που είναι βασισμένες στην προσρόφηση, η FPSE είναι η μόνη που χρησιμοποιεί διαπερατό υπόστρωμα το οποίο επιταχύνει την ισορροπία εκχύλισης. Με τη βοήθεια των υπερήχων ή της μαγνητικής ανάδευσης μια συνεχής ροή του δείγματος κινείται προς το υπόστρωμα και λόγω της υψηλής διαπερατότητας που έχει, το δείγμα εισέρχεται και διεισδύει σε αυτό μέσω των πόρων χωρίς καμία αντίσταση με αποτέλεσμα οι αναλύτες να αλληλεπιδρούν και να προσροφώνται σε αυτό. Κατά συνέπεια ευνοεί τον υψηλό ρυθμό μεταφοράς μάζας από το δείγμα στο προσροφητικό μέσο και αποκαθίσταται γρήγορα ισορροπία. Αντίθετα στην περίπτωση αδιαπέραστου υποστρώματος η ροή του δείγματος συναντά αντίσταση με αποτέλεσμα να επιστρέφει προς τα πίσω και να συγκρούεται με την εισερχόμενη ροή και να την απομακρύνει από το υπόστρωμα. Αυτό έχει ως

αποτέλεσμα μόνο ένα μικρό ποσοστό των αναλυτών να αλληλεπιδρά με το προσροφητικό μέσο.

3.4.1 Υπόστρωμα κυτταρίνης

Η κυτταρίνη, η χημική δομή της οποίας φαίνεται στο Σχήμα 3.3 είναι ένα υδρόφιλο γραμμικό πολυμερές β-D-γλυκοκυρανόζης.



Σχήμα 3.3 Χημική δομή κυτταρίνης με τις θέσεις όπου συμμετέχουν στο στάδιο των αντιδράσεων πολυσυμπύκνωσης κατά την επικάλυψη με sol-gel. ΠΗΓΗ : βιβλιογραφική αναφορά 11

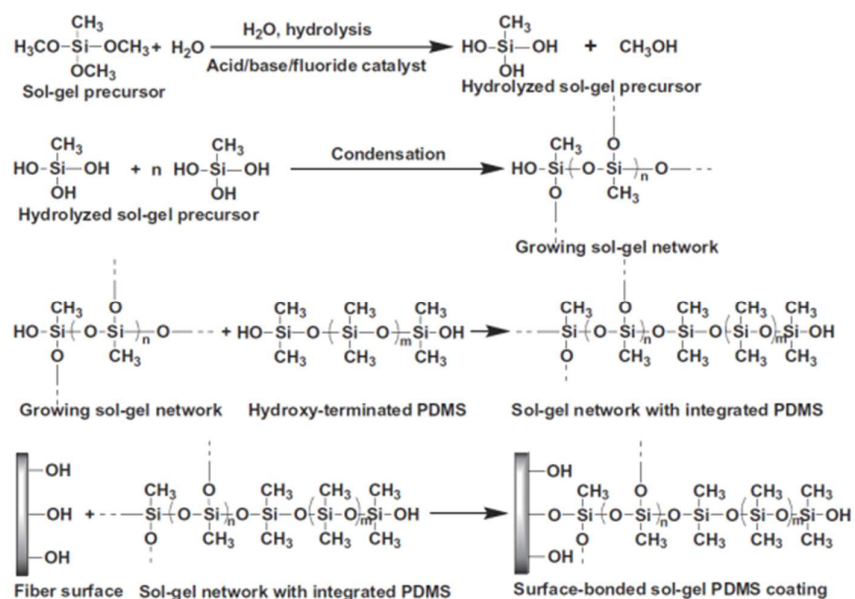
Κάθε διμερές κυτταρίνης διαθέτει τρεις λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 2, 3 και 6 οι οποίες μπορούν να συμμετέχουν στο στάδιο πολυσυμπύκνωσης κατά τη διαδικασία επικάλυψης με sol-gel. Η κυτταρίνη αποτελεί εξαιρετική επιλογή υποστρώματος για επικάλυψη με sol-gel. [12]

3.5 Sol-gel επικάλυψη στο μέσο FPSE

Η τεχνολογία sol-gel συμβάλλει στη σύνθεση νέων υλικών διαφόρων μεγεθών, σχημάτων και μορφών όπως φιλμς, ίνες και σωματίδια. Η διαδικασία επικάλυψης του υποστρώματος με sol-gel περιλαμβάνει τις πιο κάτω αντιδράσεις:

- 1) Καταλυτική υδρόλυση του πρόδρομου sol-gel
- 2) Πολυσυμπύκνωση των υδρολυμένων προϊόντων που οδηγεί σε ένα αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel
- 3) Ενσωμάτωση ενεργού οργανικού πολυμερούς στο αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel
- 4) Ακινητοποίηση του αναπτυσσόμενου δικτύου sol-gel στην επιφάνεια του υποστρώματος μέσω πολυσυμπύκνωσης

Στο Σχήμα 3.4 φαίνονται οι αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος στη σύνθεση sol-gel υβριδικού οργανικού-ανόργανου προσροφητικού.



Σχήμα 3.4 Συνθετική πορεία παρασκευής του sol-gel υβριδικού οργανικού-ανόργανου προσροφητικού μέσου. ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 13

Υπάρχει πληθώρα επιλογών οργανικά τροποποιημένων sol-gel πρόδρομων ενώσεων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο κολλοειδές διάλυμα έτσι ώστε να σχηματίζονται sol-gel προσροφητικά διαφορετικής πολικότητας. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 3.5 πολλά από αυτά τα είδη sol-gel επικάλυψης με διαφορετικές ιδιότητες το κάθε ένα προσδένονται σε υδρόφιλο ή υδρόφοβο υφασμάτινο υπόστρωμα και σχηματίζονται πολλά FPSE μέσα με διαφορετικά χαρακτηριστικά.

Sol-gel Coating	Sorbent Loading ($\text{mg}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Fabric Substrate	Polarity
PDMDPS	1.93	Cellulose/Polyester	Non-polar
C_{18}	2.4	Cellulose	Non-polar
PDMS	2.3	Cellulose	Non-polar
PTHF	3.96	Cellulose	Medium polar
PEO-PPO-PEO	5.68	Cellulose	Polar
Graphene	7.57	Cellulose	Polar
PEG-PPG-PEG	5.68	Cellulose	Polar
PEG	8.64	Cellulose	Highly polar

Σχήμα 3.6 Χαρακτηριστικά των FPSE μέσων ανάλογα με το υπόστρωμα και την sol-gel επικάλυψη.

ΠΗΓΗ: ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 13

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά των υβριδικών sol-gel οργανικών-ανόργανων προσροφητικών επηρεάζονται από:

- Το είδος και τη φύση της πρόδρομης ένωσης
- Τη συγκέντρωση και το είδος του καταλύτη
- Τη θερμοκρασία και την υγρασία κατά τη διάρκεια των αντιδράσεων
- Το είδος του οργανικού διαλύτη
- Η τιμή του pH του κolloειδούς-διαλύματος

3.6 Προετοιμασία του μέσου FPSE

Η προετοιμασία του μέσου FPSE περιλαμβάνει δύο στάδια. Το πρώτο είναι η προετοιμασία του υποστρώματος για να επικαλυφθεί με την επίστρωση sol-gel και το δεύτερο είναι ο σχεδιασμός και η προετοιμασία του κolloειδούς διαλύματος για τη δημιουργία της sol-gel επίστρωσης.

3.6.1 Προετοιμασία του υφασμάτινου υποστρώματος

Αρχικά το υφασμάτινο υπόστρωμα (κυτταρίνη ή πολυεστέρας) εμποτίζεται με απιοντισμένο νερό με τη βοήθεια υπερήχων έτσι ώστε να διαβρεχτεί πλήρως και καθαρίζεται με μεγάλη ποσότητα απιοντισμένου νερού προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα χημικών ουσιών. Αμέσως μετά γίνεται κατεργασία του υποστρώματος με NaOH 1.0 mol L⁻¹ με χρήση υπερήχων και στη συνέχεια ξεπλένεται αρκετές φορές με απιοντισμένο νερό. Ακολουθεί ξανά κατεργασία αυτή τη φορά με HCL 0.1 mol L⁻¹ με χρήση υπερήχων και ξεπλένεται με απιοντισμένο νερό. Τέλος αφήνεται για ένα βράδυ έτσι ώστε να ξηρανθεί και μετά αποθηκεύεται σε καθαρό, γυάλινο, αεροστεγές δοχείο μέχρι να επικαλυφθεί με την κατάλληλη επίστρωση sol-gel.

3.6.2 Προετοιμασία του κολλοειδούς διαλύματος για τη διαδικασία sol-gel επίστρωσης

Το κύριο βήμα στην πορεία ανάπτυξης του sol-gel προσροφητικού, είναι ο σχεδιασμός του κολλοειδούς διαλύματος καθώς η σύνθεσή του και η σχετική αναλογία των συστατικών καθορίζουν το πορώδες, την εκλεκτικότητα και ειδικότητα του sol-gel προσροφητικού που προκύπτει στο τέλος. Για ένα αποτελεσματικό sol-gel προσροφητικό πρέπει να ληφθούν υπόψη: η επιλογή του ενεργού οργανικού πολυμερούς, του πρόδρομου sol-gel, του καταλύτη, του συστήματος διαλυτών, της ποσότητας του νερού και η σωστή αναλογία των συστατικών.

Η διαδικασία επικάλυψης ολοκληρώνεται με την εισαγωγή του κατεργασμένου υφασμάτινου υποστρώματος στο φιαλίδιο που περιέχει το κολλοειδές διάλυμα. Μετά από ένα προκαθορισμένο χρονικό διάστημα επικάλυψης το ύφασμα αφαιρείται από το φιαλίδιο, ξηραίνεται και τοποθετείται σε ξηραντήρα όλο το βράδυ για να προκύψει εξάτμιση του διαλύτη και γήρανση της επικάλυψης sol-gel. Ο στόχος αυτού του βήματος είναι η ολοκλήρωση της αντίδρασης συμπύκνωσης και η αφαίρεση διαλυτών και υπολειμμάτων από το μητρικό sol-gel, διασφαλίζοντας έτσι ένα καθαρό, επιφανειακά κολλημένο sol-gel προσροφητικό χωρίς δομική παραμόρφωση και εσωτερική πίεση. Στη συνέχεια τα επικαλυμμένα μέσα FPSE ξεπλένονται για μερικά λεπτά με το κατάλληλο σύστημα διαλυτών στους υπέρηχους για να αφαιρεθούν υπολείμματα συστατικών του κολλοειδούς διαλύματος από την επικαλυμμένη επιφάνεια. Το μέσο FPSE είναι έτοιμο για μελλοντική χρήση. [13]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: Ενδοκρινικοί διαταράκτες

4.1 Ενδοκρινικό σύστημα

Ως ενδοκρινικός διαταράκτης (EDC) ορίζεται ένας εξωγενής παράγοντας ο οποίος παρεμβαίνει στη σύνθεση, τη μεταφορά, την έκκριση, το μεταβολισμό, τη δεσμευτική δράση ή την εξάλειψη των φυσικών ορμονών που υπάρχουν στο σώμα και οι οποίες είναι υπεύθυνες για ανάπτυξη, την ομοιόσταση και την αναπαραγωγή. Οι

ενδοκρινικοί διαταράκτες περιλαμβάνουν μια ποικιλία χημικών κατηγοριών μεταξύ των οποίων φυσικές και συνθετικές ορμόνες, φυτοφάρμακα, συστατικά των φυτών, ενώσεις χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία πλαστικών και σε καταναλωτικά προϊόντα και άλλα βιομηχανικά υποπροϊόντα και ρύπους. Μερικά παραδείγματα τέτοιων ουσιών είναι η δισφαινόλη Α, οι διοξίνες, τα φυτοοιστρογόνα και η τρικλοζάνη. [14]

Το ενδοκρινικό σύστημα του ανθρώπινου σώματος διαδραματίζει έναν ουσιαστικό ρόλο τόσο στη βραχυπρόθεσμη όσο και στη μακροπρόθεσμη ρύθμιση των μεταβολικών διεργασιών. Οι διατροφικές, συμπεριφορικές και αναπαραγωγικές διαδικασίες ρυθμίζονται από το ενδοκρινικό σύστημα, καθώς επίσης και η ανάπτυξη, η καρδιαγγειακή και νεφρική λειτουργία και η ανταπόκριση σε όλες τις μορφές άγχους. Διαταραχές του ενδοκρινικού συστήματος που περιλαμβάνουν αύξηση ή μείωση της έκκρισης των ορμονών οδηγεί αναπόφευκτα σε ασθένειες, οι επιπτώσεις οι οποίες μπορούν να επεκταθούν σε διάφορα όργανα και λειτουργίες και συχνά να εξασθενίζουν τον οργανισμό ή να είναι απειλητικές για τη ζωή. Από αυτή την οπτική η απειλή από περιβαλλοντικές ουσίες που παρουσιάζουν ενδοκρινική δράση είναι δυνητικά σοβαρή. Ωστόσο το γεγονός ότι ο άνθρωπος εκτίθεται σε αυτές τις χημικές ουσίες δεν σημαίνει απαραίτητα ότι κλινικά θα προκύψει κάποια διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος γιατί αυτό εξαρτάται από τα επίπεδα και τη διάρκεια της έκθεσης του οργανισμού στις ουσίες αυτές.

4.2 Μηχανισμός δράσης

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η δράση των parabens προέρχεται μέσω των πυρηνικών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων οιστρογόνων (ERs), υποδοχέων ανδρογόνων (ARs), υποδοχέων προγεστερόνης, υποδοχέων θυρεοειδούς και υποδοχέων ρετινοειδών. Σήμερα η επιστημονική έρευνα δείχνει ότι οι μηχανισμοί είναι πολύ ευρύτεροι από τους αρχικά αναγνωρισμένους. Επομένως οι ενδοκρινικοί διαταράκτες δρουν μέσω πυρηνικών υποδοχέων, μεμβρανικών υποδοχέων, νευροδιαβιβαστών, ορφανών υποδοχέων (AhR), μονοπατιών που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των στεροειδών ή / και στο μεταβολισμό, και μέσω πολλών άλλων μηχανισμών που συγκλίνουν στο ενδοκρινικό και αναπαραγωγικό σύστημα. [15]

Ένα πρόβλημα που παρουσιάζεται με τους ενδοκρινικούς διαταράκτες είναι ότι οι ουσίες αυτές είναι ποικίλες και ενδέχεται να μην εμφανίζουν ομοιότητες στα δομικά χαρακτηριστικά τους εκτός από το γεγονός ότι είναι ενώσεις με μικρή μοριακή μάζα (1000 Daltons) και αυτό καθιστά ιδιαίτερα δύσκολο να προβλεφθεί αν μια ένωση έχει τη δυνατότητα ή όχι να ασκεί ενδοκρινικές διαταραχές. Συχνά διαθέτουν ένα φαινολικό τμήμα το οποίο μάλλον μιμείται τις στεροειδείς ορμόνες και επιτρέπει στις ενώσεις αυτές να αλληλοεπιδρούν με υποδοχείς στεροειδών ορμονών είτε με αγωνιστική είτε με ανταγωνιστική δράση. Αρκετές κατηγορίες ενδοκρινικών διαταρακτών ενεργούν ως αντιανδρογόνα και ως αγωνιστές ή ανταγωνιστές υποδοχέα θυρεοειδικής ορμόνης, και πιο πρόσφατα έχουν ανιχνευθεί και ανδρογόνα EDCs.

4.3 Πηγές έκθεσης

Οι πηγές έκθεσης στους ενδοκρινικούς διαταράκτες είναι αρκετές. Οι ενώσεις αυτές απελευθερώνονται από τις βιομηχανίες σε μείγματα χημικών ουσιών και στη συνέχεια αυτά καταλήγουν στο έδαφος και στα υπόγεια ύδατα. Αυτά τα μείγματα εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και καταλήγουν στα ζώα και στους ανθρώπινους οργανισμούς. Επομένως η έκθεση σε αυτές τις ουσίες μπορεί να γίνει μέσω της κατανάλωσης νερού, εισπνοής αέρα, κατάποσης τροφής ή μέσω επαφής με το έδαφος. Άτομα που εργάζονται με φυτοφάρμακα, μυκητοκτόνα, και βιομηχανικές χημικές ουσίες διατρέχουν ιδιαίτερα υψηλό κίνδυνο για έκθεση τους στις ουσίες αυτές και επομένως για την ανάπτυξη αναπαραγωγικής ή ενδοκρινικής ανωμαλίας.

Ορισμένοι ενδοκρινικοί διαταράκτες έχουν μεγάλο χρόνο ημιζωής, πράγμα το οποίο είναι ωφέλιμο για τη βιομηχανική τους χρήση αλλά επιβλαβές για τον ανθρώπινο οργανισμό. Επειδή αυτές οι ουσίες δεν αποσυντίθενται εύκολα και μπορεί να μη μεταβολίζονται ή να μεταβολίζονται ή να διασπώνται σε πιο τοξικές ενώσεις από το μητρικό μόριο, ακόμη και ουσίες που είχαν απαγορευτεί πριν από δεκαετίες παραμένουν σε υψηλά επίπεδα στο περιβάλλον και μπορούν να ανιχνευθούν ως μέρος του σωματικού βάρους σχεδόν κάθε μεμονωμένου ζώου ή ανθρώπου. Στην πραγματικότητα, ορισμένοι ενδοκρινικοί διαταράκτες είναι ανιχνεύσιμοι σε

απομακρυσμένες αποστάσεις από την τοποθεσία που παρήχθησαν, χρησιμοποιήθηκαν ή απελευθερώθηκαν λόγω νερού και ρευμάτων αέρα και μέσω μεταναστευτικών ζώων. [16]

4.4 Επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία

Γενικά υπάρχει η ανησυχία ότι οι ενδοκρινικοί διαταράκτες μπορεί να προκαλέσουν: προβλήματα σχετικά με το αναπαραγωγικό σύστημα, ενδομητρίωση, πρόωρη εφηβεία, θέματα με τη λειτουργία του νευρικού και ανοσοποιητικού συστήματος και καρκίνο (μαστού, θυρεοειδή, προστάτη) [17].

4.5 Parabens

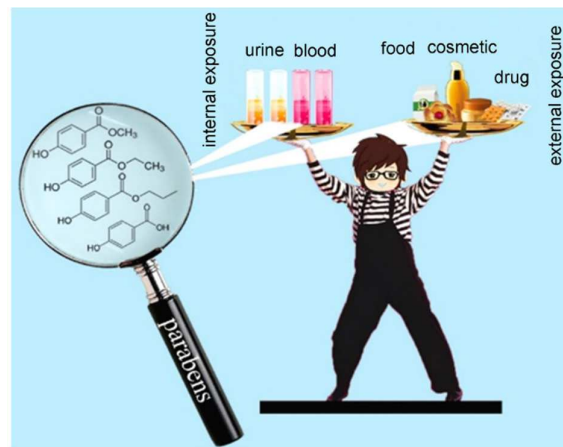
4.5.1 Εισαγωγή

Τα parabens χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά σε φάρμακα, καλλυντικά και τρόφιμα χάρη στο ευρύ αντιμικροβιακό τους φάσμα, στο ουδέτερο pH τους και στο γεγονός ότι είναι άχρωμα και άοσμα. Τα συντηρητικά είναι απαραίτητα προκειμένου να μην αλλοιωθούν οι ιδιότητες των προϊόντων κατά το διάστημα αποθήκευσής τους και ώστε να έχουν και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής. Χωρίς συντηρητικά, τα περισσότερα φάρμακα, καλλυντικά ή και τρόφιμα θα έπρεπε να διατηρούνται στο ψυγείο προκειμένου η διάρκεια ζωής τους να είναι 1-2 εβδομάδες.

Στα τέλη του 2000 οι ενώσεις αυτές άρχισαν να εγείρουν προβληματισμούς, καθώς βρέθηκε ότι έχουν οιστρογονική δράση [18], ενώ η ανίχνευσή τους σε όγκους ανθρώπινου μαστού πυροδότησε μια σειρά από αναφορές που έθεσαν σε αμφιβολία την ασφάλειά τους. Ορισμένα από αυτά έχουν ενοχοποιηθεί ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs), καθώς μεταβάλλουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος.

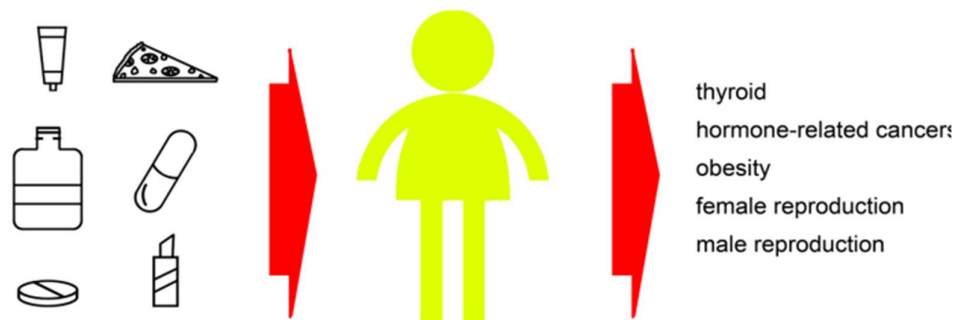
Τα parabens (PBs) αποτελούν μια ομάδα ουσιών, τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά κυρίως σε προϊόντα προσωπικής φροντίδας, σε τρόφιμα και σε φαρμακευτικά προϊόντα. Η χρήση των συντηρητικών είναι απαραίτητη, καθώς χωρίς αυτά, τα προϊόντα εμφανίζουν γρήγορα μούχλα, μύκητες και βακτήρια με

αποτέλεσμα την αλλοίωσή τους αλλά και τον αυξημένο κίνδυνο να προκαλέσουν μόλυνση.



Σχήμα 4.1 Πηγές των parabens ΠΗΓΗ: Progress in Chemistry **2015**, 27(5,) 614-622

Μετά από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί παρατηρήθηκε ότι οξεία ή χρόνια έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στις ουσίες αυτές ενδέχεται να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη φυσιολογία, σχήμα 4.2.



Σχήμα 4.2 Ενδοκρινικές επιδράσεις των parabens στον ανθρώπινο οργανισμό. ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 19

Ορισμένες από τις ενώσεις αυτές έχουν ενοχοποιηθεί ότι εμφανίζουν ενδοκρινικές επιδράσεις και λειτουργούν ως ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDs) παρεμβαίνοντας στη σύνθεση, έκκριση, μεταφορά, δέσμευση, δράση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της ομοιόστασης, της αναπαραγωγής και της ανάπτυξης.

4.5.2 Ιδιότητες

Τα parabens είναι εστέρες του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος (pHBA) που διαφέρουν ως προς τον υποκαταστάτη της para- θέσης του βενζοϊκού δακτυλίου. Τα πιο γνωστά είναι τα methyl paraben (MPB), ethyl paraben (EPB), propyl paraben (PPB), isopropyl paraben (iPPB), butyl paraben (BPB), isobutyl paraben (iBPB) και benzyl paraben (BzPB). Αυτά που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι το methyl paraben και το propyl paraben και συνήθως συνυπάρχουν στα προϊόντα.

Η συνθετική πορεία παρασκευής των parabens περιλαμβάνει την εστεροποίηση του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος με την κατάλληλη αλκοόλη παρουσία κάποιου καταλύτη (συνήθως πυκνό H₂SO₄). Σε όξινα υδατικά διαλύματα είναι σταθερά ενώ σε αλκαλικά διαλύματα υδρολύονται σε p-υδροξυβενζοϊκό οξύ και την αντίστοιχη αλκοόλη. Σε καθαρή μορφή είναι μικροί λευκοί κρύσταλλοι χωρίς οσμή και χωρίς γεύση, σταθεροί σε συνθήκες περιβάλλοντος. Η διαλυτότητα και το φάσμα της αντιμικροβιακής δράσης των parabens εξαρτώνται από το χημικό υποκαταστάτη στην p- θέση του βενζοϊκού δακτυλίου. Όταν αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του υποκαταστάτη τότε μειώνεται η διαλυτότητά τους στο νερό. Η αντιμικροβιακή τους δράση είναι ανάλογη με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και για παράδειγμα το butyl paraben έχει τέσσερις φορές μεγαλύτερη ικανότητα να αναστέλλει την ανάπτυξη μικροβίων από ότι το ethyl paraben [19] [20].

