



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

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ ΣΕ ΥΦΑΣΜΑΤΙΝΟ ΜΕΣΟ ΣΕ
ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (FPSE-HPLC) ΓΙΑ
ΤΟΝ ΠΟΣΟΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΡΑΡΑΒΕΝΣ ΣΕ ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ**

Νικόλαος Παλουμπής
Τεχνολόγος Τροφίμων

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αθήνα, 2020

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο σε συνδυασμό με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (FPSE-HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό parabens σε μητρικό γάλα

Επιβλέπων καθηγητής:

Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Ειρήνη Παντερή Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Λουκάς Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

Ιωάννης Ντότσικας Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ

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

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202)

Πρόλογος

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Φαρμακευτικής Ανάλυσης του Τομέα Φαρμακευτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο Σεπτέμβριος 2019 - Ιούλιος 2020, στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος διπλώματος ειδίκευσης «Φαρμακευτική Ανάλυση - Έλεγχος Ποιότητας» του Τμήματος Φαρμακευτικής.

Ολοκληρώνοντας τις μεταπτυχιακές μου σπουδές αισθάνομαι έντονα την ανάγκη να ευχαριστήσω από καρδιάς όλους όσους συνέβαλαν καθοριστικά στην επιτυχή διεκπεραίωση της ερευνητικής μου εργασίας, καθώς και αυτούς με τους οποίους συνεργάστηκα ερευνητικά κατά τη διάρκεια των μεταπτυχιακών μου σπουδών.

Θερμές ευχαριστίες οφείλονται επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, κα Ειρήνη Παντερή, Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον αντικείμενο, όπως αυτό της χρωματογραφίας. Η καθοδήγηση και η εμπιστοσύνη που μου παρείχε στην διάρκεια αυτής της εποικοδομητικής συνεργασίας μας έπαιξαν καταλυτικό ρόλο στην εκπόνηση της εργασίας. Επιπλέον ευχαριστώ τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εισηγητικής επιτροπής και συγκεκριμένα τους Αναπλ. Καθηγητές κ. Ιωάννη Λουκά και κ. Ιωάννη Ντότσικα για τη συμβολή τους στη διόρθωση του κειμένου της εργασίας

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές και συναδέλφους που συνεργάστηκα και συνυπήρξα στο εργαστήριο φαρμακευτικής ανάλυσης κατά τη διάρκεια των πειραμάτων καθώς η συνεργασία μας έπαιξε σημαντικό ρόλο στην ολοκλήρωση της εργασίας.

Κατά τη διάρκεια των σπουδών μου συνεργάστηκα επίσης με το Εργαστήριο Ελέγχου Ντόπινγκ του Ολυμπιακού Αθλητικού Κέντρου Αθηνών «Σπύρος Λούης» σε αναλύσεις στεροειδών σε ούρα αθλητών. Θα ήθελα επομένως να ευχαριστήσω το επιστημονικό προσωπικό του Εργαστηρίου Ελέγχου Ντόπινγκ με το οποίο συνεργάστηκα για πέντε μήνες, το Διευθυντή του εργαστηρίου ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ Δρ. Ιωάννη Αγγελή για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αλλά και γιατί συνέβαλε σημαντικά στο να αποκτήσω πολύτιμες γνώσεις στους ελέγχους ντόπινγκ με μια από τις πλέον σύγχρονες τεχνικές ανάλυσης, αυτήν της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης – φασματομετρίας μαζών με αναλυτή χρόνου πτήσης (LC-qTOF/MS). Επίσης ευχαριστώ πολύ τη Δρ. Κιούση και τη Δρ. Φραγκάκη για τη συνεχή επίβλεψη, την ουσιαστική και αδιάκοπη επιστημονική βοήθεια και καθοδήγησή τους σε όλη τη διάρκεια της εργασίας μου στο εργαστήριο ελέγχου ντόπινγκ του ΟΑΚΑ.

Τέλος, θέλω να αφιερώσω τη διπλωματική μου εργασία, στους γονείς μου, Βασίλη και Δήμητρα καθώς και στον αδελφό μου Αλέξανδρο γιατί αποτελούν στήριγμα και πηγή έμπνευσης σε ότι στόχο και αν θέσω στη ζωή μου.

Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η συνεχής έρευνα σχετικά με τα parabens και την επίδραση τους στην ανθρώπινη υγεία, έχει στρέψει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας για την ανάπτυξη νέων τεχνικών