Οι ιδιότητες που καθιστούν σημαντική τη χρήση των parabens ως συντηρητικά σε προϊόντα και έχουν αυξήσει σημαντικά τη δημοτικότητά τους είναι το ευρύ φάσμα δραστηριότητας τους έναντι μεγάλου αριθμού μικροοργανισμών, η χημική τους σταθερότητα (σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και σε τιμές pH από 4,5 έως 7,5), το ότι είναι αδρανή, ο χαμηλός βαθμός τοξικότητάς τους, το χαμηλό κόστος παραγωγής τους, η σχετική ασφάλεια κατά τη χρήση τους, δεν έχουν οσμή και γεύση, έχουν επαρκή διαλυτότητα (επιτυγχάνεται η επιθυμητή συγκέντρωσή τους στα προϊόντα) και δεν προκαλούν αλλαγές στη δομή και την εμφάνιση των προϊόντων. Ο συνδυασμός αυτών των ιδιοτήτων καθιστούν ιδιαίτερα δύσκολο να βρεθούν συντηρητικά που να μπορούν να αντικαταστήσουν τα parabens [21].

4.5.3 Αντιμικροβιακή δράση

Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των parabens οφείλεται στη διάσπαση της λιπιδικής διπλοστιβάδας, παρεμβαίνοντας έτσι στις διαδικασίες των βακτηριακών μεμβρανών και προκαλώντας τη διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών. Παρουσιάζουν εξαιρετική δράση κυρίως κατά των μυκήτων αλλά και βακτηρίων. Η αντιβακτηριακή τους δράση φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματική έναντι των gram θετικών οργανισμών. Τα parabens προκαλούν αναστολή των *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Aspergillus Niger*, *Candida Albicans* και *Staphylococcus Aureus*. Στα τελικά σκευάσματα γίνονται συνδυασμοί των parabens ανάλογα με την επιθυμητή διάρκεια ζωής και το φάσμα αντιμικροβιακής δράσης. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση συνδυασμού parabens σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ενισχύει την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα. Ο συνδυασμός που χρησιμοποιείται πιο συχνά είναι το methylparaben μαζί με το ethylparaben. Επίσης η αντιμικροβιακή τους κάλυψη ενισχύεται με το συνδυασμό τους με άλλα βιοκτόνα όπως απελευθερωτές φορμαλδεΐδης ή φαινοξυαιθανόλη [22][23].

4.5.4 Πηγές των parabens

4.5.4.1 Τρόφιμα

Η προσθήκη των parabens στα τρόφιμα γίνεται για περισσότερο από 50 χρόνια, με τη χρήση τους το τελευταίο χρονικό διάστημα να αυξάνεται για να συμπεριλάβει ακόμα πιο πολλές κατηγορίες τροφίμων. Τα συναντάμε σε λαχανικά, λίπη και έλαια, καρυκεύματα, υποκατάστατα ζάχαρης, χυμούς φρούτων, αναψυκτικά, αρτοσκευάσματα, μαρμελάδες και κονσέρβες. Τα πιο χρησιμοποιούμενα parabens στα τρόφιμα είναι το methyl- και το propyl paraben. Η μέση τιμή της συγκέντρωσης των parabens στα τρόφιμα είναι περίπου $39,3 \text{ ng g}^{-1}$ του προϊόντος.

4.5.4.2 Προϊόντα προσωπικής φροντίδας

Λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν τα parabens χρησιμοποιούνται είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, σε όλες τις κατηγορίες καλλυντικών προϊόντων. Τα προϊόντα αυτά έρχονται σε επαφή με το δέρμα, το τριχωτό της κεφαλής, τα μαλλιά, το βλεννογόνο (στόματος, ματιών, κόλπου) και τα νύχια. Η διάρκεια εφαρμογής

αυτών των προϊόντων μπορεί να είναι συνεχής ή και παροδική. Η σειρά προτίμησης τους στα σκευάσματα είναι methyl- > ethyl- > propyl- > butyl paraben.

4.5.4.3 Φαρμακευτικά προϊόντα

Η εμφάνιση των parabens στα φαρμακευτικά προϊόντα έγινε στα μέσα του 1900. Βρίσκονται σε διάφορες φαρμακευτικές μορφές όπως χάπια, σιρόπια, αλοιφές και ενέσιμα διαλύματα συνήθως σε συγκέντρωση μικρότερη του 1%. Τα methyl, propyl και butyl είναι αυτά που εμφανίζονται πιο συχνά σε αυτά τα σκευάσματα.

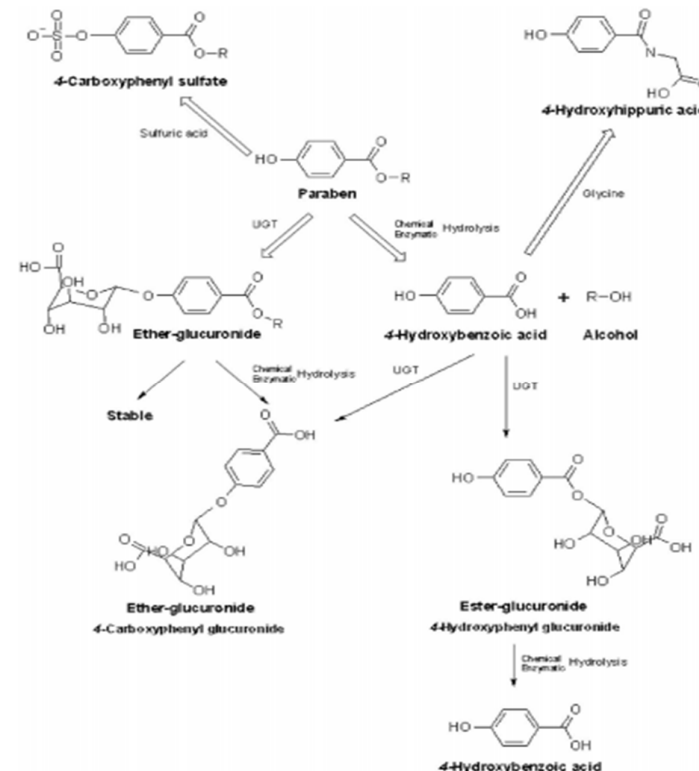
4.6 Απορρόφηση, Μεταβολισμός, Απέκκριση

Τα parabens εισέρχονται στον ανθρώπινο οργανισμό μετά από εφαρμογή τους στο δέρμα, μετά από peros λήψη ή μέσω της εισπνοής. Μεγαλύτερη απορρόφηση των ουσιών αυτών από τον οργανισμό παρατηρείται όταν αυτές λαμβάνονται από το στόμα, παρά μετά από διαδερμική εναπόθεση τους και επίσης όταν η θερμοκρασία του σώματος είναι πιο μεγάλη.

Ο μεταβολισμός των parabens διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο που εισέρχονται στον οργανισμό. Το πρώτο στάδιο της βιομετατροπής των parabens στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η υδρόλυσή τους σε p-υδροξυβενζοϊκό οξύ (PHBA) και την αντίστοιχη αλκοόλη. Η υδρόλυση αυτή πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο, και μέσω του μικροσωμικού ηπατικού συστήματος και εν μέρει στην επιδερμίδα και το χόριο. Όσο αυξάνεται το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας τόσο μειώνεται η ταχύτητα της υδρόλυσής τους στο ήπαρ. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από εστεράσες όπως είναι για παράδειγμα η ανθρώπινη καρβοξυλεστεράση 1 (hCE1) και η ανθρώπινη καρβοξυλεστεράση 2 (hCE2). Το ένζυμο hCE1 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με τα parabens που διαθέτουν μικρή αλυσίδα υποκαταστάτη (MePB και EPB) ενώ το ένζυμο hCE2 παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια με αυτά που διαθέτουν μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες (BuPB και BzPB).

Το δεύτερο στάδιο βιομετατροπής σχήμα 4.3 λαμβάνει χώρα μέσω του ηπατικού μικροσωμικού συστήματος όπου γίνεται σύζευξη με θειικό οξύ, γλυκίνη και γλυκουρονικό οξύ. Ο σχηματισμός παραγώγων με γλυκουρονικό οξύ καταλύεται από

το ένζυμο UDP γλυκουρονοσυλ-τρανσφεράση (UGT) (κυρίως της οικογένειας A1 και 2B). Τα παράγωγα που σχηματίζονται με το MePB και το PrPB παραμένουν σταθερά στο πλάσμα μέχρι και ημέρες. Οι εστέρες του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος οι οποίοι μεταβολίζονται στον οργανισμό δε συσσωρεύονται στους ιστούς. Παρόλα αυτά σε ανθρώπινο ιστό καρκίνου του μαστού έχουν βρεθεί parabens τα οποία δεν έχουν μεταβολιστεί, ίσως λόγω της έλλειψης των καρβοξυλεστερασών CE1 και CE2 στα κύτταρα της περιοχής αυτής που συμβάλλουν στον μεταβολισμό των parabens [24].



Σχήμα 4.3 Μεταβολισμός των parabens. ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 24

Η απέκκριση των μεταβολιτών αυτών από τον οργανισμό γίνεται κυρίως μέσω των ούρων και σε μικρότερο βαθμό μέσω των κοπράνων και της χολής, έχοντας χρόνο ημίσειας ζωής μικρότερο από 24 ώρες. Έχει παρατηρηθεί ότι μικρές ποσότητες parabens τα οποία έχουν μικρό μοριακό βάρος (MePB, EPB, PrPB) απεκκρίνονται αμετάβλητα από τα ούρα. Η εμφάνιση των parabens στα ούρα μειώνεται με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας. Η έκθεση του ανθρώπινου οργανισμού στα parabens εξετάζεται μέσω της αξιολόγησης των μεταβολιτών στα

ούρα. Από έρευνες που έχουν γίνει, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσίασε η εμφάνιση αυξημένων συγκεντρώσεων των ουσιών αυτών σε ούρα γυναικών σε σύγκριση με αυτά των ανδρών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο ότι οι γυναίκες χρησιμοποιούν περισσότερο τα καλλυντικά προϊόντα.

4.7 Ενδοκρινικές και άλλες επιδράσεις της χρήσης των parabens στην ανθρώπινη φυσιολογία

4.7.1 Οιστρογονική δράση των parabens και του κύριου μεταβολίτη τους PHBA

Τα οιστρογόνα διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη, εξέλιξη και θεραπεία του καρκίνου του μαστού. Ο μοριακός μηχανισμός δράσης των οιστρογόνων περιλαμβάνει σύνδεση του προσδέτη στον υποδοχέα οιστρογόνων (ERα ή ERβ), διμερισμό του προσδέτη-υποδοχέα, σύνδεση σε θέσεις του DNA που ανταποκρίνονται στα οιστρογόνα και έναρξη της γονιδιακής έκφρασης. Για να καθοριστεί λοιπόν αν μια ουσία έχει οιστρογόνο δράση εξετάζεται η ικανότητα σύνδεσης της σε έναν υποδοχέα ER και η ικανότητα να επάγει γονιδιακή έκφραση που ρυθμίζεται από τα οιστρογόνα.

Από μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχθεί ότι οι εστέρες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος διαθέτουν οιστρογόνο δράση. Η οιστρογόνο δράση των parabens αυξάνεται με αύξηση του μήκους της αλυσίδας από το MPB έως το BPB και με την παρουσία διακλάδωσης στην αλυσίδα από το PPB στο iPPB. Επίσης αύξηση της οιστρογονικής δράσης προκαλεί και η επέκταση της αλυσίδας του MPB με προσθήκη αρωματικού δακτυλίου BzPB. Επιπλέον υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά στην οποία το p-υδροξυβενζοϊκό οξύ που είναι ο κυριότερος μεταβολίτης των parabens, ενδεχομένως να έχει οιστρογονική δράση [25]. Έτσι οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι παρόλο που με τη μείωση του μήκους της αλυσίδας μειώνεται η οιστρογονική δράση, η πλήρης αφαίρεση της αλυσίδας προκαλεί περαιτέρω μείωση της οιστρογονικής δράσης αλλά όχι την εξάλειψή της. Αυτό θέτει υπό αμφισβήτηση τον μέχρι στιγμής ισχυρισμό ότι ο μεταβολισμός των parabens σε PHBA δρα για την εξάλειψη των οιστρογονικών

επιβαρύνσεων του σώματος μετά από έκθεση του οργανισμού σε parabens που βρίσκονται στα καλλυντικά προϊόντα.

Ο μηχανισμός δράσης του υποδοχέα εξαρτάται από δύο παράγοντες (α) την συγγένεια του προσδέτη και (β) την αποτελεσματικότητα του προσδέτη. Τα parabens έχουν χαμηλότερη συγγένεια με τον ER υποδοχέα από ότι άλλες ενδογενείς οιστρογονικές ουσίες. Αυτό όμως δεν οδηγεί σε μειωμένη αποτελεσματικότητα καθώς αν αυτά βρίσκονται σε επαρκής συγκεντρώσεις οδηγούν σε αυξημένη γονιδιακή έκφραση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού, ίδιου μεγέθους με τη 17β-οιστραδιόλη. Τα parabens δεν είναι μερικοί αγωνιστές όπως μπορεί να θεωρηθεί από τον όρο «weak estrogens» αλλά προκαλούν πλήρη αγωνιστική δράση σε όλα τα κύτταρα.

Πρόσφατες μελέτες αναφέρουν ότι μεμονωμένα parabens μπορεί να έχουν διαφορετική συγγένεια με τον υποδοχέα ERα από ότι με τον υποδοχέα ERβ και έτσι να υπάρχει διαφορετική ανταπόκριση για κάθε paraben με αποτέλεσμα να προκαλούνται διαφορετικοί τύποι καρκίνου του μαστού [25-27].

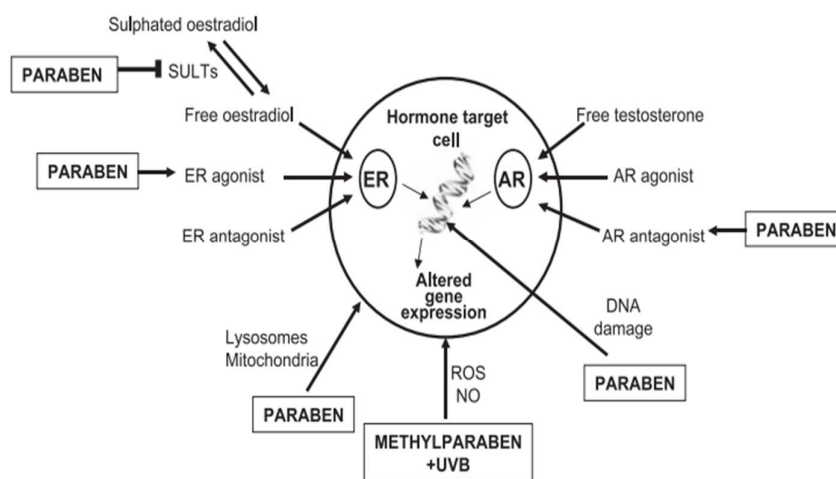
Αν και πολλές επιπτώσεις από οιστρογόνα γίνονται από τη σύνδεση σε ERα και ERβ υποδοχείς, πολλά ξenoοιστρογόνα μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος παρεμβαίνοντας σε μεταβολικά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για τη σύνθεση των φυσικών οιστρογόνων ή την τροποποίηση της διαθεσιμότητάς τους στην ελεύθερη μη συζευγμένη τους μορφή. Άλλος ένας τρόπος με τον οποίο τα parabens διαταράσσουν τα επίπεδα των οιστρογόνων του οργανισμού είναι μέσω της αναστολής των σουλφοτρανσφερασών (SULTs). Η δράση των οιστρογόνων *in vivo* ρυθμίζεται μέσω μιας ισορροπημένης αλληλεπίδρασης μεταξύ ενζύμων σουλφοτρανσφεράσης (SULTs) που καταλύουν τη θεική σύζευξη και τις σουλφατάσες που απελευθερώνουν ελεύθερα οιστρογόνα. Τα parabens μέσω της αναστολής των SULTs αναστέλλουν τη θείωση των οιστρογόνων και έτσι έμμεσα ενισχύουν την οιστρογονική δράση μέσω της αύξησης των επιπέδων της ελεύθερης οιστραδιόλης.

4.7.2 Αντιανδρογόνο δράση και αναπαραγωγικές διαταραχές

Εκτός από την οιστρογονική δράση που εμφανίζουν τα parabens, φαίνεται να εμφανίζουν και αντιανδρογόνο δράση. Σε μελέτη που έγινε σε νεαρά τρωκτικά μετά από επαναλαμβανόμενες χορηγήσεις εκ του στόματος PBP και BPB αναφέρθηκαν μεταβολές στην αναπαραγωγική λειτουργία όπως στη σπερματογένεση, έκκριση τεστοστερόνης και βάρος επιδιδυμίδας. Ωστόσο αυτό μπορεί να οφείλεται στην οιστρογονική τους δράση ή στη δράση των parabens μέσω AR μονοπατιών.

4.7.3 Parabens και καρκίνος του δέρματος

Με τη συνεχή χρήση των parabens σε τόσα πολλά καλλυντικά προϊόντα αναμένεται να έχουν κάποιες επιπτώσεις στην επιδερμίδα και το χόριο του δέρματος. Χρειάζεται λοιπόν να εξεταστεί αν έχουν θετική ή αρνητική επίδραση σε διαφορετικά στάδια της ζωής ή σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε πρόσφατα [28] διαπιστώθηκε ότι το methyl paraben επηρεάζει τη γήρανση και τη διαφοροποίηση των κερατινοκυττάρων καθώς μακροχρόνια εφαρμογή του MPB στα κερατινοκύτταρα θα μπορούσε να επηρεάσει το ρυθμό πολλαπλασιασμού, τη μορφολογία των κυττάρων, την έκφραση των συνθετασων υαλουρονικού οξέος και του κολλαγόνου IV.



Σχήμα 4.4 Τρόποι επίδρασης των parabens στις μοριακές οδούς των κυττάρων. ΠΗΓΗ: βιβλιογραφική αναφορά 25

Άλλες μελέτες έδειξαν ότι το MPB και EPB μπορούν να προκαλέσουν αντιδράσεις οξειδωτικού στρες στο δέρμα μετά από αντίδραση με $^1\text{O}_2$ σε ορατό φως δημιουργώντας παράγωγα γλουταθειόνης και υδροκινόνης. Το γεγονός ότι το MPB ενισχύει την προκαλούμενη από υπεριώδη ακτινοβολία βλάβη των κερατινοκυττάρων του δέρματος καθώς και την παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS) και μονοξειδίου του αζώτου (NO) και υπεροξείδωση των λιπιδίων [29], θέτει σοβαρά ερωτήματα σχετικά με πιθανές γονοτοξικές επιδράσεις του MPB που εφαρμόζεται μέσω των προϊόντων προσωπικής φροντίδας στο δέρμα όταν αυτό είναι εκτεθειμένο στον ήλιο με αυξημένες πιθανότητες πρόκλησης καρκίνου κερατινοκυττάρων [25]. Αυτό είναι σημαντικό στα πλαίσια χρήσης του MPB στα αντηλιακά προϊόντα και της συνεχούς αβεβαιότητας στον αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αντηλιακής χρήσης και της ανάπτυξης καρκίνου του δέρματος [19, 30, 31].

4.8 Νομοθεσία

Το 2010 η Ευρωπαϊκή Επιστημονική Επιτροπή για την ασφάλεια των καταναλωτών (SCCS) αναφέρει ότι όσον αφορά την ασφαλή χρήση των parabens ως καλλυντικών συστατικών, εκφράστηκαν ανησυχίες σχετικά με τις πιθανές ενδοκρινικές επιδράσεις των parabens υψηλότερου μήκους αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένων των propylparaben, butylparaben και των συναφών ενώσεων [32]. Τα δεδομένα για το benzylparaben ήταν επίσης ανησυχητικά. Με βάση τα διαθέσιμα *in vitro* δεδομένα και τα αποτελέσματα των *in vivo* μελετών σε ποντίκια, η SCCS συμφώνησε το 2010 ότι οι ενδοκρινικές επιδράσεις που εμφανίζονται από τα parabens φαίνεται να αυξάνονται με την αύξηση του μήκους της αλυσίδας. Παρ' όλα αυτά, η SCCS τονίζει ότι τα επίπεδα ισχύος που εμφανίζονται παραμένουν περίπου 3 έως 6 τάξεις μεγέθους χαμηλότερη από τη δραστικότητα των θετικών ελέγχων. Με βάση τις μέχρι τότε μελέτες δεν ήταν ξεκάθαρο ότι τα parabens μεταβολίζονται πλήρως στο αδρανές από οιστρογονικής άποψης και μη τοξικό μεταβολίτη p-hydroxy paraben (PHBA). Συνοπτικά η επιτροπή SCCS, το 2010, δεν μπόρεσε να εξακριβώσει με βάση τα έως τότε δεδομένα, αν το butylparaben και το propylparaben μεταβολίζονται πλήρως σε PHBA μετά την τοπική εφαρμογή στο ανθρώπινο δέρμα και εξακολουθούν να

θεωρούν τις μητρικές ενώσεις ως δυνητικά συστηματικά διαθέσιμες, ωστόσο όχι σε απεριόριστο βαθμό.

Στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης το επιτρεπόμενο περιεχόμενο των καλλυντικών προϊόντων σε parabens είναι 0,4 % w/w όταν χρησιμοποιείται μόνο ένα paraben στο σκεύασμα και 0,8% όταν χρησιμοποιείται συνδυασμός από parabens. Ο οργανισμός ελέγχου φαρμάκων και τροφίμων (FDA) των ΗΠΑ και ο κυβερνητικός οργανισμός υγείας του Καναδά (Health Canada) συνιστούν το ίδιο κατώτατο όριο όπως αυτό της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ωστόσο, το 2010, η επιτροπή SCCS καθόρισε ότι η συγκέντρωση του propyl paraben και του butyl paraben στα καλλυντικά προϊόντα δεν πρέπει να ξεπερνά το 0,4% w/w. Το Μάρτιο του 2011 η επιτροπή SCCS (SCCS/1348/10) εισηγήθηκε ότι το methyl paraben και το ethyl paraben είναι ασφαλή όταν χρησιμοποιούνται στη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση, το butylparaben and propylparaben είναι ασφαλή όταν το άθροισμα των επιμέρους συγκεντρώσεων τους δεν υπερβαίνει το 0,19% w/w, ενώ για τα isopropylparaben, isobutylparaben, phenylparaben, benzylparaben και pentylparaben, ο ανθρώπινος κίνδυνος δεν μπορούσε να αξιολογηθεί λόγω έλλειψης δεδομένων [33]. Στη Δανία έχει απαγορευτεί η προσθήκη propyl, isopropyl, butyl και isobutyl paraben σε προϊόντα τα οποία προορίζονται για βρέφη κάτω των 3 ετών. Το 2020 η επιτροπή SCCS , λαμβάνοντας υπόψη τα δεδομένα σχετικά με την ενδοκρινική δράση του propyl paraben αποφάσισε ότι είναι ασφαλές να χρησιμοποιείται ως συντηρητικό σε καλλυντικά προϊόντα σε συγκέντρωση έως 0,14 % w/w [34].

Όσον αφορά τα φαρμακευτικά σκευάσματα η παρουσία ενός paraben δεν μπορεί να ξεπερνά το 0,1% w/w και ο συνδυασμός αυτών δεν μπορεί να ξεπερνά το 0,3% w/w. Η εμφάνιση των parabens στα τρόφιμα πρέπει να συμβολίζεται με τη σήμανση E στην ετικέτα της συσκευασίας και κατατάσσονται μεταξύ του E200-E299. Οι μελέτες που έδειξαν πιθανές ενδοκρινικές επιδράσεις καθώς και πιθανή καρκινογόνο δράση για ορισμένα από τα parabens έχουν εγείρει προβληματισμούς την τελευταία 20ετία και έχουν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της χρήσης τους αλλά και τη δημιουργία προϊόντων χωρίς parabens στη σύνθεσή τους (paraben free) [35].

Κεφάλαιο 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΚΑΙ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (FPSE-HPLC) ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ PARABENS ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΠΛΑΣΜΑ

6.1 Εισαγωγή και σκοπός της εργασίας

Τα parabens χρησιμοποιούνται ευρέως ως συντηρητικά σε φάρμακα, καλλυντικά και τρόφιμα. Η παρατεταμένη χρήση τους έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών για την αξιολόγηση της ανθρώπινης έκθεσης σε αυτές τις ενώσεις καθώς κάποιες ερευνητικές μελέτες άρχισαν να εγείρουν προβληματισμούς ως προς την ασφάλεια στη μακροχρόνια χρήση τους. Συγκεκριμένα σε μελέτες που δημοσιεύθηκαν στις αρχές του 2000, βρέθηκε ότι ορισμένα parabens έχουν πιθανή οιστρογονική δράση, ενώ η ανίχνευσή τους σε όγκους ανθρώπινου μαστού πυροδότησε μια σειρά από αναφορές που έθεσαν σε αμφιβολία την ασφάλειά τους. Επομένως, είναι αναγκαία η ανάπτυξη βιοαναλυτικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των parabens σε βιολογικά υγρά οι οποίες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε μελέτες βιοπαρακολούθησης.

Βιβλιογραφική έρευνα αποκαλύπτει πληθώρα εφαρμογών στον προσδιορισμό ενός ή περισσότερων από τα παραπάνω αναφερθέντα parabens σε βιολογικά υλικά, τρόφιμα, καλλυντικά προϊόντα, περιβαλλοντικά δείγματα και φαρμακευτικά σκευάσματα. Δεδομένου ότι η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε σε ανθρώπινο πλάσμα θα γίνει αναφορά σε μελέτες που έχουν γίνει σε βιολογικά υλικά. Σε μελέτη που δημοσιεύθηκε το 2017 αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό parabens (methyl-, ethyl-, propyl-, butyl-, benzyl-paraben), δισφαινολών (BPA, BPS, BPF, BPAF) και οιστρογόνων (estrone, estradiol, estriol) σε ανθρώπινο πλάσμα με LC-MS/MS. Τα όριο ποσοτικοποίησης για κάθε ένωση με τη σειρά που αναγράφονται πιο πάνω είναι 172, 149, 171, 134 and 202 pg/mL αντίστοιχα. Είναι η πρώτη μέθοδος που επέτρεψε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των

πιο πάνω ουσιών σε ανθρώπινο πλάσμα και στο τέλος υποβλήθηκε με επιτυχία για τον προσδιορισμό αυτών των αναλυτών σε πλάσμα υγείων ανδρών [36].

Σε πιο πρόσφατη μελέτη αναπτύχθηκε μέθοδος QuEChERS-UHPLC–MS/MS για τον προσδιορισμό τεσσάρων parabens (methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- paraben) και δέκα φίλτρων με υπεριώδη ακτινοβολία σε ανθρώπινο γάλα. Χρησιμοποιήθηκε η στήλη Gemini C18 διαστάσεων 100 mm × 2 mm και μέγεθος σωματιδίων 3μm και πραγματοποιήθηκε επιτυχής ποσοτικός προσδιορισμός των 14 ενδοκρινικών διαταρακτών σε ανθρώπινο γάλα 15 τυχαίων γυναικών [37]. Σε μια άλλη έρευνα αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος αεριοχρωματογραφίας- φασματομετρίας μαζών για τον προσδιορισμό 8 parabens σε όγκο ανθρώπινου ιστού και σε λιπώδη ιστό. Πριν την ανάλυσή τους τα δείγματα υποβάλλονται σε υγρό – υγρό μικροεκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους [38]. Το 2018 σε έρευνα έγινε επιτεύχθηκε ο ταυτόχρονος προσδιορισμός parabens (methyl-, ethyl-, isopropyl-, propyl-, isobutyl, butyl- paraben), αλκυλοφαινολών, φαινυλοφαινολών, δισφαινόλης Α και τρικλοζάνης σε ανθρώπινο αίμα, ούρα και μητρικό γάλα. Η προκατεργασία των δειγμάτων έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης και στη συνέχεια αυτά αναλύθηκαν με αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών [39]. Χρησιμοποιώντας μια μέθοδο υψηλής ευαισθησίας, η οποία περιλάμβανε on-line SPE-HPLC-MS/MS πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των MPB, EPB, PPB, BPB, BzPB, της τρικλοζάνης και έξι φαινολών σε ανθρώπινο γάλα. [40]

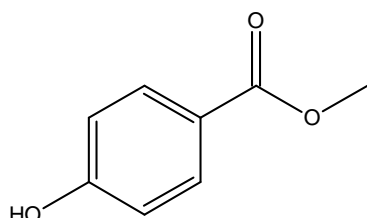
Στον πίνακα 6.1 παρουσιάζονται οι μέθοδοι ανάλυσης που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των parabens σε διάφορα βιολογικά υλικά [41,42].

Πίνακας 6.1 Μέθοδοι ανάλυσης των parabens σε Α) ανθρώπινα ούρα Β) μητρικό γάλα C) σε ορό και D) σε ιστό					
Αναλύτες	Μέθοδος προκατεργασίας	Μέθοδος ανάλυσης	Αναλυτική στήλη	LOD ng/mL	LOQ ng/mL
(α) ανθρώπινα ούρα					
(1) MPB, EPB, PPB, BPB, BzPB	On-line SPE (C18)	LC-MS/MS (APCI)	Chromolith RP-18, 100 x 4.6 mm	0,1-0,18	0,3-0,6

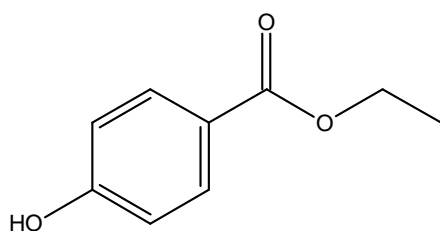
(2) MPB, EPB, PPB, BPB, BzPB	Automated SPE (Strata XL)	LC-MS/MS (ESI)	Synergie 4 U Fusion RP	0,07-0,40	
(3) MPB, EPB, PPB, BPB, BzPB, HepPB	LLE	LC-MS/MS (ESI)	Betasil C18, 100 x 2.1 mm		0,09-19,5
(4) MPB, EPB, PPB, BPB	SPE (Strata XL)	LC-MS/MS (ESI)	Synergie 4 U Fusion RP	0,08-0,3	0,2-1
(5) MPB, EPB, PPB, BPB	SPE	LC-MS/MS (ESI)	Kinetex Phenyl Hexyl column, 100 x 2,1 mm	0,09-0,3	0,3-1
(6) MPB, EPB, iPPB, PPB, iBPB, BPB	SPE cartridge	RP-HPLC-MS/MS (ESI)	Betasil Phenyl, 100 x 2,1 mm	0,06-0,24	0,2-0,8
(7) MPB, EPB, PPB, BPB	DLLME	UHPLC-MS/MS (ESI)	Acquity-UPLC BEH-C18, 50 x 2,1 mm	0,2	0.5
(8) MPB, EPB, PPB, BPB	SPE	HPLC-MS/MS (ESI)	Synergie 4 U Fusion RP 75 x 2 mm	0,04-0,3	0,2-1
(β) μητρικό γάλα					
(9) MPB, EPB, PPB, BPB	SM-SLLME	UHPLC-MS/MS (ESI)	Acquity-UPLC BEH-C18, 100 x 2,1 mm	0,1-0,2	0,4-0,5
(10) MPB, EPB, PPB, BPB	SBSE	UHPLC-MS/MS (ESI)	Acquity-UPLC BEH-C18, 100 x 2,1 mm	0,1	0,3-0,4
(11) MPB, EPB, PPB, BPB	Ultrasound-assisted extraction	UHPLC-MS/MS (ESI)	UPLC BEH-C18, 50 x 2.1 mm	0,1-0,2	0,4-0,7
(γ) ορός					
(12) MPB, EPB, PPB, BPB, BzP	On-line SPE (C18)	HPLC-MS/MS	Chromolith RP-18, 100 x 4,6 mm	0,1-0,5	
(13) MPB, EPB, PPB, BPB	DLLME	UPLC-MS/MS (ESI)	Acquity-UPLC BEH-C18, 50 x 2,1 mm	0,2-0,7	
(14) MPB, EPB, PPB, BPB, BzPB	Automated SPE (Strata XL)	LC-MS/MS (ESI)	Synergie 4 U Fusion RP 75 x 2,0 mm	0,02-0,36	
(δ) ανθρώπινος ιστός					
(15) MPB, EPB, PPB, BPB, iBPB, BzPB	LLE	HPLC-MS/MS	Hypersil Elite C18, 150 x 2,1 mm		20,6

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό των methyl paraben (MPB), ethyl Paraben (EPB), isopropyl paraben (iPPB), propyl paraben (PPB), iso-butyl paraben (iBPB), butyl paraben (BPB) και benzyl paraben (BzPB) σε ανθρώπινο πλάσμα. Τα βιολογικά δείγματα κατεργάζονται με την τεχνική προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο πριν τη χρωματογραφική ανάλυση. Η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο είναι μια νέα, πολλά υποσχόμενη τεχνική προκατεργασίας βιολογικού δείγματος η οποία επιστρατεύει την τεχνολογία επικάλυψης λύματος-πηκτής. Η αναπτυχθείσα μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μέτρηση των συγκεντρώσεων αυτών των ουσιών σε ανθρώπινο πλάσμα με στόχο τον έλεγχο της έκθεσης στις ουσίες αυτές από τη χρήση διαφόρων προϊόντων που τα περιέχουν.

Οι χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου παρουσιάζονται στο σχήμα 6.1.

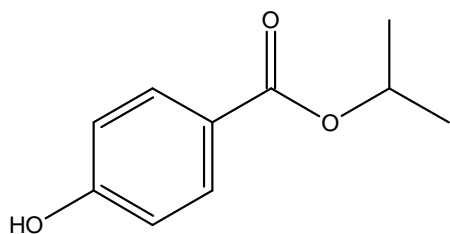


Methyl paraben



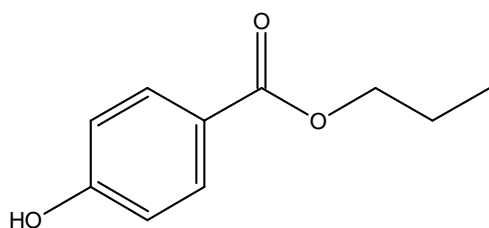
Ethyl paraben

Μοριακός τύπος: $C_8H_8O_3$
M.B.: 152,15
Log P: 1,46
 $pK_a = 8,17$
Log k_{ow} : 1,66
Διαλυτότητα, νερό 20 °C:
2,00 g/100mL
m/z: 152,05 (100.0%), 153,05 (8.9%)
Μοριακός τύπος: $C_9H_{10}O_3$
M.B.: 166,18
Log P: 1,8
 $pK_a = 8,22$
Log k_{ow} : 2,19
Διαλυτότητα, νερό 20 °C:
0,86 g/100mL
m/z: 166,06 (100.0%), 167,07 (10.0%), 168,07 (1.1%)



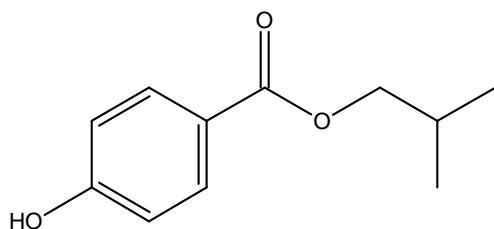
Isopropyl paraben

Μοριακός τύπος: $C_{10}H_{12}O_3$
 Μ.Β.: 180,2
 Log P: 2,12
 $pK_a = 8,955^*$ (θεωρητική τιμή)
 m/z : 180,08 (100,0%), 181,08 (10,8%)



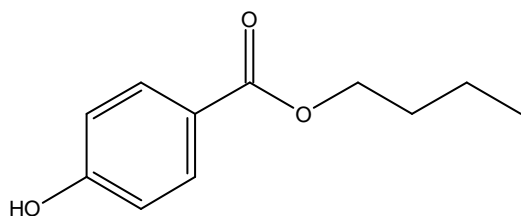
Propyl paraben

Μοριακός τύπος: $C_{10}H_{12}O_3$
 Μ.Β.: 180,2
 Log P: 2,29
 $pK_a = 8,97$
 $LogK_{ow}$: 2,71
 Διαλυτότητα, νερό 20 °C:
 0,30 g/100mL
 m/z : 180,08 (100,0%), 181,08 (10,8%)



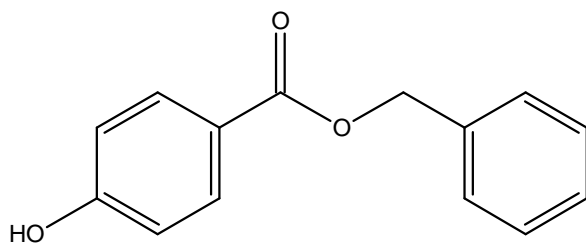
Isobutyl paraben

Μοριακός τύπος: $C_{10}H_{12}O_3$
 Μ.Β.: 194,23
 Log P: 2,69
 $pK_a = 8,96^*$ (θεωρητική τιμή)
 m/z : 194,09 (100,0%), 195,10 (11,9%)



Butyl paraben

Μοριακός τύπος: $C_{11}H_{14}O_3$
 Μ.Β.: 194,23
 Log P: 2,71
 $pK_a = 8,37$
 $LogK_{ow}$: 3,24
 Διαλυτότητα, νερό 20 °C:
 0,15 g/100mL
 m/z : 194,09 (100,0%), 195,10 (11,9%)



Benzyl paraben

Μοριακός τύπος: $C_{14}H_{12}O_3$
 Μ.Β.: 228,25
 Log P: 3,2
 $pK_a = 8,931$
 $LogK_{ow}$: 3,56
 Διαλυτότητα, νερό 20 °C:
 0,05 g/100mL
 m/z : 228,08 (100,0%), 229,08 (15,1%), 230,09 (1,1%)

Σχήμα 6.1: Χημικές δομές και ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας (γραμμικότητα, γραμμική περιοχή, όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης, ορθότητα, πιστότητα), χρησιμοποιώντας εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.

6.2 Εξοπλισμός-Οργανολογία

6.2.1 Σύστημα HPLC-UV

Το σύστημα HPLC-UV που χρησιμοποιήθηκε, για το διαχωρισμό των αναλυτών, από τα ενδογενή συστατικά του πλάσματος, αποτελείται από μια αντλία ισοκρατικής έκλυσης της εταιρίας Spectra – Physics, μοντέλο SP8810 (Spectra – Physics Darmstadt, Germany) και σύστημα έγχυσης Rheodyne 7725i με βρόγχο εισαγωγής δείγματος 10μL. Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν στήλη αντιστρόφου φάσεως, η Spherisorb ODS1 C18 διαστάσεων 150.0 mm x 2.0 mm και διάμετρο σωματιδίων 3μm της εταιρίας Waters (Milford, MA, USA). Το χρωματογραφικό σύστημα ήταν συνδεδεμένο με ανιχνευτή υπεριώδους-ορατού της εταιρείας Waters μοντέλο 486. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ρυθμίστηκε στα 0,25 mL min⁻¹. Η κινητή φάση αποτελούταν από υδατικό διάλυμα 49,2mM μυρμηκικού αμμωνίου και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 66/34 (v/v) και 0,1% μυρμηκικό οξύ. Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ο χρόνος ανάλυσης για κάθε ένεση ήταν 35 λεπτά.

Η κινητή φάση, απαερώθηκε σε συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρίας Waters με διήθηση υπό κενό με φίλτρα νάιλον, της εταιρίας Gelman Sciences Ltd., που είχαν μέγεθος πόρων 0,45 μm. Η διαλυτοποίηση των ουσιών σε κατάλληλο διαλύτη για την παρασκευή διαλυμάτων έγινε σε λουτρό υπερήχων της εταιρίας Elma μοντέλου Transonic 460, ενώ η ανάδευση σε Vortex. Για την παρασκευή των διαλυμάτων, χρησιμοποιήθηκαν μικροπιπέτες Gilson των 200 μL και 1000 μL.

6.3 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

Για την ανάπτυξη και επικύρωση 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), δισαπεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή MilliQ plus, HPLC βαθμού καθαρότητας.
- Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Merck - Darmstadt, Germany)
- Μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH_4 , AMF) αναλυτικού βαθμού καθαρότητας (Acros Organics - New Jersey, USA).

6.2 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

6.2.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Ζυγίζονται με ακρίβεια 5.0 mg στερεού Methyl Paraben (MPB). Στη συνέχεια, το στερεό διαλύεται σε λουτρό υπερήχων και αραιώνεται με MeOH σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL μέχρι χαραγής. Με τον τρόπο αυτό προκύπτει πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Επαναλαμβάνεται ακριβώς η ίδια διαδικασία και για τους υπόλοιπους έξι αναλύτες Ethyl Paraben (EPB), iso-propyl paraben (iPPB), Propyl paraben (PPB), iso-butyl paraben (iBPB), Butyl paraben (BPB) και benzyl paraben (BzPB). Συνολικά προκύπτουν επτά πρότυπα διαλύματα, ένα για τον κάθε αναλύτη συγκέντρωσης $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

6.2.2 Μεικτά διαλύματα παρακαταθήκης

Μεικτό διάλυμα παρακαταθήκης Α: Ακριβώς 1 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και ο όγκος αραιώνεται μέχρι χαραγής με νερό. Παρασκευάζεται έτσι μεικτό διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ σε κάθε paraben.

Μεικτό διάλυμα παρακαταθήκης Β: Ακριβώς 0,5 ml από το μεικτό διάλυμα παρακαταθήκης Α μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και ο όγκος

αραιώνεται μέχρι χαραγής με νερό. Παρασκευάζεται έτσι μεικτό διάλυμα παρακαταθήκης συγκέντρωσης 2,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Τα διαλύματα παρακαταθήκης, αμέσως μετά την παρασκευή τους μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια και φυλάχτηκαν στην κατάψυξη σε θερμοκρασία $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου παραμένουν σταθερά για τουλάχιστον 2 μήνες. Τα μεικτά διαλύματα παρακαταθήκης φυλάσσονταν στο ψυγείο σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, όπου παραμένουν σταθερά για ένα μήνα.

6.2.3 Μεικτά διαλύματα εργασίας

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα μεικτά διαλύματα παρακαταθήκης Α και Β και αραιώνοντας με νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL όπως φαίνεται στον πίνακα 6.2 παρασκευάστηκαν πρότυπα μεικτά διαλύματα εργασίας που περιείχαν και τις επτά αναλυόμενες ουσίες σε εύρος συγκεντρώσεων $0,05\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ έως $2,5\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Τα μεικτά διαλύματα εργασίας μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια και φυλάσσονταν στο ψυγείο σε θερμοκρασία $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου παραμένουν σταθερά για 2 μήνες.

Πίνακας 6.2 Παρασκευή πρότυπων μεικτών διαλυμάτων εργασίας

Μεικτό διάλυμα παρακαταθήκης	Όγκος (μl)	Διαλύτης	Τελικός όγκος (ml)	Τελική συγκέντρωση ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
B	200	Νερό	10	0,05
B	400	Νερό	10	0,10
B	600	Νερό	10	0,15
B	1000	Νερό	10	0,25
A	100	Νερό	10	0,50
A	200	Νερό	10	1,0
A	500	Νερό	10	2,5

6.2.4 Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος

Εμβολιασμένα δείγματα καμπύλης αναφοράς

Για την αξιολόγηση της μεθόδου και την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα δείγματα πλάσματος και δείγματα ελέγχου

εμβολιασμένα με τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς παρασκευάστηκαν με προσθήκη όγκου 20 μL από το κατάλληλο διάλυμα εργασίας σε 50 μL ανθρώπινου πλάσματος, κατά τέτοιο τρόπο ώστε η τελική τους συγκέντρωση να είναι από 20 έως 500 ng mL^{-1} για κάθε αναλύτη. Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζεται αναλυτικά η πορεία παρασκευής των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, καθώς και οι τελικές συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη στα δείγματα αυτά.

Πίνακας 6.3 Παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων καμπύλης αναφοράς

Συγκέντρωση διαλύματος εργασίας (ng mL^{-1})	Όγκος (μL)	Ποσότητα αναλυτών (ng)	Όγκος ανθρωπίνου πλάσματος (μL)	Συγκέντρωση στο ανθρώπινο πλάσμα (ng mL^{-1})
50	20	1	50	20
100	20	2	50	40
150	20	3	50	60
250	20	5	50	100
500	20	10	50	200
1000	20	20	50	400
2500	10	25	50	500

Εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (Quality Control samples)

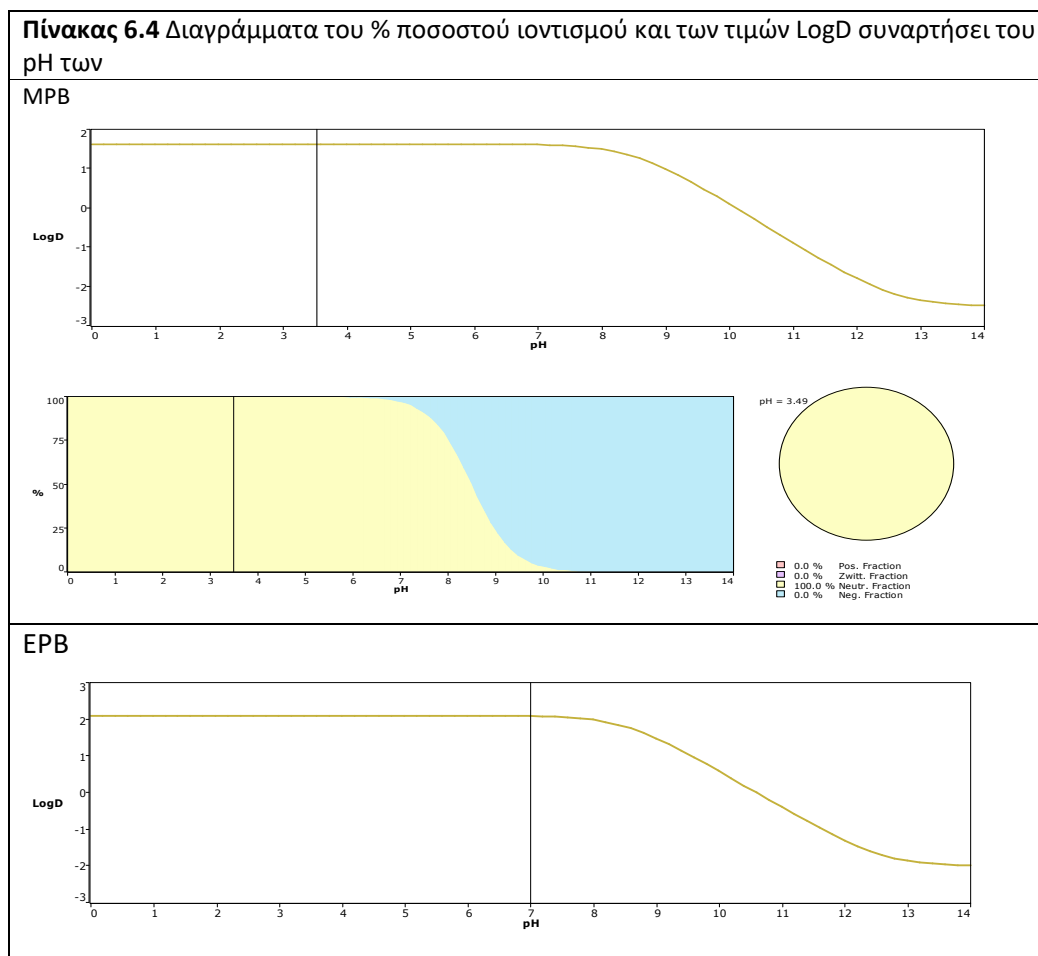
Τα δείγματα ελέγχου (QC samples) παρασκευάστηκαν με εμβολιασμό δειγμάτων πλάσματος με τις προσδιοριζόμενες ουσίες σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων 20, 100 και 500 ng mL^{-1} για κάθε αναλύτη. Τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου παρασκευάστηκαν από ξεχωριστές αραιώσεις των διαλυμάτων παρακαταθήκης, δηλαδή ήταν διαφορετικά από τα διαλύματα εργασίας που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς. Τόσο τα δείγματα της καμπύλης αναφοράς, όσο και τα δείγματα ελέγχου, παρασκευάζονταν και αναλύονταν μέσα στην ίδια εργαστηριακή ημέρα.

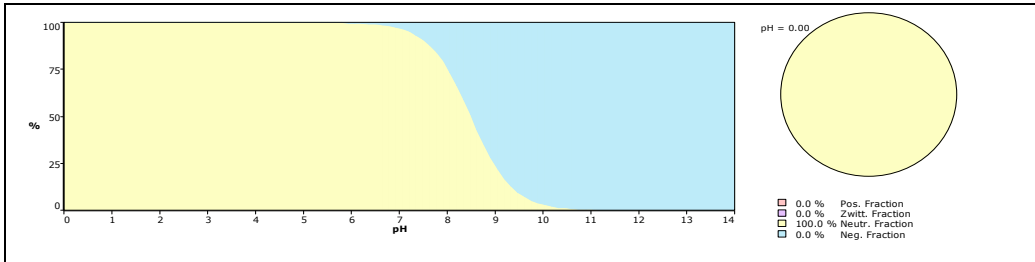
6.3 Ανάπτυξη της μεθόδου

6.3.1 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών συνθηκών

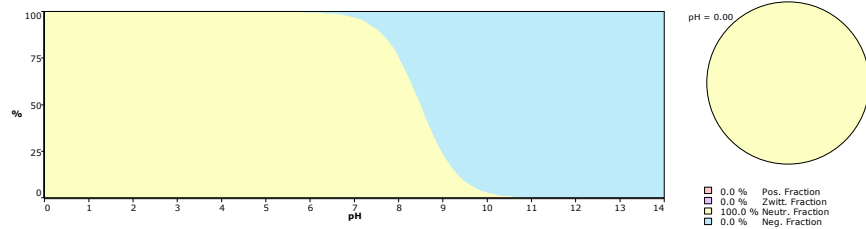
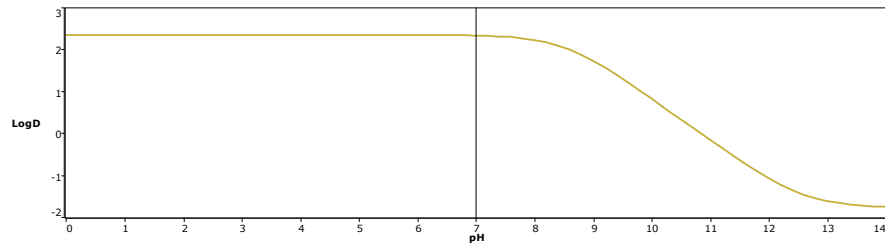
Κατά τη διαδικασία ανάπτυξης της μεθόδου εξετάζονται οι παράγοντες που επηρεάζουν τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών και επιλέγονται οι βέλτιστες συνθήκες.

Οι αναλύτες είναι παράγωγα του p-υδροξυβενζοϊκού οξέος και εμφανίζουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Από το πρόγραμμα ADME Boxes 3.0 αντλήθηκαν πληροφορίες για τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών όπως η λιποφιλία τους και ο ιοντισμός τους σε όλο το εύρος των τιμών pH. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4 όπου φαίνεται ότι σε τιμή pH >6 όλες οι ενώσεις είναι ιοντισμένες (αρνητικά φορτισμένες) και παράλληλα μειώνονται οι τιμές LogD.

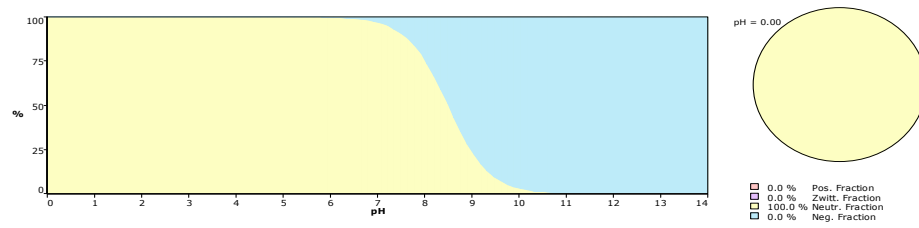
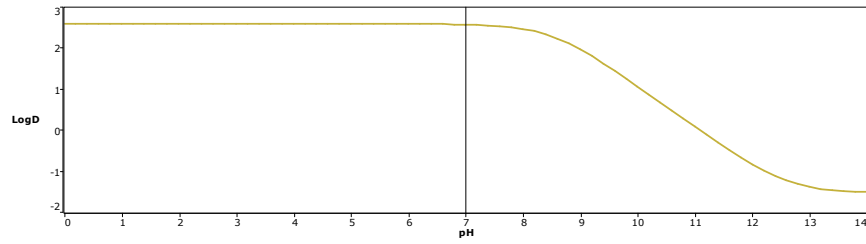




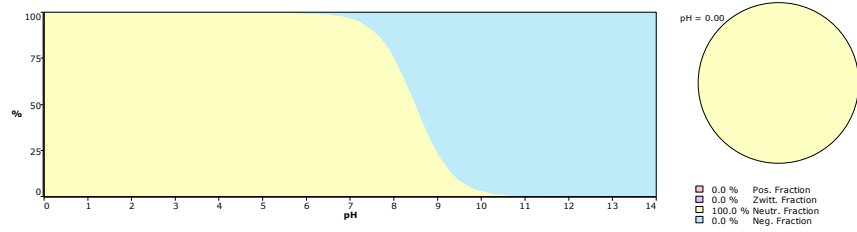
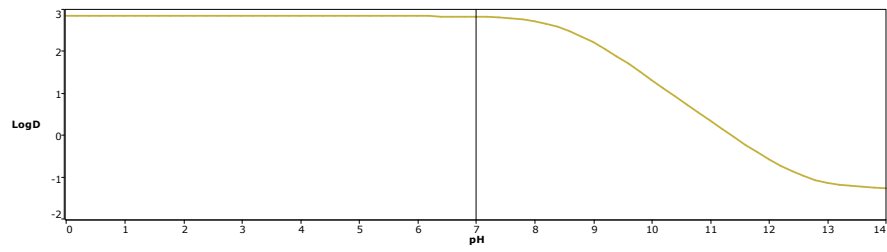
iBPB



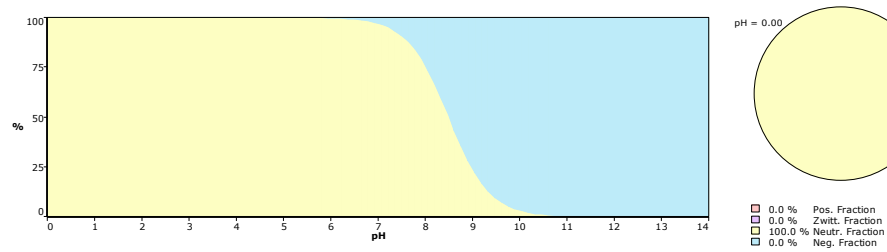
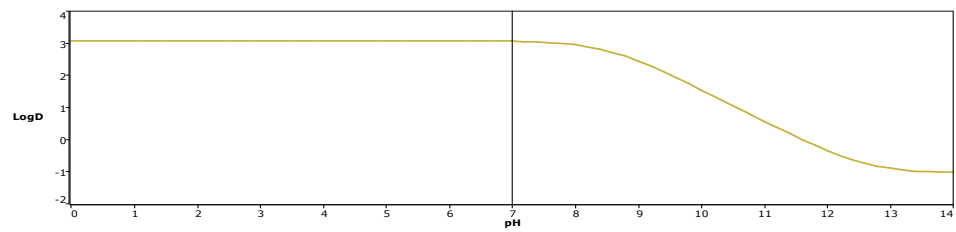
PBP



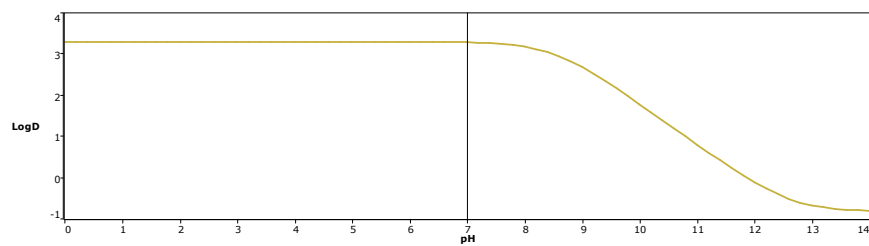
iBPB

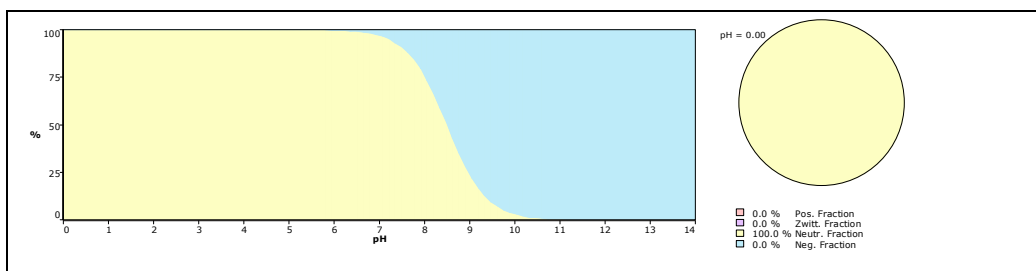


BPB



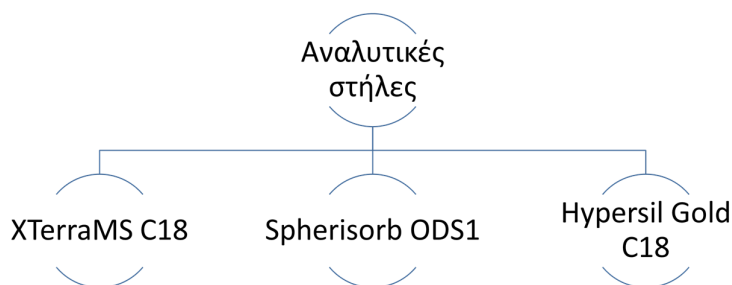
BzPB





6.3.1.1 Επιλογή στατικής φάσης

Για την επιλογή της κατάλληλης στατικής φάσης δοκιμάστηκαν τρεις αναλυτικές στήλες χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Οι αναλυτικές στήλες ήταν η Hypersyl gold C18, η XTerra MS C18 και η Spherisorb ODS1 C18 (σχήμα 6.2).

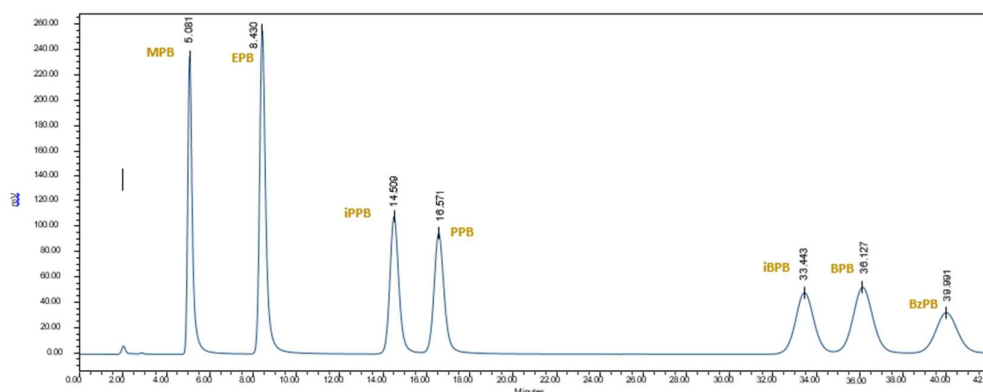


Σχήμα 6.2 Αναλυτικές στήλες που δοκιμάσθηκαν για το χρωματογραφικό διαχωρισμό των parabens.

Η στήλη Hypersyl gold C18 έχει διαστάσεις 150.0 mm x 2.1 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Η στήλη αυτή προσφέρει εξαιρετικό σχήμα κορυφών μειώνοντας το tailing, έχει ακροκάλυψη, είναι σταθερή σε ένα μεγάλο εύρος pH 1-11 και παρέχει εξαιρετική αποτελεσματικότητα και ευαισθησία. Η στήλη XTerra MS C18 έχει διαστάσεις 150 mm x 3 mm και μέγεθος σωματιδίων 5μm. Έχει ακροκάλυψη και εύρος pH 1-12. Προκειμένου να επιλεγθεί η κατάλληλη στατική φάση έγινε προσπάθεια διαχωρισμού των προσδιοριζόμενων ουσιών και στις τρεις αναλυτικές στήλες, χρησιμοποιώντας μεθανόλη ως οργανικό τροποποιητή σε μίγμα με υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου.

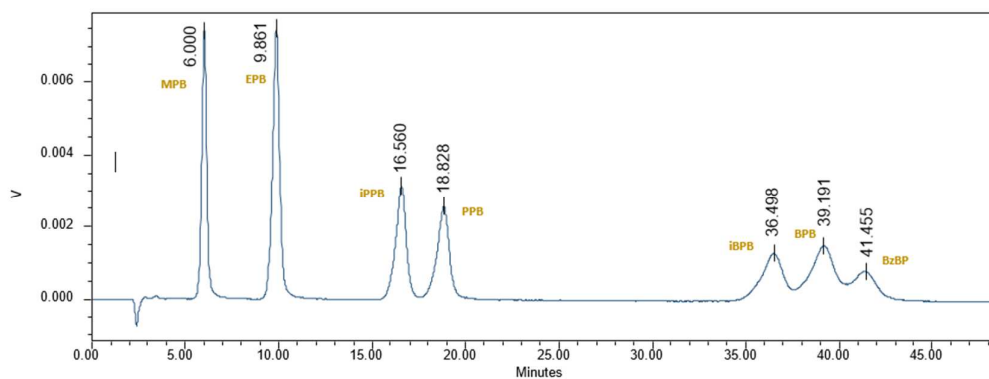
Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση μεικτού διαλύματος των 7 parabens στη στήλη Hypersil gold με κινητή φάση μίγμα

34mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου και μεθανόλης σε 58/42 v/v και ταχύτητα ροής 0,25mL min⁻¹.



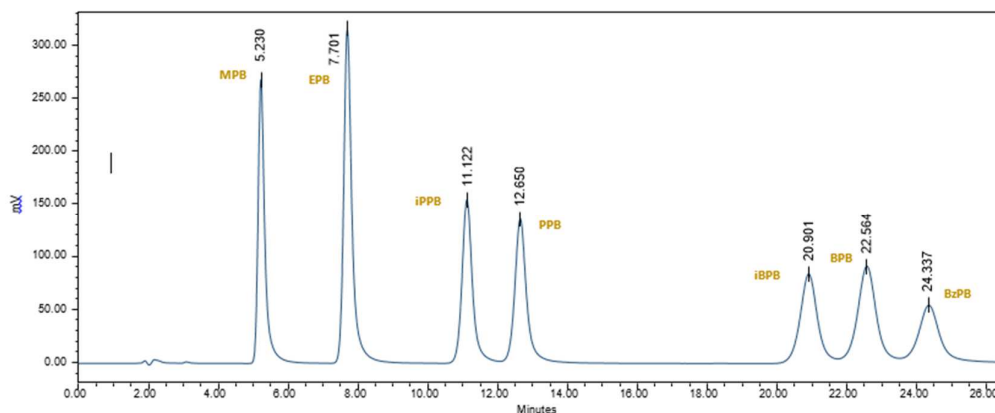
Σχήμα 6.3 Χρωματογράφημα που προκύπτει από ανάλυση των 7 parabens με την αναλυτική στήλη Hypersil gold.

Στο σχήμα 6.4 παρουσιάζεται χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση μεικτού διαλύματος των 7 parabens στη στήλη XTerra MS C18 με κινητή φάση μίγμα 35 mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου και μεθανόλης σε 57/43 v/v και ταχύτητα ροής 0,40 mL min⁻¹.



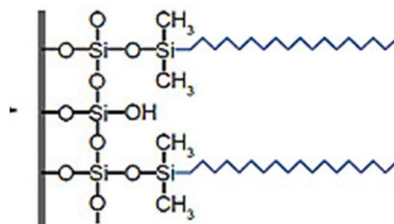
Σχήμα 6.4 Χρωματογράφημα που προκύπτει από ανάλυση των 7 parabens με την αναλυτική στήλη XTerra MS C18.

Στο σχήμα 6.5 παρουσιάζεται χρωματογράφημα που προκύπτει μετά από ανάλυση μεικτού διαλύματος των 7 parabens στη στήλη Spherisorb ODS1 με κινητή φάση μίγμα 37 mM ρυθμιστικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου και μεθανόλης σε 53/47 v/v και ταχύτητα ροής 0,25 mL min⁻¹.



Σχήμα 6.5 Χρωματογράφημα που προκύπτει από ανάλυση των 7 parabens με την αναλυτική στήλη Spherisorb ODS1.

Λαμβάνοντας υπόψη το χρόνο της ανάλυσης και το βαθμό διαχωρισμού των αναλυτών, η αναλυτική Spherisorb ODS1 C18 διαστάσεων 150.0 mm x 2.0 mm και μέγεθος σωματιδίων 3μm είναι καταλληλότερη, όπου όλοι οι αναλύτες διαχωρίζονται ικανοποιητικά σε 30 λεπτά. Η λειτουργική ομάδα της στήλης Spherisorb ODS1 C18 παρουσιάζεται στο σχήμα 6.6



Σχήμα 6.6. Λειτουργική ομάδα της στήλης Spherisorb ODS1 C18

Η ODS C18 αποτελεί από τις πιο σταθερές και περισσότερο χρησιμοποιούμενες χημικά τροποποιημένες στατικές φάσεις με βάση την πυρηνική πυριτία. Είναι μη πολική στατική φάση για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και είναι ανθεκτική σε εύρος τιμών pH 2 έως 8.

6.3.1.2 Επιλογή κινητής φάσης

Για την επιλογή της κατάλληλης κινητής φάσης ελήφθησαν υπόψη αρκετοί παράγοντες όπως:

- οι αναλύτες να μην εκκλύονται μαζί με κάποιο από τα συστατικά του πλάσματος, αλλά και ο χρόνος έκλουσής τους να μην είναι πολύ μεγάλος,
- η κινητή φάση να εξασφαλίζει σαφή διαχωρισμό των μελετούμενων parabens και ιδιαίτερα των ισομερών,
- Η πίεση της αναλυτικής στήλης να είναι χαμηλή δεδομένου του μεγάλου αριθμού βιολογικών δειγμάτων που έπρεπε να αναλυθούν. Η παρουσία κάποιου υδατικού διαλύματος άλατος στην κινητή φάση συνήθως ευνοεί την έκλυση των αναλυτών επομένως ήταν αναγκαία η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος (μυρμηκικού αμμωνίου , οξικού αμμωνίου) στη συγκράτηση των αναλυτών.
- Το είδος του οργανικού τροποποιητή συνήθως επηρεάζει την έκλυση των αναλυτών.

Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύστασης της κινητής φάσης στη συγκράτηση των αναλυτών, στο μετρούμενο σήμα και στη μορφή της χρωματογραφικής κορυφής αναλύοντας εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος σε συγκέντρωση 100 ng mL^{-1} σε όλους τους αναλύτες. Τα εμβολιασμένα δείγματα πλάσματος κατεργάσθηκαν σύμφωνα με τη βέλτιστη μέθοδο κατεργασίας όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.4.

Αναλυτικά οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν οι εξής: επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος στην κινητή φάση, επίδραση του είδους και του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση και η επίδραση προσθήκης και του είδους οξέος στην κινητή φάση. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιήθηκε σε δύο κύκλους πειραμάτων, όπου αρχικά στον πρώτο κύκλο καθορίστηκαν οι βασικές παράμετροι και ακολούθως κατά τη διάρκεια του δεύτερου κύκλου των πειραμάτων μεταβαλλόταν ένας παράγοντας, ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί στις βέλτιστες τιμές.

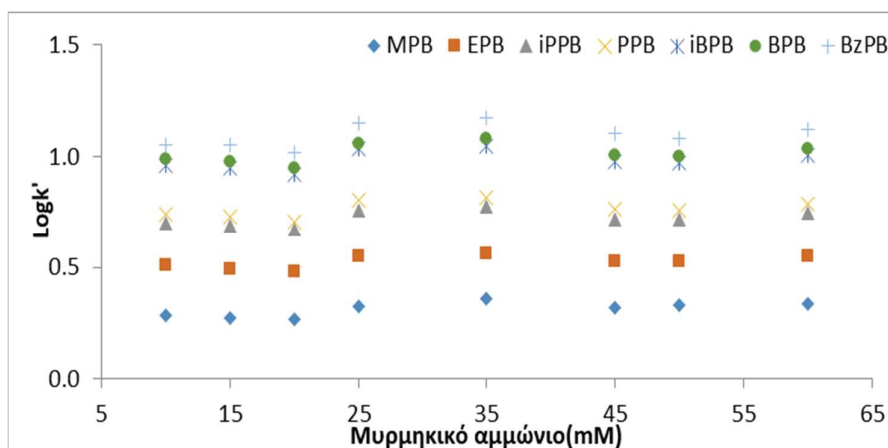
6.3.2.1 Επίδραση του είδους και του ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι οργανικοί τροποποιητές στην υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Μελετήθηκε η χρήση και των δυο οργανικών διαλυτών και διαπιστώθηκε ότι η αντικατάσταση της μεθανόλης με ακετονιτρίλιο βελτίωσε τις χρωματογραφικές κορυφές και μείωσε το χρόνο ανάλυσης. Επομένως, ως οργανικός διαλύτης για τις μελέτες επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο και ακολούθως μελετήθηκε η χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών σε σχέση με το % ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση. Κατά τη διάρκεια της μελέτης διατηρήθηκαν σταθερά τα mmoles του μυρμηκικού αμμωνίου στα 100 mL της κινητής φάσης, καθώς επίσης σταθερή ήταν και η προσθήκη 0,1% μυρμηκικού οξέος. Με μείωση του % ποσοστού ακετονιτριλίου της κινητής φάσης παρατηρήθηκε αύξηση στο χρόνο συγκράτησης των αναλυτών και καλύτερος διαχωρισμός των ισομερών iPPB-PPB και iBPB-BPB. Οι μελέτες βελτισμοί τροποποίηση του % ποσοστού ακετονιτριλίου στα 34% βελτιώνεται ακόμη περισσότερο ο διαχωρισμός των ισομερών parabens έτσι αποφασίστηκε ότι η βέλτιστη ανάλυση επιτυγχάνεται με 34% ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση και 49,2 mM συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου παρουσία 0,1% HCOOH.

6.3.2.2 Επίδραση της συγκέντρωσης του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος

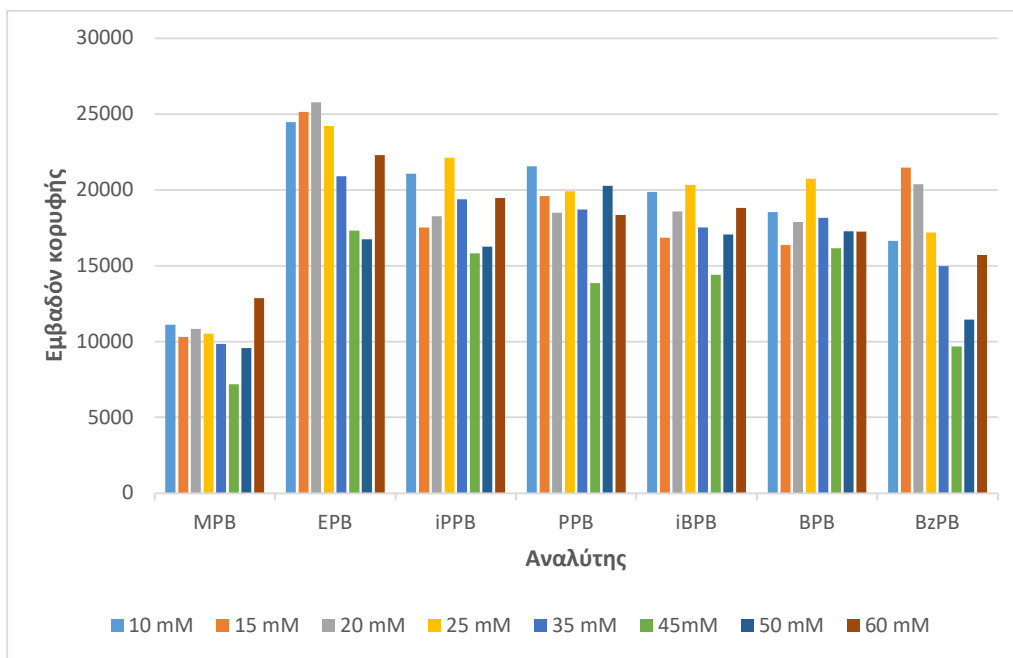
Ακολούθως μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση διατηρώντας σταθερό το % ποσοστό του ακετονιτριλίου στο 65% και το ποσοστό του μυρμηκικού οξέος σε 0,1%. Οι συγκεντρώσεις του μυρμηκικού αμμωνίου που μελετήθηκαν κυμάνθηκαν από 10 έως 60 mM. Κατά τη διάρκεια μελέτης αυτής η κινητή φάση αποτελούταν από ακετονιτρίλιο/υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 35/65 v/v παρουσία 0,1% HCOOH. Για τις μελέτες χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος τα οποία κατεργάσθηκαν σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες κατεργασίας FPSE.

Στο σχήμα 6.3 παρουσιάζεται η επίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης στις τιμές $\log k'$ των αναλυτών. Σε όλες τις περιπτώσεις των κινητών φάσεων που μελετήθηκαν πρώτα οι αναλύτες εκκλούνται με την ακόλουθη σειρά: MPB, EPB, iPPB, PPB, iBPB, BPB και τελευταίο το BzPB, κάτι που είναι σύμφωνο με το μηχανισμό συγκράτησης στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, δηλαδή όσο αυξάνεται η λιποφιλία τους, όπως φαίνεται από τις τιμές $\log k'$ του πίνακα 6.1 τόσο αργότερα εκκλούνται. Επιπλέον όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του άλατος παρατηρείται μικρή αύξηση της συγκράτησης των αναλυτών ενώ σε όλες τις συγκεντρώσεις του άλατος που μελετήθηκαν υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός των ισομερών του iBPB από το PBP και του iBPB από το BPB.



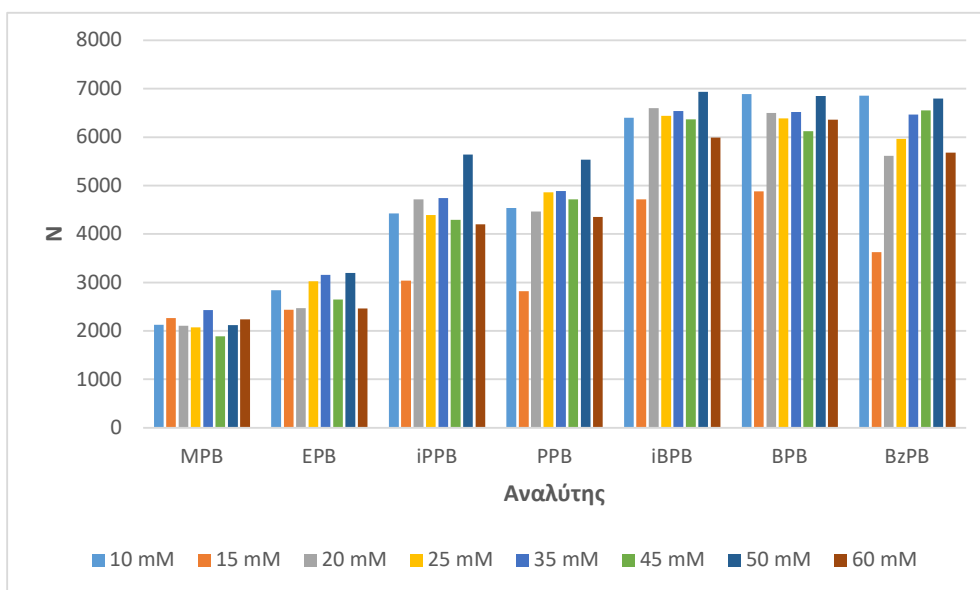
Σχήμα 6.3. Σχηματικό διάγραμμα της επίδρασης της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στη συγκράτηση των αναλυτών.

Στο σχήμα 6.4 παρουσιάζεται η επίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης στο εμβαδόν της χρωματογραφικής κορυφής του κάθε αναλύτη.



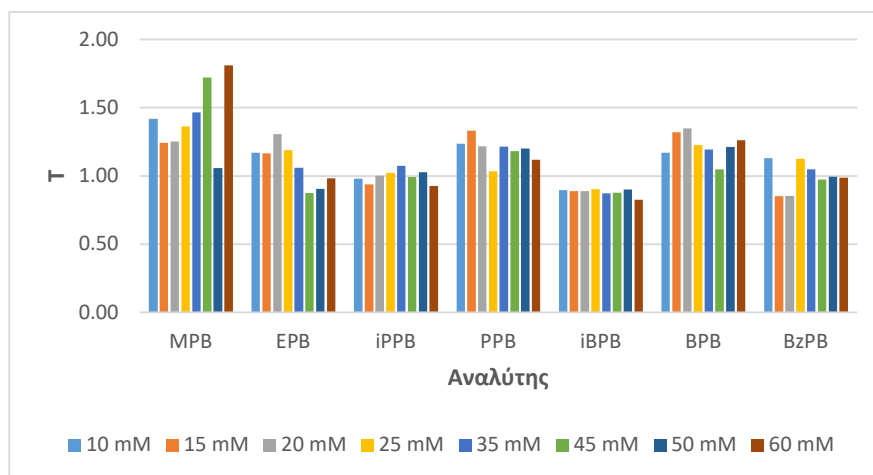
Σχήμα 6.4. Επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στο εμβαδόν κορυφής των αναλυτών.

Στο σχήμα 6.5 παρουσιάζεται η επίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης στον αριθμό των θεωρητικών πλακών.



Σχήμα 6.5. Επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στον αριθμό των θεωρητικών πλακών.

Στο σχήμα 6.6 παρουσιάζεται η επίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης του υδατικού ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης στον παράγοντα συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών.



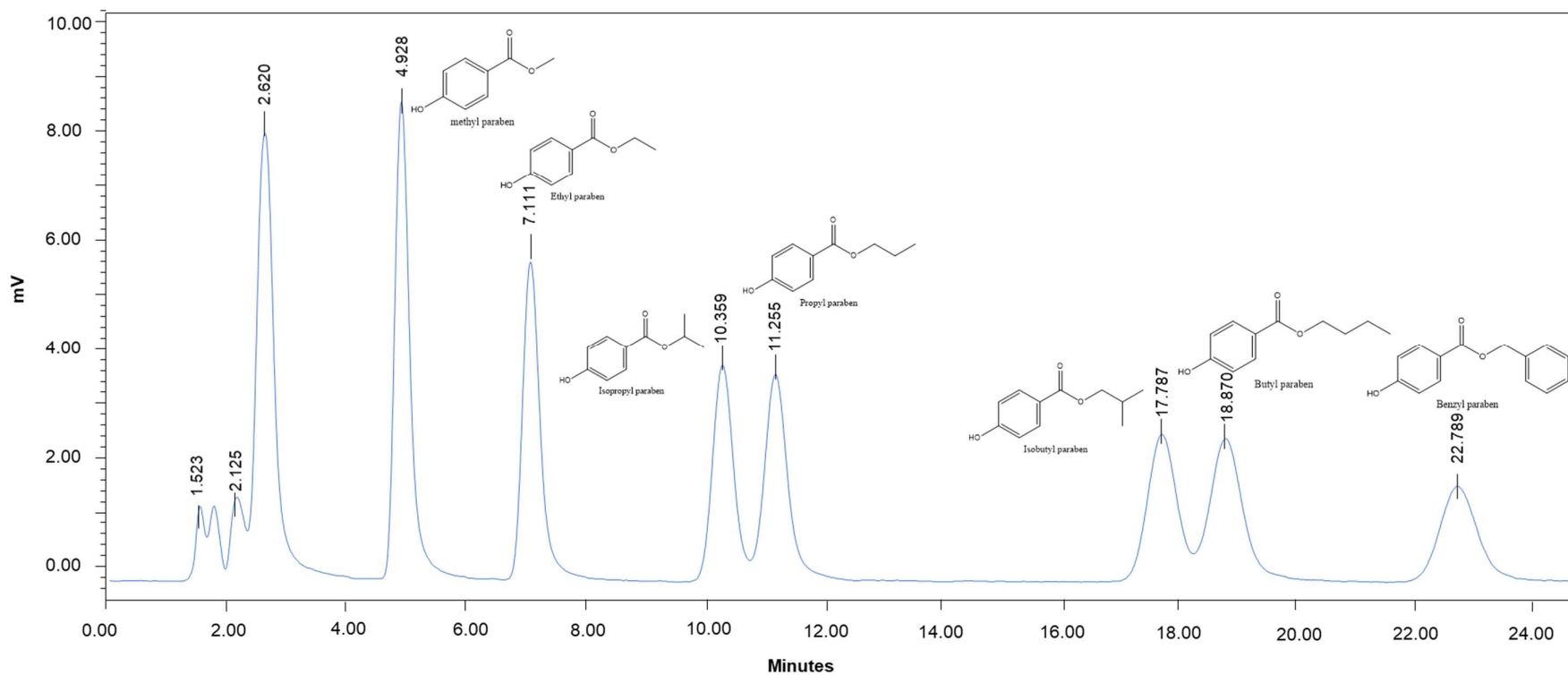
Σχήμα 6.6. Επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στον παράγοντα συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών.

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα με αύξηση της συγκέντρωσης του άλατος της κινητής φάσης βελτιώνεται η απόδοση και η συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών και μειώνεται η πίεση της στήλης. Ως βέλτιστη συγκέντρωση μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση επιλέχθηκε τα 50 mM.

6.3.2.3 Επίδραση της προσθήκης και του είδους οξέος

Σε προκαταρκτικά πειράματα διαπιστώθηκε ότι με την προσθήκη 100 μL μυρμηκικού οξέος (HCOOH) και ρύθμιση της τιμής του pH της κινητής φάσης βελτιώνεται η συμμετρία και η μορφή των χρωματογραφικών κορυφών για όλους τους αναλύτες. Τελικά ως βέλτιστη επιλέχθηκε κινητή φάση που αποτελείται από μίγμα ακετονιτριλίου και 49,2 mM υδατικό ρυθμιστικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου σε αναλογία 34/66 v/v + 0.1% HCOOH με ταχύτητα ροής $0,25 \text{ mL min}^{-1}$ και μήκος κύματος ανίχνευσης $\lambda=257 \text{ nm}$ στο οποίο οι εστέρες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος παρουσιάζουν τη μέγιστη απορρόφηση. Στο Σχήμα 6.7 παρουσιάζεται χρωματογράφημα μεικτού διαλύματος των αναλυτών συγκέντρωσης 500 ng mL^{-1} το οποίο αναλύθηκε στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Ο χρόνος έκλουσης για

το methyl paraben είναι 4,93 λεπτά, για το ethyl paraben είναι 7,11 λεπτά, για το isopropyl paraben είναι 10,36 λεπτά, για το propyl paraben 11,26 λεπτά, για το isobutyl paraben είναι 17,79 λεπτά, για το butyl paraben 18,88 λεπτά και για το benzyl paraben είναι 22,79 λεπτά.



Σχήμα 6.5 Τυπικό χρωματογράφημα μεικτού διαλύματος των αναλυτών συγκέντρωσης 500 ng mL^{-1} σε κάθε αναλύτη και αναλυμένου στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS1 C-18, Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτρίλιου και 49,2 mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου σε αναλογία 34/66 v/v + 0.1% HCOOH, ταχύτητα ροής: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, Ανιχνευτής: UV-vis ρυθμισμένος να ανιχνεύει στα 257nm

6.4 Ανάπτυξη της τεχνικής κατεργασίας δείγματος

6.4.1 Ανθρώπινο πλάσμα

Το πλάσμα αποτελεί το χωρίς κύτταρα μέρος του ανθρώπινου αίματος (εξωκυττάριο υγρό). Περιέχει μια μεγάλη ποικιλία συστατικών, κυρίως πρωτεΐνες (λευκωματίνη, σφαιρίνες, ινωδογόνο), ηλεκτρολύτες, ορμόνες, βιταμίνες, λιποειδή και άλλες ουσίες. Η πολύπλοκη σύνθεση του καθιστά απαραίτητη την κατάλληλη προκατεργασία των προς ανάλυση δειγμάτων πλάσματος πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα HPLC, με σκοπό τον καθαρισμό τους και την απομάκρυνση των ουσιών που πιθανόν να παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό των αναλυόμενων ουσιών. Στην παρούσα εργασία για τον καθαρισμό των δειγμάτων και την απομόνωση των αναλυτών από το πλάσμα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE).

6.4.2 Ανάπτυξη μεθόδου κατεργασίας δείγματος με την τεχνική FPSE

Η τεχνική εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE) αποτελεί μια νέα, καινοτόμο και πολλά υποσχόμενη τεχνική. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ένα φυσικό ή συνθετικό υφασμάτινο μέσο ως υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό είναι χημικά επικαλυμμένο με τη μορφή μιας πολύ λεπτής επίστρωσης sol-gel οργανικό-ανόργανο υβριδικό προσροφητικό μέσο. Προκειμένου να επιτευχθεί μέγιστη αποδοτικότητα της τεχνικής μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν διάφοροι παράγοντες σε κάθε στάδιο της τεχνικής μεταβάλλοντας κάθε φορά έναν παράγοντα και διατηρώντας του υπόλοιπους σταθερούς.

Η βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας πραγματοποιήθηκε με ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος των αναλυτών σε συγκέντρωση 50 ng mL^{-1} και 250 ng mL^{-1} . Οι παράγοντες οι οποίοι μελετήθηκαν είναι : το προσοφνητικό μέσο της FPSE, το μέγεθος και το σχήμα του μέσου, ο όγκος του δείγματος στο στάδιο της εκχύλισης, ο χρόνος και ο τρόπος ανάδευσης στην εκχύλιση, ο τρόπος και ο διαλύτης έκπλυσης του μέσου, το είδος του οργανικού διαλύτη στην παραλαβή, η εξάτμιση

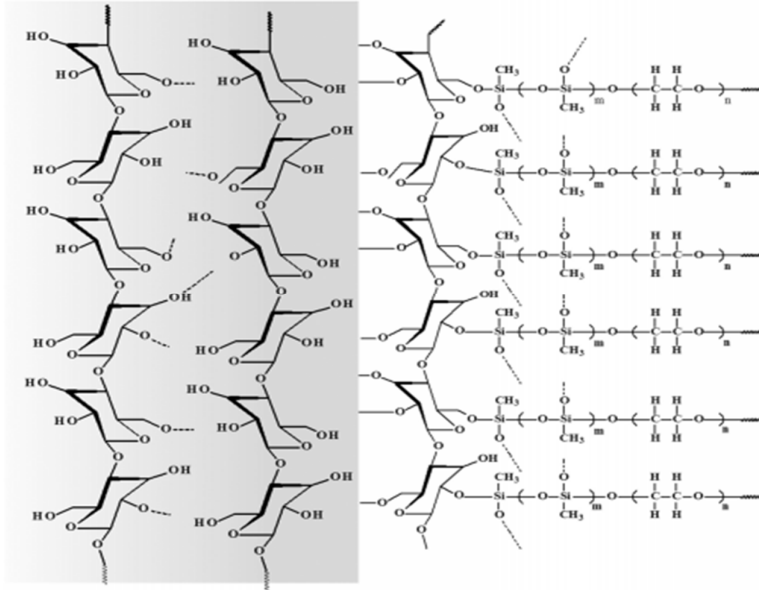
του εκλούσματος και στη συνέχεια η επανασύστασή του και στο τέλος το φίλτρο διήθησης.

6.4.2.1 Επιλογή του είδους του προσροφητικού μέσου FPSE

Ο πρώτος παράγοντας ο οποίος εξετάστηκε είναι το είδος του προσροφητικού μέσου για την εκχύλιση των επτά parabens. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.1 όπου παρουσιάζονται τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των αναλυτών, τα parabens παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος πολικότητας, παραδειγματικά αναφέρεται ότι το methyl paraben έχει τιμή $\log k_{ow}$ 1,66 ενώ το περισσότερο λιπόφιλο benzyl paraben έχει τιμή $\log k_{ow}$ 3,56. Επομένως με βάση τα παραπάνω θα ήταν καλύτερη η επιλογή πολικών ή μέτριας πολικότητας προσροφητικών μέσων με υπόστρωμα κυτταρίνης για τη συγκράτηση των parabens. Ένα σημαντικό κριτήριο επιλογής προσροφητικού μέσου για αναλύσεις βιολογικών δειγμάτων είναι η βιοσυμβατότητά του. Στην περίπτωση ασυμβασίας η μεμβράνη του προσροφητικού μέσου μπλοκάρει όταν έρχεται σε άμεση επαφή με το βιολογικό υλικό και τα συστατικά που βρίσκονται σε αυτό. Λαμβάνοντας υπόψη τα πιο πάνω πραγματοποιήθηκαν δοκιμές σε δύο διαφορετικά προσροφητικά μέσα το sol-gel CW 20M (Carbowax) και το sol-gel PTHF (polytetrahydrofuran) τα χαρακτηριστικά των οποίων φαίνονται στον πίνακα 6.5.

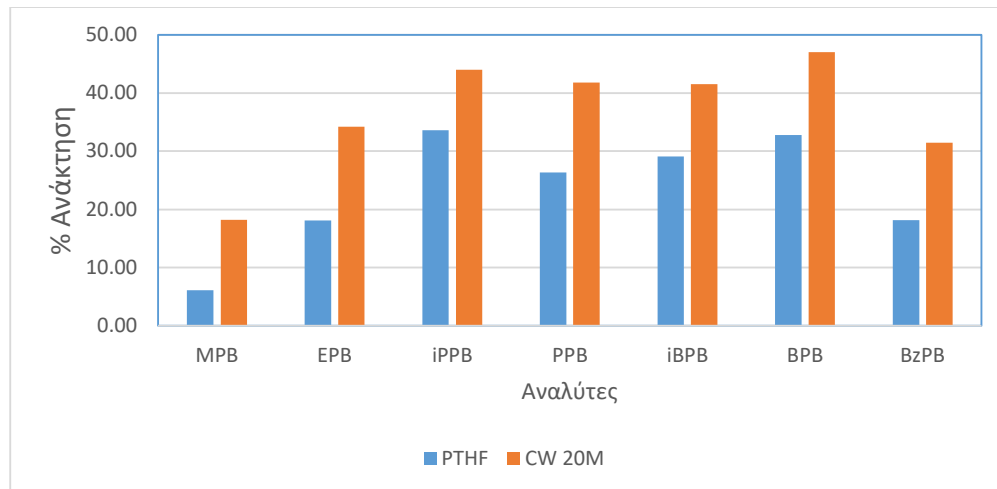
Επικάλυψη sol-gel	Υπόστρωμα	Sorbent Loading (mg cm ⁻²)	Πολικότητα
PTHF	Κυτταρίνη	3,96	Μέτριας πολικότητας
CW 20M	Κυτταρίνη	8,64	Υψηλής πολικότητας

Στο σχήμα 6.7 παρουσιάζεται σχηματική αναπαράσταση του υποστρώματος κυτταρίνης με επίστρωση sol-gel CW 20M.



Σχήμα 6.7 Σχηματική αναπαράσταση υποστρώματος κυτταρίνης με επίστρωση sol-gel CW 20M

Οι αρχικές δοκιμές πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση υφασμάτινου μέσου τετράγωνου σχήματος και διαστάσεων 1,0 x 1,0 cm (1,0 cm²), στη συνέχεια οι διαστάσεις τροποποιήθηκαν σε 1,5 x 1,5 cm (2,25 cm²) διότι με αύξηση του προσροφητικού μέσου αυξήθηκε η % ανάκτηση για όλους τους αναλύτες.



Σχήμα 6.8 Διάγραμμα της επίδρασης του είδους του προσροφητικού μέσου στην % ανάκτηση των αναλυτών

Ακολούθως υπολογίστηκαν οι % ανακτήσεις των επτά παραβενς και για τα δύο μέσα της FPSE και όπως φαίνεται στο σχήμα 6.7 το μέσο CW 20M δίνει μεγαλύτερες

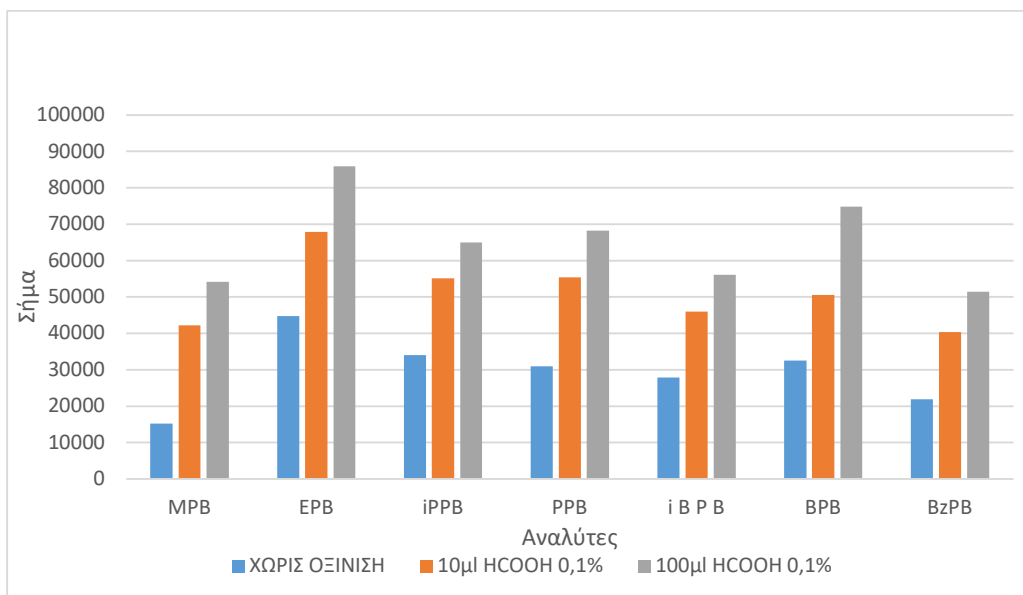
ανακτήσεις για όλους τους αναλύτες οι οποίες κυμαίνονται σε τιμές από 18,23-47,02%. Επομένως το μέσο FPSE που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στη μέθοδο προκατεργασίας είναι το sol-gel CW 20M (σχήμα 6.7).

6.4.2.2 Βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης των αναλυτών μελετήθηκαν οι ακόλουθοι παράγοντες: ποσότητα του βιολογικού δείγματος, ο διαλύτης εκχύλισης και ο χρόνος της ανάδευσης.

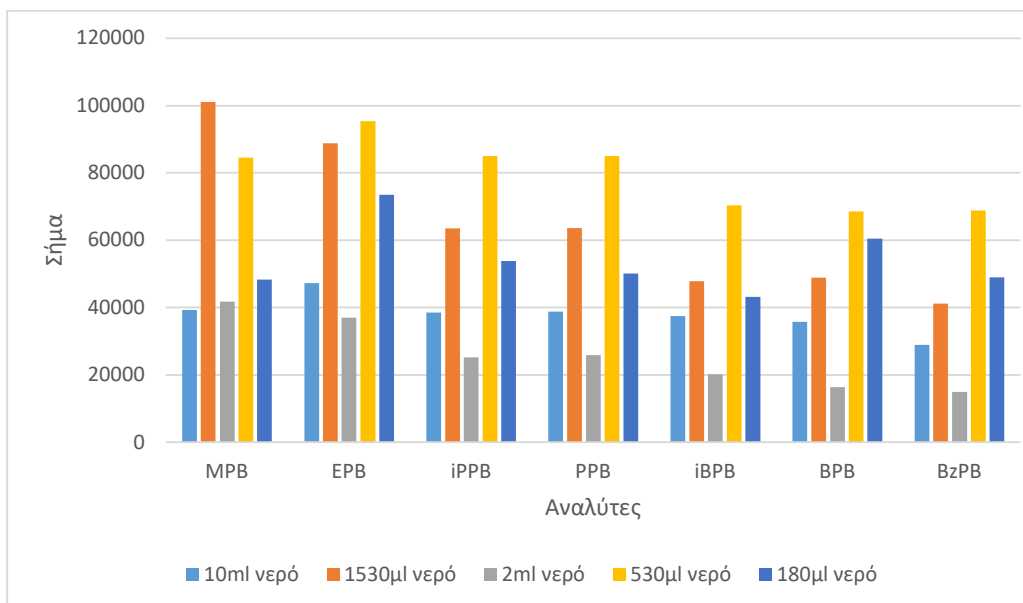
Ποσότητα βιολογικού δείγματος: Στις δοκιμές που έγιναν αναλύθηκαν δείγματα χρησιμοποιώντας διαφορετικούς όγκους ανθρώπινου πλάσματος 50 μL και 100 μL . Παρατηρήθηκε ότι με την προσθήκη 50 μL πλάσματος υπήρχε λιγότερος θόρυβος και τα χρωματογραφήματα ήταν πιο καθαρά, επομένως κρατήθηκε αυτό ως βέλτιστος όγκος βιολογικού υλικού που μπορεί να αναλυθεί.

Διαλύτης εκχύλισης: Ως διαλύτης για την εκχύλιση χρησιμοποιήθηκε υπερκάρθαρo νερό και ακολούθως μελετήθηκε η προσθήκη διαφόρων ποσοτήτων μυρμηκικού οξέος. Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.10, η οξίνιση του δείγματος εκχύλισης υποβοηθά τη συγκράτηση των αναλυτών στο προσροφητικό μέσο καθώς αυξήθηκε το σήμα των αναλυτών. Στη μελέτη αυτή προστέθηκαν 10 και 100 μL HCOOH 0,1% σε δείγματα πλάσματος και αποφασίστηκε ότι η προσθήκη ποσότητας 100 μL HCOOH 0.1% στο στάδιο της εκχύλισης.



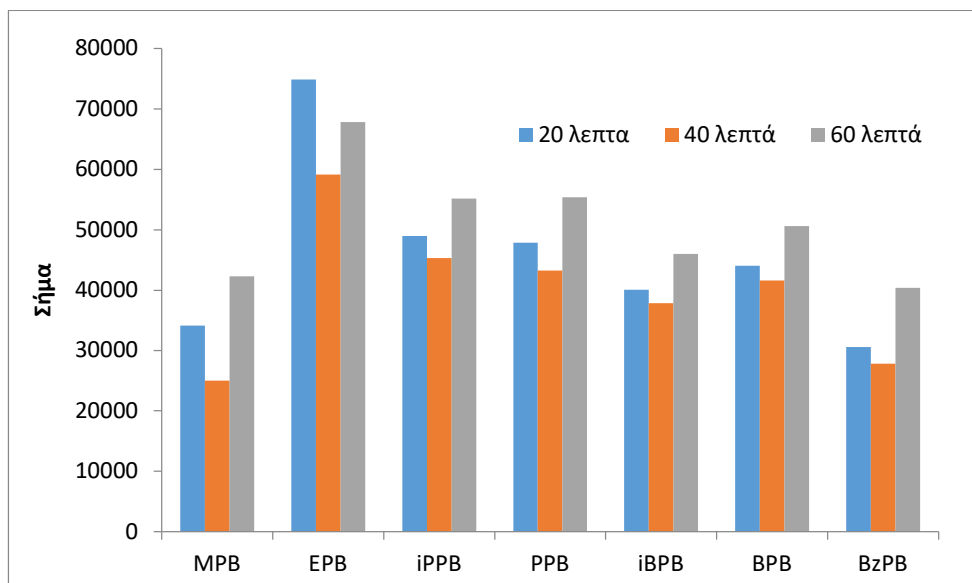
Σχήμα 6.9 Επίδραση της προσθήκη HCOOH 0,1% κατά την εκχύλιση στο σήμα των αναλυτών

Ακολούθως μελετήθηκε η προσθήκη διαφορετικής ποσότητας νερού στο στάδιο της εκχύλισης, μεταβάλλοντας και την προσθήκη του οξέος κάθε φορά ανάλογα. Από τα αποτελέσματα (σχήμα 6.10) φαίνεται ότι η καλύτερη επιλογή είναι η προσθήκη 530 μL νερού σε συνδυασμό με 200 μL 0,1% HCOOH. Η προσθήκη του οξέος σε μικρό ποσοστό κρίθηκε αναγκαία τόσο για τη διευκόλυνση της συγκράτησης των αναλυτών στο προσροφητικό μέσο που έχουν όξινες χαρακτηριστικές ομάδες, όσο και για την απομάκρυνση των βασικών, μη πολικών και ουδέτερων συστατικών του πλάσματος



Σχήμα 6.10 Επίδραση της ποσότητας νερού στο στάδιο της εκχύλισης.

Χρόνος ανακίνησης: Μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου ανακίνησης στο στάδιο της εκχύλισης. Το μέσο FPSE τοποθετείται με ειδική λαβίδα στο φιαλίδιο με το δείγμα και το δείγμα ανακινείται σε ειδική συσκευή περιστροφής δειγμάτων, ρυθμίζοντας την γωνιά περιστροφής στις 25° και την ταχύτητα περιστροφής στα 12. Τα δείγματα ανακινούνται για 20 , 40 και 60 λεπτά.

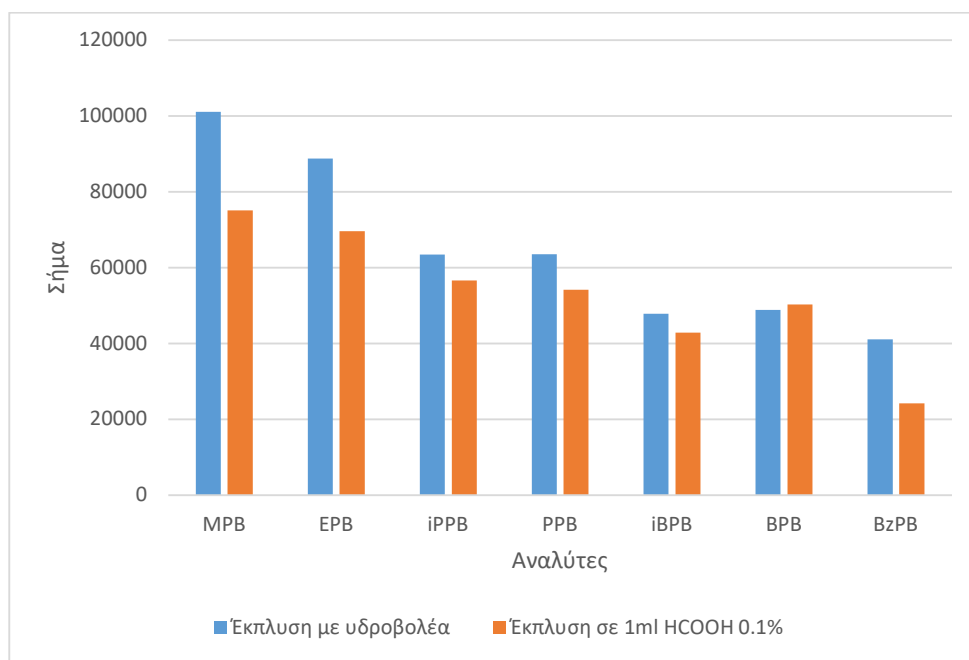


Σχήμα 6.11 Επίδραση του χρόνου ανακίνησης κατά τη διάρκεια του σταδίου εκχύλισης στο σήμα

Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.11, όσο αυξάνεται ο χρόνος ανακίνησης τόσο αυξάνεται και το σήμα των αναλυτών, αλλά δεν υπάρχει ιδιαίτερη διαφορά από τα 20 στα 60 λεπτά. Ο χρόνος ανακίνησης που επιλέχθηκε ως βέλτιστος στο στάδιο εκχύλισης είναι 20 λεπτά για εξοικονόμηση χρόνου.

6.4.2.3 Βελτιστοποίηση των συνθηκών έκπλυσης του προσροφητικού μέσου

Αμέσως μετά το στάδιο της εκχύλισης το μέσο εκπλένεται και στη συνέχεια τοποθετείται σε διηθητικό χαρτί για ξήρανση για 5 λεπτά. Οι τρόποι έκπλυσης οι οποίοι εξετάστηκαν ήταν με περίπου 2 mL απιοντισμένου ύδατος με χρήση υδροβολέα, σε φιαλίδιο το οποίο περιείχε 1 mL απιοντισμένο νερό για 5 min και σε φιαλίδιο το οποίο περιείχε 1 mL HCOOH 0,1% για 5 min.

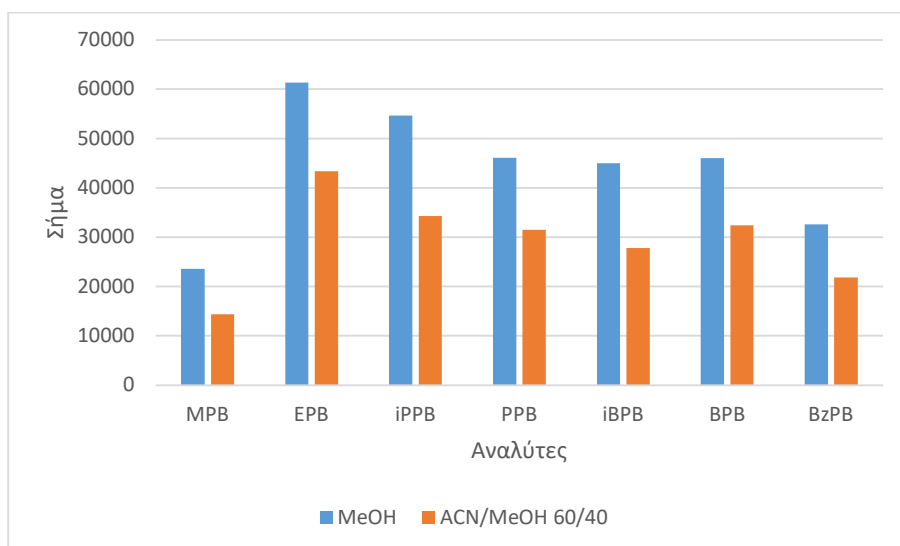


Σχήμα 6.12 Επίδραση του τρόπου έκπλυσης στο σήμα των αναλυτών.

Η έκπλυση σε φιαλίδιο με νερό δίνει καθαρότερα χρωματογραφήματα σε σχέση με την έκπλυση σε όξινες συνθήκες και η έκπλυση με νερό και χρήση υδροβολέα έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα καθώς βελτίωσε σημαντικά το εμβαδόν κορυφής των αναλυτών (σχήμα 6.12). Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε η έκπλυση του μέσου με υδροβολέα με περίπου 2 mL απιοντισμένου νερού.

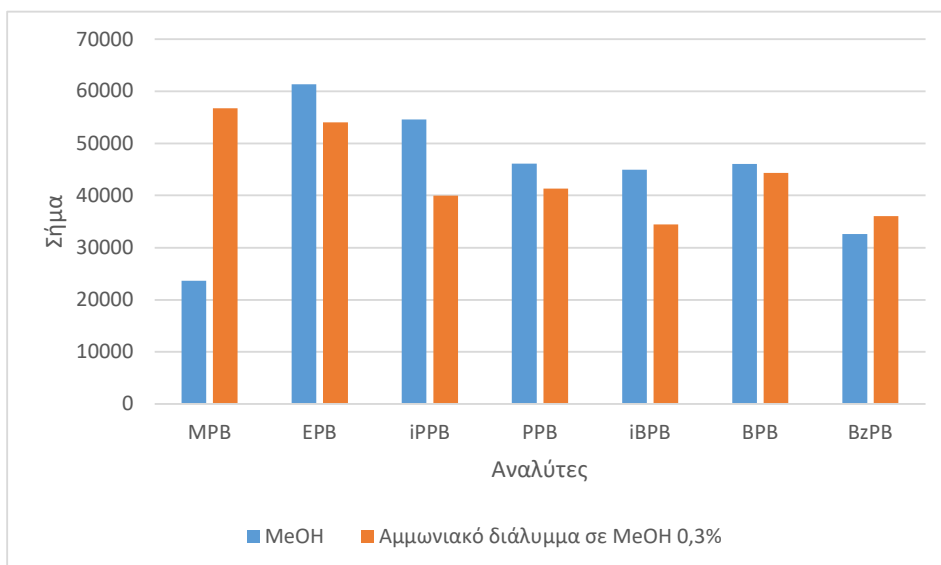
6.4.2.4 Επιλογή διαλύτη έκλουσης

Μετά την ξήρανση το πανάκι μεταφέρεται με ειδική λαβίδα σε φιαλίδιο που περιέχει το διαλύτη έκλουσης. Ακολούθως ανακινείται για 20 λεπτά στην ειδική συσκευή ανακίνησης των δειγμάτων με γωνία 25° και ταχύτητα 12 περιστροφές/λεπτό. Οι οργανικοί διαλύτες που δοκιμάστηκαν για την έκλουση ήταν: 0,6 mL μεθανόλης, 0,6 mL μίγματος ACN/MeOH σε αναλογία 60/40, v/v και 0,6 mL 0,3% αμμωνιακού διαλύματος σε μεθανόλης. Όπως φαίνεται και στο Σχήμα 6.13 ο διαλύτης έκλουσης που επιλέχθηκε είναι η MeOH.



Σχήμα 6.13 Επίδραση του είδους του διαλύτη έκλουσης στο σήμα των αναλυτών

Ακολούθως δοκιμάστηκε ως διαλύτης έκλουσης των αναλυτών 0,6 mL 0,3% αμμωνιακού διαλύματος σε μεθανόλης. Όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.14 η MeOH εξακολουθεί να αποτελεί τον οργανικό διαλύτη επιλογής για το στάδιο της έκλουσης των αναλυτών.

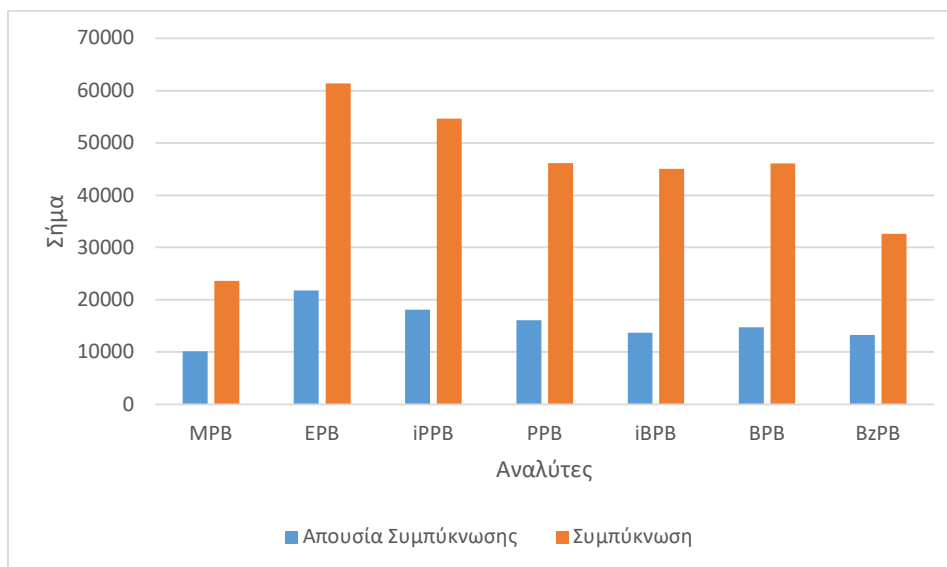


Σχήμα 6.14 Επίδραση του είδους του διαλύτη έκλουσης στο σήμα των αναλυτών

6.4.2.5 Βελτιστοποίηση των συνθηκών παραλαβής του εκλούσματος

Επιπλέον εξετάστηκε η επίδραση της συμπύκνωσης του δείγματος με εξάτμιση του διαλύτη έκλουσης και ανασύσταση πριν την ανάλυση. Το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με τη βοήθεια αερίου αζώτου (N_2) και στη συνέχεια ακολούθησε ανασύσταση με μίγμα διαλυτών ACN/AMF 15mM 60/40 v/v, διήθηση από φίλτρο Hydrophobic PTFE 0,22 μm πριν τη χρωματογραφική ανάλυση. Η συμπύκνωση και ανασύσταση του δείγματος βελτίωσε το σήμα των αναλυτών, σχήμα 6.9, επομένως η συμπύκνωση του δείγματος με αέριο άζωτο πριν την ανασύσταση είναι ένα αναγκαίο βήμα το οποίο πρέπει να προστεθεί στη μέθοδο προκατεργασίας.

Ακολούθησε έλεγχος του είδους του μικροφίλτρου σύριγγας, για το σκοπό αυτό μελετήθηκαν τα μικροφίλτρα hydrophobic PTFE 0,22 μm και τα μικροφίλτρα Nylon 0,45 μm. Παρατηρήθηκε ότι το φίλτρο Nylon δίνει καλή ανάκτηση αλλά εμφανίζει και άλλες κορυφές στο χρωματογράφημα. Επομένως για τη διήθηση των δειγμάτων επιλέχθηκε το φίλτρο hydrophobic PTFE 0,22 μm.



Σχήμα 6.9 Διάγραμμα επίδρασης της συμπύκνωσης στο σήμα των αναλυτών

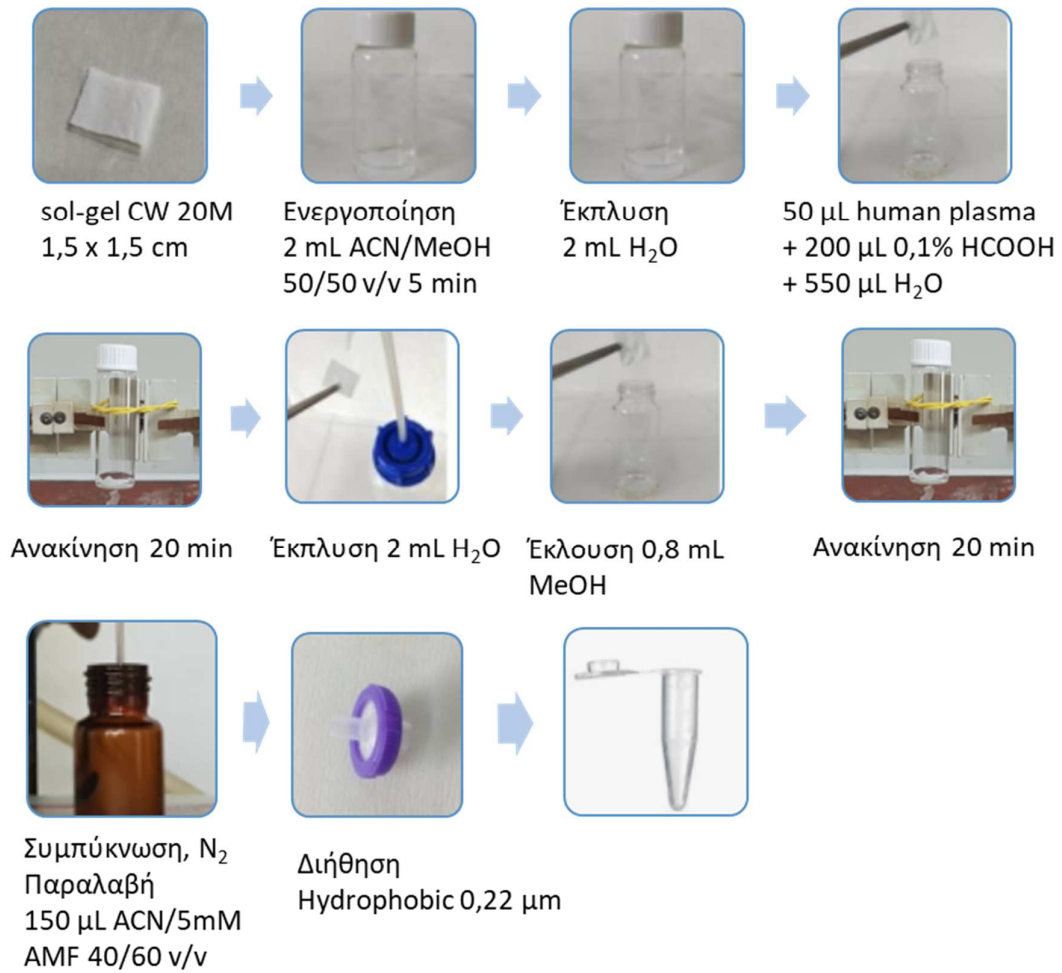
Επιλέχθηκε ο διαλύτης ανασύστασης του δείγματος να προσομοιάζει στην κινητή φάση, επομένως τα καλύτερα αποτελέσματα λαμβάνονται όταν γίνεται ανασύσταση με 150 μL μίγματος ACN/5mM AMF σε αναλογία 40/60 v/v.

6.4.2.6 Βέλτιστες συνθήκες της τεχνικής FPSE

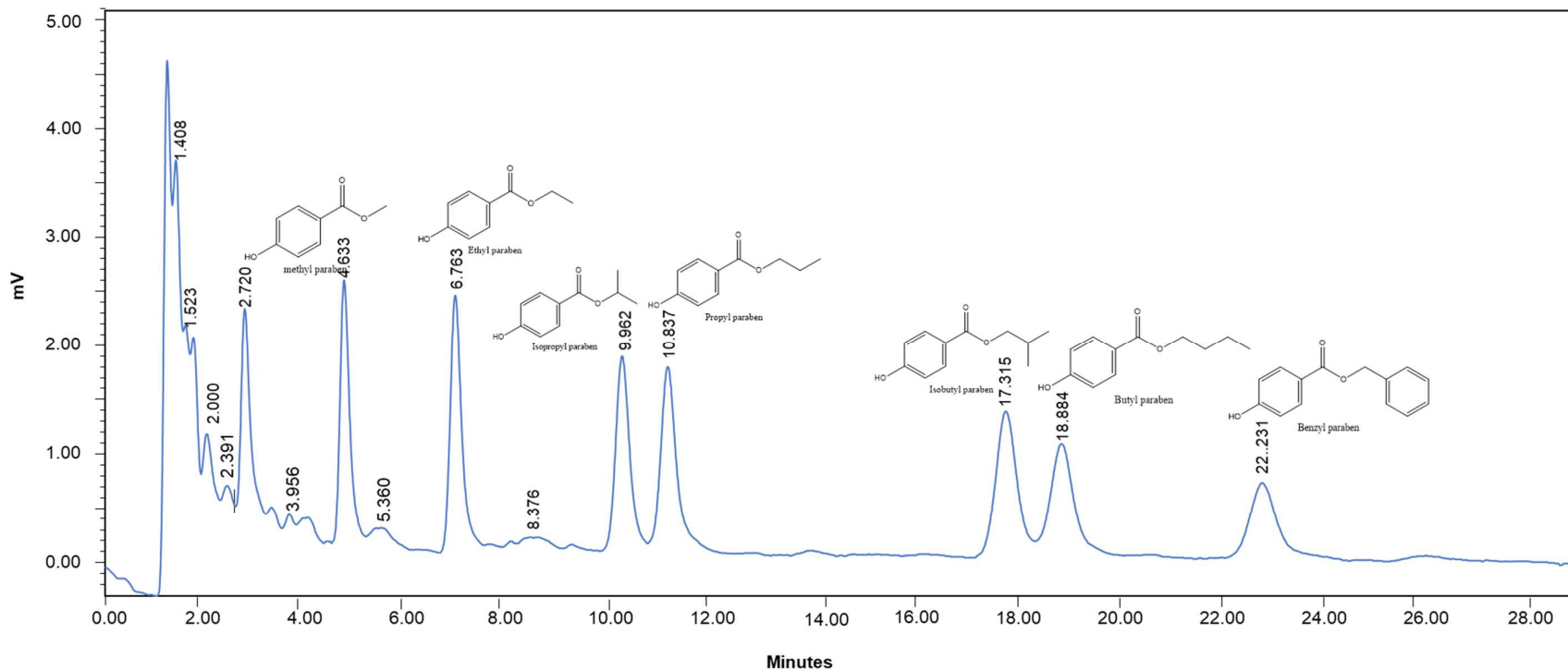
Τελικό πρωτόκολλο της τεχνικής προκατεργασίας FPSE για την εκχύλιση των parabens από ανθρώπινο πλάσμα περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια (σχήμα 6.18):

1. Ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου
 - Τοποθέτηση του προσροφητικού μέσου σε 2 mL διαλύματος ACN/MeOH 50/50 v/v για 5 λεπτά.
 - Έκπλυση με 2mL απιοντισμένο νερό.
2. Εκχύλιση
 - Εμβάπτιση του προσροφητικού μέσου σε φιαλίδιο που περιέχει 50 μL ανθρώπινου πλάσματος και προσθήκη 550 μL υπερκάθαρου νερού και 200 μL 0,1% HCOOH.
 - Ανακίνηση σε ειδική συσκευή για 20 λεπτά, γωνιά περιστροφής 25° και ταχύτητα περιστροφής 12.

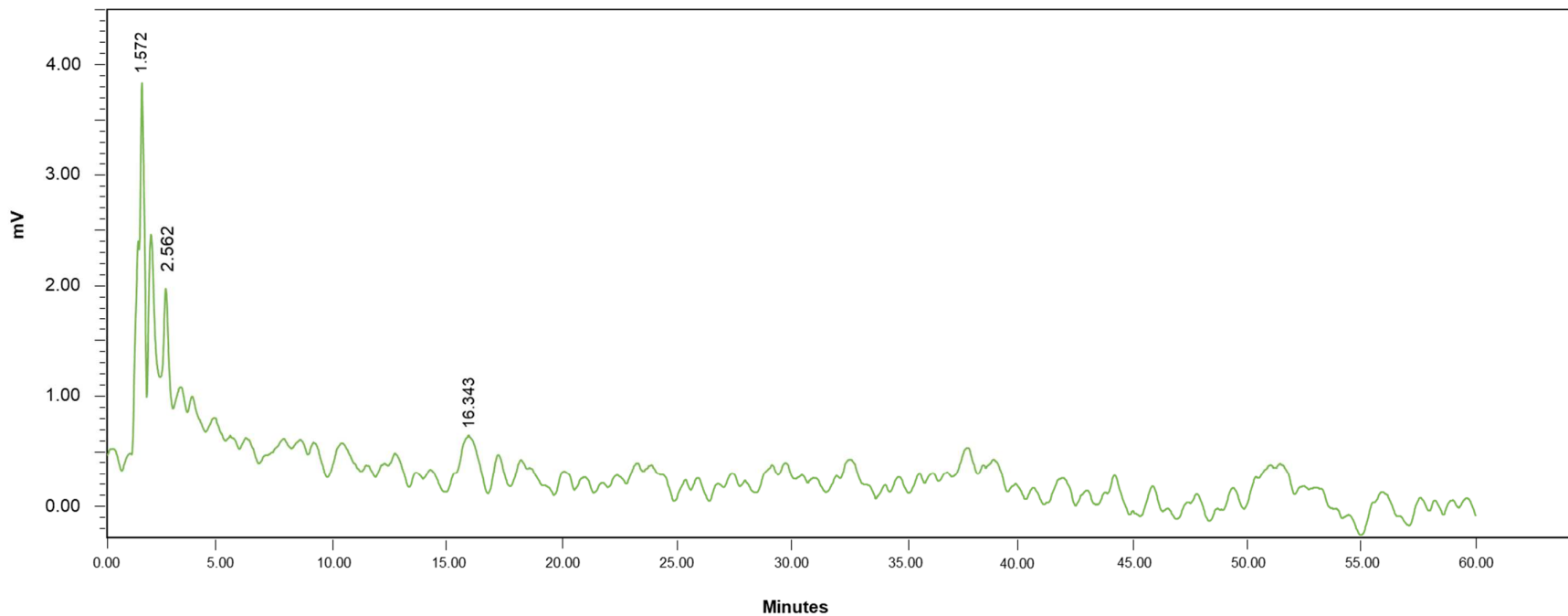
3. Έκπλυση του προσροφητικού μέσου με απιοντισμένο νερό και ξήρανση με διηθητικό χαρτί για 5 λεπτά.
4. Έκλουση των αναλυτών με 800 μL MeOH και ανακίνηση σε ειδική συσκευή για 20 λεπτά.
5. Παραλαβή του εκλούσματος, εξάτμισή του μέχρι ξηρού με αέριο άζωτο, ανασύσταση με 150 μL ACN/5mM AMF 40/60 v/v και διήθηση από μικροφίλτρο σύριγγας Hydrophobic PTFE 0,22 μm .
6. Τοποθέτηση του μέσου FPSE σε 2 mL διαλύματος ACN/MeOH 50/50 v/v για 5 λεπτά, και ξήρανση για 5 λεπτά σε διηθητικό χαρτί πριν την αποθήκευσή του σε υάλινο αεροστεγές δοχείο για μελλοντική χρήση.



Σχήμα 6.10 Πορεία κατεργασίας του βιολογικού δείγματος



Σχήμα 6.11. Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος πλάσματος εμβολιασμένο με τους αναλύτες σε συγκέντρωση 500 ng mL^{-1} το οποίο αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS1 C-18, Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτρίλιου και 49,2 mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου σε αναλογία 34/66 v/v + 0.1% HCOOH, ταχύτητα ροής: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$, Ανιχνευτής: UV-vis ρυθμισμένος στα 257nm.

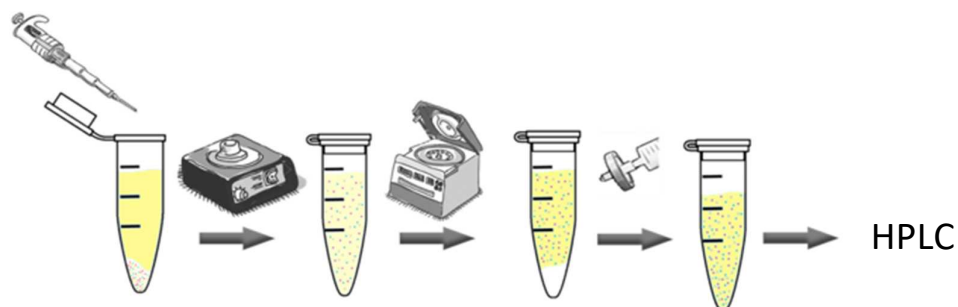


Σχήμα 6.12. Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος πλάσματος το οποίο αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες καταγραφή του χρωματογραφήματος για 60 λεπτά. Αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS1 C-18, Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτρίλιου και 49,2 mM υδατικού διαλύματος μυρμηκικού αμμωνίου σε αναλογία 34/66 v/v + 0.1% HCOOH , ταχύτητα ροής: 0,25mL min⁻¹, Ανιχνευτής: UV-vis ρυθμισμένος στα 257nm.

Στο Σχήμα 6.12 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος πλάσματος εμβολιασμένο με τους αναλύτες σε συγκέντρωση 500 ng mL⁻¹ το οποίο αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος στις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Με τις παραπάνω συνθήκες ο χρόνος έκλουσης για το methyl paraben είναι 4,63 λεπτά, για το ethyl paraben είναι 6,76 λεπτά, για το isopropyl paraben είναι 9,96 λεπτά, για το propyl paraben 10,84 λεπτά, για το isobutyl paraben είναι 17,32 λεπτά, για το butyl paraben 18,86 λεπτά και για το benzyl paraben είναι 22,24 λεπτά. Στο Σχήμα 6.12 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος ανθρώπινου πλάσματος σύμφωνα με τις βέλτιστες συνθήκες κατεργασίας δείγματος και έτσι αποδείχθηκε ότι δεν υπάρχει σημαντική παρεμπόδιση στα σημεία έκλουσης των αναλυτών.

6.6 Σύγκριση FPSE με κατακρήμνιση πρωτεϊνών (PP)

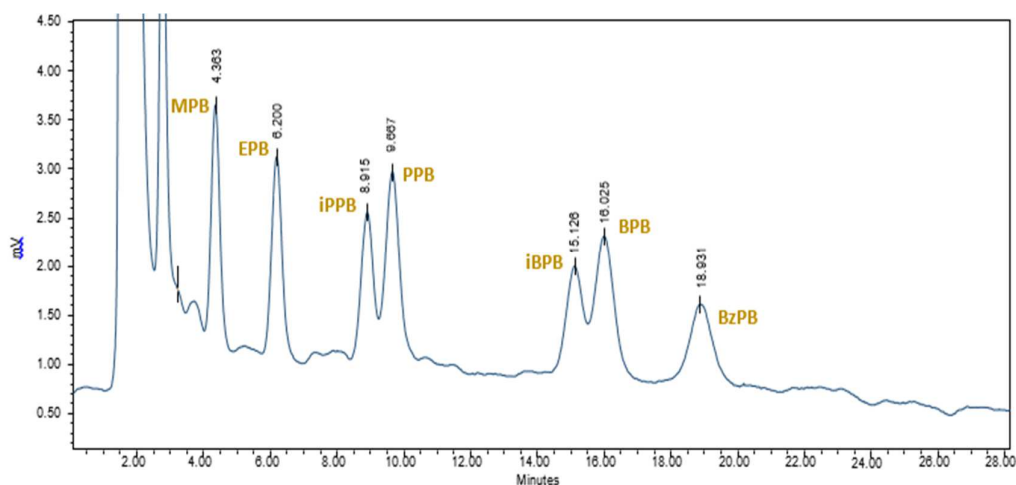
Η κατακρήμνιση πρωτεϊνών αποτελεί μια γρήγορη, απλή και οικονομική μέθοδο προετοιμασίας βιολογικών δειγμάτων, κατά την οποία χρησιμοποιούνται διαλύματα μεθανόλης, ακετονιτριλίου ή οξέος σε αναλογία μεγαλύτερη από 3:1 v/v με το πλάσμα. Στη συνέχεια γίνεται έντονη ανακίνηση για λίγα λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση. Οι πρωτεΐνες του βιολογικού υλικού καθιζάνουν υπό μορφή λευκού ιζήματος, λαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό στο οποίο βρίσκονται οι αναλύτες και είναι έτοιμο για ανάλυση Σχήμα 6.20. Πρόκειται για μια ατελή μέθοδο καθαρισμού, επειδή δεν απομακρύνονται πολλά ενδογενή συστατικά.



Σχήμα 6.12 Απεικόνιση της μεθόδου κατακρήμνισης πρωτεϊνών

Προκειμένου να γίνει σύγκριση των δύο μεθόδων κατεργασίας φτιάχτηκαν και με τις δύο μεθόδους δείγματα ίδιας συγκέντρωσης. Αναλυτικά η πορεία κατακρήμισης πρωτεϊνών περιλαμβάνει τα ακόλουθα βήματα:

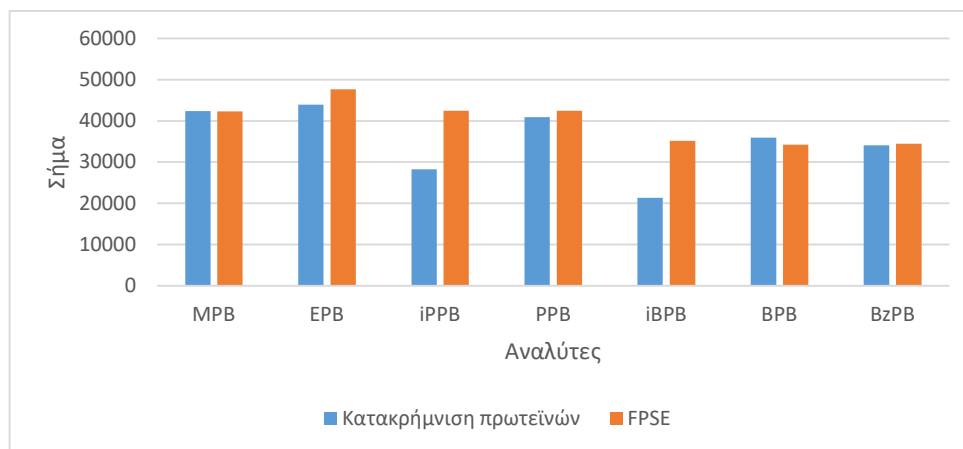
Σε ακριβώς 50 μL πλάσματος, προστίθενται 200 μL μικτού διαλύματος εργασίας των αναλυτών (αραιωμένο με ακετονιτρίλιο), 20 μL διαλύματος άλατος 7,5 mM HCOONH₄ και 800 μL ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια γίνεται ανάδευση για 1 λεπτό σε vortex και φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στους 4 °C. Ακολουθεί παραλαβή του υπερκείμενου υγρού, εξάτμιση μέχρι ξηρού με αέριο άζωτο, επανασύσταση του διήθηση με φίλτρα Hydrophobic PTFE 0,22 μm και εισαγωγή στο σύστημα HPLC. Στο σχήμα 6.13 παρουσιάζεται χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος που προκύπτει μετά από κατεργασία του δείγματος με τη διαδικασία της κατακρήμισης πρωτεϊνών.



Σχήμα 6.13 Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος πλάσματος που έχει υποστεί κατακρήμιση πρωτεϊνών.

Όπως είναι φανερό από το παραπάνω χρωματογράφημα δε διαχωρίζονται ικανοποιητικά τα ισομερή parabens καθώς παρεμποδίζεται η χρωματογραφία τους από άλλα συστατικά του πλάσματος τα οποία δεν απομακρύνονται με την κατακρήμιση των πρωτεϊνών. Με βάση τα αποτελέσματα (σχήμα 6.14) το εμβασμόν κορυφής του isopropyl paraben και του isobutyl paraben είναι μικρότερο όταν η

κατεργασία των δειγμάτων έγινε με κατακρήμνιση πρωτεϊνών. Επομένως η προκατεργασία FPSE προτιμάται έναντι της κατακρήμνισης πρωτεϊνών.



Σχήμα 6.13 Σύγκριση μεθόδου κατακρήμνισης πρωτεϊνών και FPSE

6.7 Αξιολόγηση μεθόδου

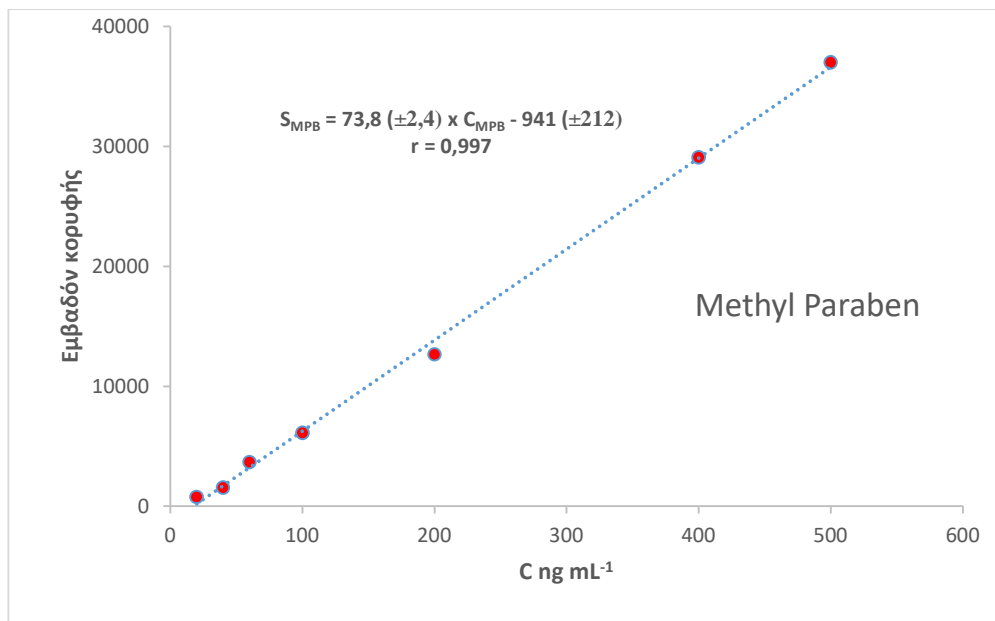
6.7.1 Έλεγχος γραμμικότητας – καμπύλες αναφοράς

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της μεθόδου χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από καμπύλες, τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς παρασκευάστηκαν όπως έχει ήδη περιγραφεί σε προηγούμενη παράγραφο και κατεργάστηκαν σύμφωνα με την πορεία της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο. Το εύρος των συγκεντρώσεων της καμπύλης κυμάνθηκε από 20 έως 500 ng mL⁻¹. Σε κάθε μέτρηση υπολογίζεται το εμβαδόν κορυφής του κάθε parabolen. Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS ver. 25.0. Σε όλες τις καμπύλες αναφοράς εφαρμόζεται ζυγισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, ως συντελεστής στατιστικού βάρους χρησιμοποιείται ο όρος 1/γ (όπου γ είναι το εμβαδόν κορυφής κάθε αναλύτη).

Τα αποτελέσματα για κάθε αναλύτη παρουσιάζονται στους πίνακες 6.5 έως 6.18. Σε κάθε πίνακα παρουσιάζεται η θεωρητική τιμή της συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη, το εμβαδόν κορυφής, η πειραματικά υπολογιζόμενη συγκέντρωση με βάση την

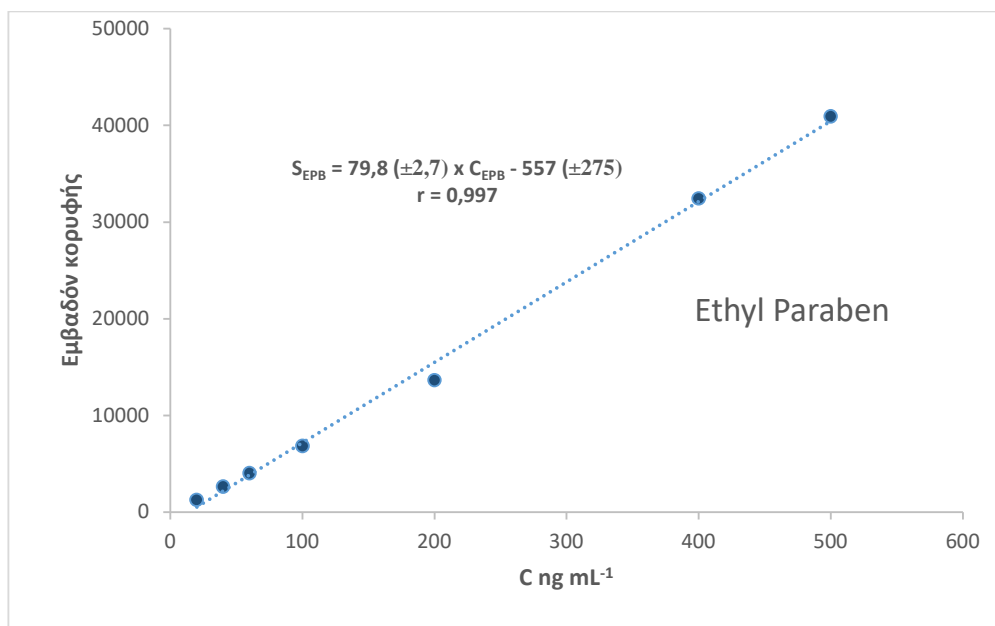
εξίσωση της καμπύλης αναφοράς καθώς και το % σχετικό σφάλμα. Οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς μετά από ανάλυση της πρώτης σειράς των εμβολιασμένων δειγμάτων πλάσματος παρουσιάζονται στα σχήματα 6.14 έως 6.20.

Πίνακας 6.5: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του MPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	773	23,32	16,6
40	1552	33,92	-15,2
60	3674	62,78	4,6
100	6114	95,97	-4,0
200	12650	184,9	-7,6
400	29081	408,4	2,1
500	36985	515,9	3,2



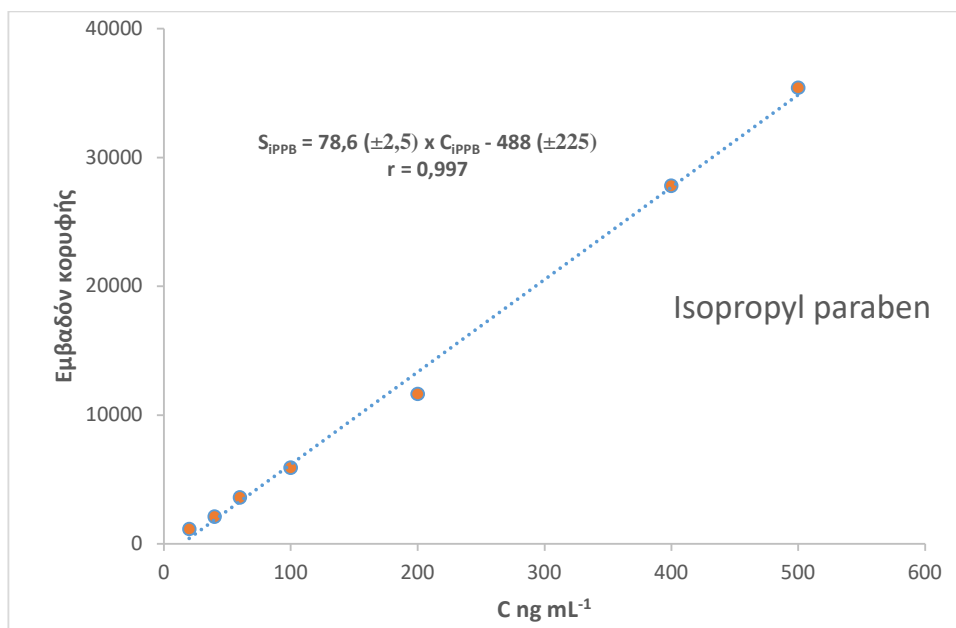
Σχήμα 6.14 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του MPB

Πίνακας 6.6: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του EPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	1279	23,03	15,1
40	2630	39,96	-0,1
60	4028	57,5	-4,2
100	6845	92,8	-7,2
200	13669	178,3	-10,8
400	32435	413,6	3,4
500	40930	520,1	4,0



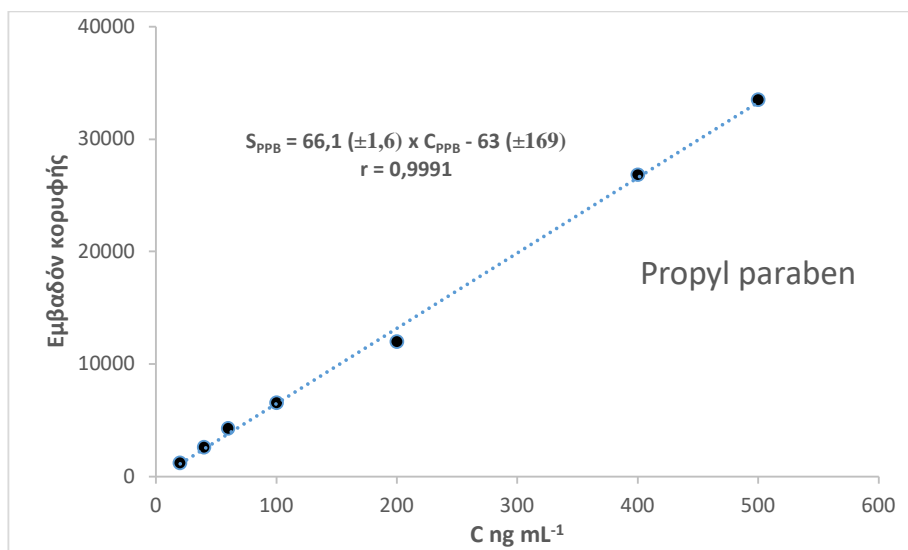
Σχήμα 6.15 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του EPB

Πίνακας 6.7: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του iPPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	1142	23,76	18,8
40	2107	37,82	-5,5
60	3583	59,34	-1,1
100	5901	93,1	-6,9
200	11641	176,8	-11,6
400	27795	412,2	3,1
500	35408	523,2	4,6



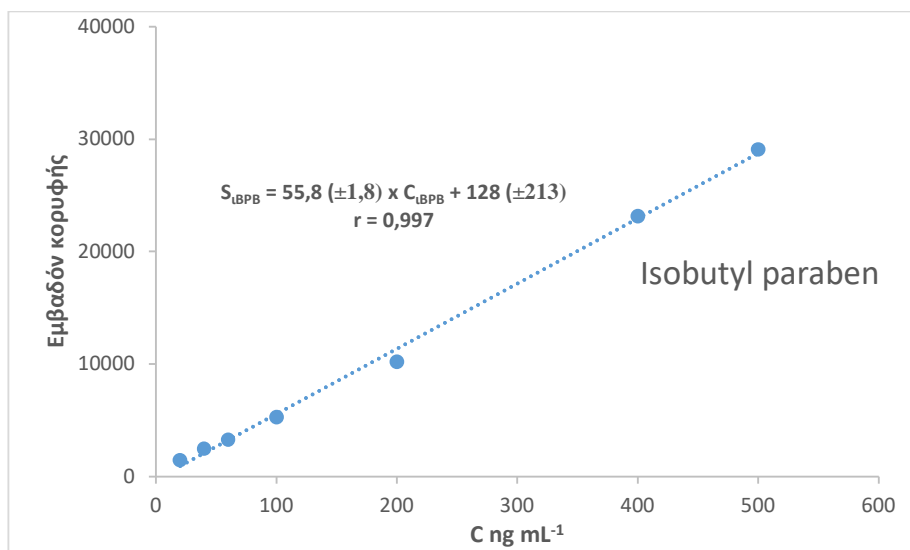
Σχήμα 6.16 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του iPPB

Πίνακας 6.8: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του PPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	1212	19,29	-3,5
40	2607	40,39	1,0
60	4297	66,0	9,9
100	6575	100,4	0,4
200	11986	182,2	-8,9
400	26821	406,6	1,7
500	33497	507,6	1,5



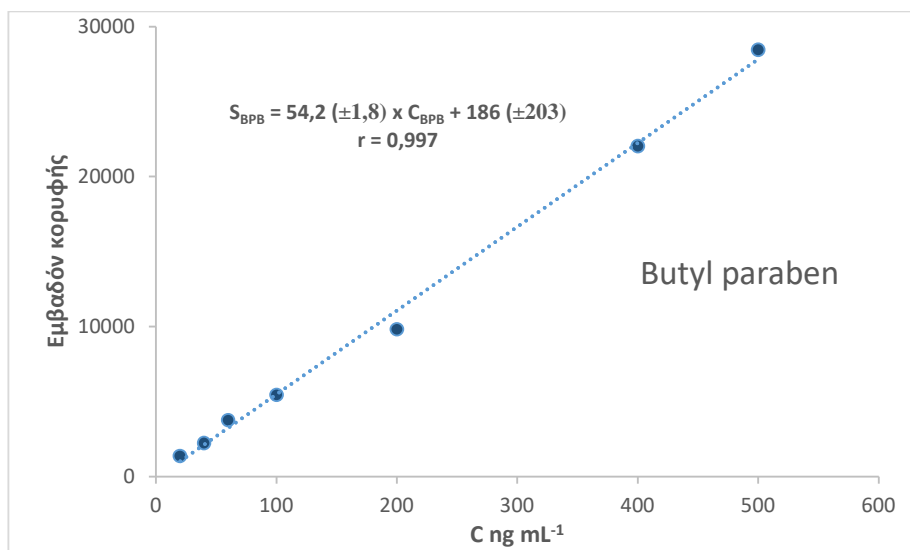
Σχήμα 6.17 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του PPB.

Πίνακας 6.9: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του iBPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	1448	23,62	18,1
40	2484	42,16	5,4
60	3282	56,43	-5,9
100	5283	92,24	-7,8
200	10193	180,1	-10,0
400	23154	411,9	3,0
500	29081	518,0	3,6



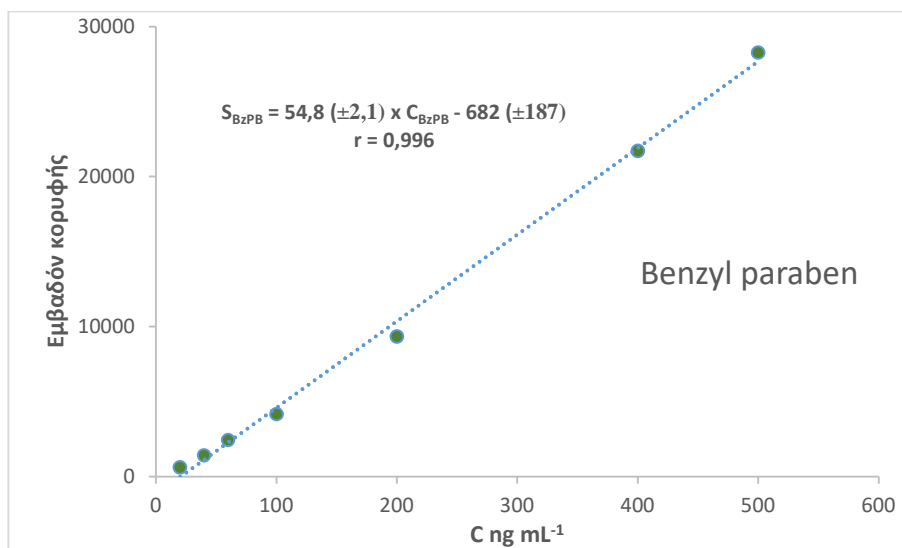
Σχήμα 6.18 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του iBPB.

Πίνακας 6.9: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του BPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	1368	21,80	9,0
40	2240	37,88	-5,3
60	3764	65,99	10,0
100	5439	96,9	-3,1
200	9817	177,65	-11,2
400	22027	402,9	0,7
500	28450	521,4	4,3



Σχήμα 6.19 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του BPB.

Πίνακας 6.10: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του BzPB			
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	610	23,59	17,9
40	1404	38,09	-4,8
60	2436	56,92	-5,1
100	4153	88,27	-11,7
200	9331	182,8	-8,6
400	21704	408,6	2,2
500	28272	528,5	5,7



Σχήμα 6.20 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του BPB.

Στον πίνακα 6.19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς του κάθε αναλύτη για κάθε εργαστηριακή μέρα και υπολογίζεται ο συντελεστής συσχέτισης r , το τυπικό σφάλμα της καμπύλης

αναφοράς S_r , η τυπική απόκλιση του σταθερού όρου καθώς και η τυπική απόκλιση της κλίσης.

Πίνακας 6.11 Αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς των parabens σε εμβολιασμένα δείγματα ανθρώπινου πλάσματος.							
Αναλύτης	Γραμμική περιοχή συγκεντρώσεων (ng mL ⁻¹)	Εξίσωση παλινδρόμησης ^α	r ^β	Τυπική απόκλιση		S _γ	a/Sa ^δ
				Κλίσης	Τομής		
Methyl paraben	20-500	S _{MPPB} =73,5 × C _{MPPB} -941	0,997	2,4	212	8,7	-4,4
Ethyl paraben	20-500	S _{EPB} =79,8 × C _{EPB} -557	0,997	2,7	275	9,2	-2,02
Isopropyl paraben	20-500	S _{IPPB} =68,6 × C _{IPPB} -488	0,996	2,5	225	9,2	-1,96
Propyl paraben	20-500	S _{PPB} =66,1 × C _{PPB} -63	0,998	1,6	169	5,8	-1,96
Isobutyl paraben	20-500	S _{iBPB} =55,8 × C _{iBPB} +128	0,997	1,9	213	7,2	0,6
Butyl paraben	20-500	S _{BPB} =54,2 × C _{BPB} +186	0,997	1,8	203	6,9	0,6
Benzyl paraben	20-500	S _{BzPB} =54,8 × C _{BzPB} - 682	0,996	2,1	188	8,6	0,6

^αΕμβαδόν κορυφής του κάθε αναλύτη έναντι της αντίστοιχης συγκέντρωσης .
^β Συντελεστής Συσχέτισης.
^γ Τυπικό σφάλμα της μεθόδου,
^δ Πειραματική τιμή του t, η θεωρητική τιμή του t σε P= 0,05 και f = n-2 = 5 βαθμούς ελευθερίας είναι 2,57.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε δοκιμασία Student (t-test), για να ελεγχθεί εάν ο σταθερός όρος είναι σημαντικά διάφορος ή όχι του μηδενός. Η θεωρητική τιμή της δοκιμασίας t-test για $n-2=5$ βαθμούς ελευθερίας και στάθμη εμπιστοσύνης 95% σύμφωνα με τον πίνακα two-tailed t-test είναι $t_{\text{θεωρητικό}} = 2,57$. Όπως φαίνεται στον πιο πάνω πίνακα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, εκτός από την καμπύλη αναφοράς του methyl paraben, ισχύει $t_{\text{πειραματικό}} < t_{\text{θεωρητικό}}$ και άρα ο σταθερός όρος δε διαφέρει σημαντικά από το μηδέν. Διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από γραμμικότητα για όλα τα parabens με τιμές του συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient r) μεγαλύτερες από 0,996.

6.7.2 Έλεγχος ορθότητας και πιστότητας

Η ορθότητα και η πιστότητα αποτελούν κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας των μεθόδων ποσοτικού προσδιορισμού και ο υπολογισμός τους είναι απαραίτητος για την αξιολόγηση και επικύρωσή των μεθόδων αυτών. Η ορθότητα αποτελεί μέτρο της εγγύτητας της πειραματικά μετρούμενης τιμής προς την πραγματική συγκέντρωση του αναλύτη.

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ορθότητας και πιστότητας της προτεινόμενης μεθόδου, τόσο κατά τη διάρκεια μιας εργαστηριακής ημέρας (within day ή intra day accuracy and precision), όσο και δια των ημερών (between days ή inter day accuracy and precision). Για τον έλεγχο αυτό χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ελέγχου (quality control samples) που παρασκευάστηκαν όπως και τα δείγματα των καμπυλών βαθμονόμησης. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή, μεσαία και υψηλή) 20, 100 και 500 ng mL⁻¹. Σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν 4 δείγματα σε κάθε σειρά ανάλυσης (εργαστηριακή ημέρα) και η αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 3 διαφορετικές εργαστηριακές μέρες. Ως μέτρο έκφρασης της ορθότητας χρησιμοποιείται το επί τοις εκατό σχετικό σφάλμα (% Er). Η πιστότητα εκφράζει την εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων μιας σειράς ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό αυστηρά καθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται συνήθως με την % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD).

Οι παράμετροι που υπολογίζονται είναι η ολική μέση τιμή των πειραματικά υπολογιζόμενων συγκεντρώσεων, η εντός της ημέρας σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{intra day}), η μεταξύ των ημερών σχετική τυπική απόκλιση (% RSD_{inter day}) και το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα (%Er). Στους πίνακες 6.12 και 6.13 παρουσιάζονται οι πειραματικά υπολογιζόμενες τιμές συγκέντρωσης για κάθε αναλύτη και οι τιμές των παραπάνω στατιστικών παραμέτρων για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης.

Πίνακας 6.12 Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου FPSE-HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό των methyl paraben, ethyl paraben και propyl paraben σε ανθρώπινο πλάσμα.			
Αναλύτης	Συγκέντρωση ng mL ⁻¹		
Methyl paraben			
Θεωρητική συγκέντρωση	20	100	500
Σειρά 1 (mean ± SD)	20,82 ± 0,34	96,5 ± 1,1	489 ± 14
Σειρά 2 (mean ± SD)	21,24 ± 0,58	99,1 ± 4,2	496,5 ± 7,7
Σειρά 3 (mean ± SD)	20,60 ± 0,19	99,6 ± 4,3	497,3 ± 6,2
Ολική μέση τιμή	20,88 ± 0,46	98,4 ± 3,4	494,26 ± 9,6
%RSD _{intra-day}	1,93	3,6	1,95
% RSD _{inter-day}	1,22	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή
Ολική ακρίβεια (Er%)	4,4	-1,6	-1,1
Ethyl paraben			
Σειρά 1 (mean ± SD)	20,89 ± 0,76	100,9 ± 4,1	503 ± 12
Σειρά 2 (mean ± SD)	20,9 ± 1,0	103,9 ± 6,0	505,5 ± 6,2
Σειρά 3 (mean ± SD)	21,07 ± 0,92	96,8 ± 1,8	504,6 ± 9,1
Ολική μέση τιμή	20,94 ± 0,82	100,5 ± 4,9	504,6 ± 9,1
%RSD _{intra-day}	4,30	4,33	1,99
% RSD _{inter-day}	Καμία μεταβολή	2,78	Καμία μεταβολή
Ολική ακρίβεια (Er%)	4,3	0,5	0,9
Isopropyl paraben			
Σειρά 1 (mean ± SD)	21,12 ± 0,49	99,8 ± 2,6	503,1 ± 6,2
Σειρά 2 (mean ± SD)	20,66 ± 0,39	100,3 ± 2,5	502,3 ± 9,1
Σειρά 3 (mean ± SD)	20,77 ± 0,48	100,4 ± 3,9	492,1 ± 8,4
Ολική μέση τιμή	20,84 ± 0,46	100,2 ± 2,8	499,2 ± 8,9
%RSD _{intra-day}	6,55	3,05	1,61
% RSD _{inter-day}	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή	0,94
Ολική ακρίβεια (Er%)	4,2	0,2	-0,2

Πίνακας 6.12 Ορθότητα και πιστότητα της μεθόδου FPSE-HPLC για τον ποσοτικό προσδιορισμό των methyl paraben, ethyl paraben και propyl paraben σε ανθρώπινο πλάσμα.			
Αναλύτης	Συγκέντρωση ng mL ⁻¹		
Propyl paraben			
Θεωρητική συγκέντρωση	20	100	500
Σειρά 1 (mean ± SD)	19,7 ± 1,4	102,1 ± 4,7	501,3 ± 9,4
Σειρά 2 (mean ± SD)	21,1 ± 2,58	100,76 ± 0,92	495,4 ± 3,7
Σειρά 3 (mean ± SD)	20,4 ± 1,1	101,4 ± 3,1	503,8 ± 8,9
Ολική μέση τιμή	20,4 ± 1,7	101,5 ± 3,2	500,2 ± 7,9
%RSD intra-day	8,62	3,34	1,56
% RSD inter-day	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή	0,38
Ολική ακρίβεια (Er%)	2,0	1,5	0,03
Isobutyl paraben			
Σειρά 1 (mean ± SD)	21,9 ± 1,5	98,9 ± 2,9	503 ± 12
Σειρά 2 (mean ± SD)	20,7 ± 1,3	97,1 ± 5,9	505,5 ± 6,2
Σειρά 3 (mean ± SD)	21,01 ± 1,8	98,6 ± 2,5	504,6 ± 9,1
Ολική μέση τιμή	21,1 ± 1,8	98,2 ± 3,8	504,6 ± 9,1
%RSD intra-day	9,0	3,34	1,99
% RSD inter-day	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή
Ολική ακρίβεια (Er%)	5,5	-1,8	0,9
Butyl paraben			
Σειρά 1 (mean ± SD)	19,76 ± 0,22	101,4 ± 1,9	502.1 ± 6,4
Σειρά 2 (mean ± SD)	19,25 ± 0,67	101,5 ± 2,1	496.1 ± 6.9
Σειρά 3 (mean ± SD)	19,17 ± 0,58	100,68 ± 0,67	498.3 ± 5.7
Ολική μέση τιμή	19,39 ± 0,55	101,2 ± 1,6	498.8 ± 6,3
%RSD intra-day	2,71	1,67	1,27
% RSD inter-day	0,94	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή
Ολική ακρίβεια (Er%)	-3,1	1,2	-0,2
Benzyl paraben			
Σειρά 1 (mean ± SD)	21,23 ± 0,89	104,8 ± 1,0	507 ± 17
Σειρά 2 (mean ± SD)	21,11 ± 0,35	103,5 ± 2,5	501 ± 11
Σειρά 3 (mean ± SD)	20,94 ± 0,36	103,64 ± 0,76	499.2 ± 7,3
Ολική μέση τιμή	21,09 ± 0,55	103,9 ± 1,6	502 ± 11
%RSD intra-day	2,82	1,56	2,5
% RSD inter-day	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή	Καμία μεταβολή
Ολική ακρίβεια (Er%)	5,4	3,9	0,4

Από τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι η εντός της ημέρας η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση κυμαίνεται για το methyl paraben μεταξύ των τιμών 1,93 έως 3,6%, για το ethyl paraben από 1,99 έως 4,3 %, για το isopropyl paraben από 1,61 έως 6,55 %, για το propyl paraben από 1,56 έως 8,62 %, για το isobutyl paraben από 1,99 έως

9,0% , για το butyl paraben από -3,1 έως 1,2 % και για το benzyl paraben από 1,56 έως 2,83%. Η μέγιστη μεταξύ των ημερών επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση για το methyl paraben ήταν 1,22%, για το ethyl paraben 2,78 % , για το isopropyl paraben 0,94 % , για το propyl paraben 0,38 % , για το isobutyl paraben 9,0% , ενώ για το butyl paraben και το benzyl paraben δεν παρατηρήθηκε μεταβολή μεταξύ των ημερών. Τέλος, η ορθότητα της μεθόδου, όπως αυτή εκφράζεται από το επί τοις εκατό σχετικό αναλυτικό σφάλμα βρέθηκε να κυμαίνεται από -1,6 έως 4,4 για το methyl paraben, 0,5 έως 4,3% για το ethyl paraben, -0,2 έως 4,2 για το isopropyl paraben, 0,03 έως 2,0% για το propyl paraben, -1,8 έως 5,5 για το isobutyl paraben, -3,1 έως 1,2% για το butyl paraben και 0,4 έως 5,4% για το benzyl paraben.

6.7.3 Όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικοποίησης

Ως όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) ορίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού. Ως όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) ορίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκαν πειραματικά με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων και βρέθηκε ότι είναι 7 ng mL^{-1} και 20 ng mL^{-1} , για όλους τους αναλύτες.

6.9 Συμπεράσματα

Η προτεινόμενη μέθοδος FPSE-HPLC επιτρέπει τον αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό των επτά parabens (methyl, ethyl, isopropyl, propyl, isobutyl, butyl και benzyl paraben) σε ανθρώπινο πλάσμα. Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου αξιολογήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι χρωματογραφικές συνθήκες. Επιπλέον αναπτύχθηκε νέα μέθοδο εκχύλισης FPSE με χρήση μικρού όγκου (50 μL) βιολογικού υλικού και τροποποιήθηκαν διάφορες παράμετροι σε διαφορετικά στάδια της μεθόδου προκατεργασίας των δειγμάτων με αποτέλεσμα να επιτευχθεί υψηλή αποτελεσματικότητα της μεθόδου στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα. Η

μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας και πραγματοποιήθηκε έλεγχος γραμμικότητας, έλεγχος ορθότητας και πιστότητας, ενώ καθορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίηση (LOQ) για κάθε αναλύτη. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί σε μελέτες βιοπαρακολούθησης.

Βιβλιογραφία

- [1] J. G. Dorsey and K. A. Dill, The molecular mechanism of retention in reversed-phase liquid chromatography, *Chem. Rev.*, 89 (2), 331–346, **1989**, doi: 10.1021/cr00092a005.
- [2] Μ. Παρίση-Πούλου, Ε. Παντερή, *ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ ΠΡΟΧΩΡΗΜΕΝΗΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ*. Αθήνα **2015**.
- [3] Y. Kazakevich and R. LoBrutto, Eds., HPLC for pharmaceutical scientists. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience, **2007**.
- [4] V. Meyer, *Practical high-performance liquid chromatography*, 5th ed. Chichester, U.K: Wiley, **2010**.
- [5] T. D. Lee, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third Edition: Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland, John W. Dolan, Authors John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA ISBN 978-0-470-16754-0 **2010**.
- [6] Θ.Π. Χατζηιωάννου, Μ.Α. Κουππάρη, *ΕΝΟΡΓΑΝΗ ΑΝΑΛΥΣΗ*. Αθήνα **2017**.
- [7] E. Zilfidou, A. Kabir, K. Furton, and V. Samanidou, Fabric Phase Sorptive Extraction: Current State of the Art and Future Perspectives, *Separations*, 5(3), 40, **2018**, doi: 10.3390/separations5030040.
- [8] V. F. Samanidou, Fabric Phase Sorptive Extraction in Pharmaceutical Analysis, *Pharm. Anal. Acta*, 6(7), **2015**, doi: 10.4172/2153-2435.1000e177.
- [9] A. Kabir and G. Furton, 13 - Fabric phase sorptive extraction: a new generation, green sample preparation approach. Solid-Phase Extraction, Handbooks in Separation Science, 355-386, **2020**.
- [10] A. Kabir, M. Locatelli, and H. Ulusoy, Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation, *Separations*, 4(4), 36, Dec. **2017**, doi: 10.3390/separations4040036.
- [11] Abuzar Kabir, Rodolfo Mesa, Jessica Jurmain and Kenneth G. Furton Fabric Phase Sorptive Extraction Explained, *Separations* **2017**, 4(2), 21; <https://doi.org/10.3390/separations4020021>
- [12] Kabir, A.; Furton, K.G. Fabric Phase Sorptive Extractors. U.S. Patent 9,283,544 B2, 18 March **2014**.

- [13] Viktoria Kazantzi and Aristidis Anthemidis, Fabric Sol–gel Phase Sorptive Extraction Technique: A Review, *Separations*, 4(2), 20, **2017**, doi: 10.3390/separations4020020.
- [14] C. Casals-Casas and B. Desvergne, “Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption,” *Annu. Rev. Physiol.*, 73(1), 135–162, **2011**, doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142200.
- [15] T. T. Schug, A. Janesick, B. Blumberg, and J. J. Heindel, Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 127(3–5), 204–215, **2011**, doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.007.
- [16] E. Diamanti-Kandarakis *et al.*, Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement, *Endocr. Rev.*, 30(4), 293–342, **2009**, doi: 10.1210/er.2009-0002.
- [17] Soni, M.G., Carabin, I.G., Burdock, G.A., Safety assessment of esters of phydroxybenzoic acid (parabens). *Food Chem. Toxicol.* 43, 985-1015, **2005**. doi:10.1016/j.fct.2005.01.020
- [18] P. D. Darbre, A. Aljarrah, W. R. Miller, N. G. Coldham, M. J. Sauer, and G. S. Pope, Concentrations of parabens in human breast tumours, *J. Appl. Toxicol.*, 24(1), 5–13, **2004**, doi: 10.1002/jat.958.
- [19] K. Nowak, W. Ratajczak–Wrona, M. Górská, and E. Jabłońska, Parabens and their effects on the endocrine system, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 474, 238–251, **2018**, doi: 10.1016/j.mce.2018.03.014.
- [20] L. Kolatorova, M. Duskova, J. Vitku, and L. Starka, Prenatal Exposure to Bisphenols and Parabens and Impacts on Human Physiology, *Physiol. Res.*, S305–S315, **2017**, doi: 10.33549/physiolres.933723.
- [21] D. Błędzka, J. Gromadzińska, and W. Wąsowicz, Parabens. From environmental studies to human health, *Environ. Int.*, 67, 27–42, **2014**, doi: 10.1016/j.envint.2014.02.007.
- [22] Ch. Liao, L. Chen, K. Kannan, Occurrence of parabens in foodstuffs from China and its implications for human dietary exposure, *Environ Int.*, 57-58, 68-74, **2013** doi: 10.1016/j.envint.2013.04.001.

- [23] A.F. Fransway, et al. Parabens, *Dermatitis*, 30(1), 3–31, **2019**, doi: 10.1097/DER.0000000000000429.
- [24] S. Abbas, H. Greige-Gerges, N. Karam, M.-H. Piet, P. Netter, and J. Magdalou, Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 25(6), 568–577, **2010**, doi: 10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-013.
- [25] P. D. Darbre and P. W. Harvey, Paraben esters: review of recent studies of endocrine toxicity, absorption, esterase and human exposure, and discussion of potential human health risks, *J. Appl. Toxicol.*, 28(5), 561–578, **2008**, doi: 10.1002/jat.1358.
- [26] E. Gomez *et al.*, Estrogenic Activity of Cosmetic Components in Reporter Cell Lines: Parabens, UV Screens, and Musks, *J. Toxicol. Environ. Health A*, 68(4), 239–251, **2005**, doi: 10.1080/15287390590895054.
- [27] T. Okubo, Y. Yokoyama, K. Kano, and I. Kano, ER-dependent estrogenic activity of parabens assessed by proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and expression of ER α and PR, *Food Chem. Toxicol.*, 8, **2001**.
- [28] S. Ishiwatari, T. Suzuki, T. Hitomi, T. Yoshino, S. Matsukuma, and T. Tsuji, Effects of methyl paraben on skin keratinocytes, *J. Appl. Toxicol.*, 27(1), 1–9, **2007**, doi: 10.1002/jat.1176.
- [29] O. Handa *et al.*, “Methylparaben potentiates UV-induced damage of skin keratinocytes,” *Toxicology*, 227, 62–72, **2006**, doi: 10.1016/j.tox.2006.07.018.
- [30] A. F. Fransway, P. J. Fransway, D. V. Belsito, and J. A. Yiannias, “Paraben Toxicology:,” *Dermatitis*, 30, 32–45, **2019**, doi: 10.1097/DER.0000000000000428.
- [31] M. G. Soni, I. G. Carabin, and G. A. Burdock, Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens), *Food Chem. Toxicol.*, 43, 985–1015, **2005**, doi: 10.1016/j.fct.2005.01.020.
- [32] Scientific Committee on Consumer Safety, OPINION ON Parabens, adopted 14th December **2010**.

- [33] Scientific Committee on Consumer Safety, OPINION ON Parabens. Updated request for a scientific opinion on propyl- and butylparaben, COLIPA n° P82, adopted 3rd May **2013**.
- [34] Scientific Committee on Consumer Safety, OPINION ON Propylparaben, adopted 28th October **2020**.
- [35] R. Golden, J. Gandy, and G. Vollmer, "A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health," *Crit. Rev. Toxicol.*, 35(5), 435–458, **2005**, doi: 10.1080/10408440490920104.
- [36] L. Kolatorova Sosvorova *et al.*, Determination of selected bisphenols, parabens and estrogens in human plasma using LC-MS/MS, *Talanta*, 174, 21–28, **2017**, doi: 10.1016/j.talanta.2017.05.070.
- [37] F. Vela-Soria, L. M. Iribarne-Durán, V. Mustieles, I. Jiménez-Díaz, M. F. Fernández, and N. Olea, QuEChERS and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of parabens and ultraviolet filters in human milk samples, *J. Chromatogr. A*, 1546, 1–9, **2018**, doi: 10.1016/j.chroma.2018.02.060.
- [38] X. Shen *et al.*, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry for determination of parabens in human breast tumor and peripheral adipose tissue, *J. Chromatogr. B*, 1096, 48–55, **2018**, doi: 10.1016/j.jchromb.2018.08.004.
- [39] A. Azzouz, A. J. Rascón, and E. Ballesteros, 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**, doi: 10.1016/j.jpba.2015.11.024.
- [40] X. Ye, A. M. Bishop, L. L. Needham, and A. M. Calafat, Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk, *Anal. Chim. Acta*, 622, 150–156, **2008**, doi: 10.1016/j.aca.2008.05.068.

- [41] N. Raza, K.-H. Kim, M. Abdullah, W. Raza, and R. J. C. Brown, Recent developments in analytical quantitation approaches for parabens in human-associated samples, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 98, 161–173, **2018**, doi: 10.1016/j.trac.2017.11.009.
- [42] G. Rigkos, V. Alampanos, A. Kabir, K. G. Furton, Ž. Roje, I. V. Vrček, I. Panderi, V. Samanidou, An improved fabric-phase sorptive extraction protocol for the determination of seven parabens in human urine by HPLC-DAD, *Biomed Chromatogr* **2020** Aug 25;e4974. doi: 10.1002/bmc.4974.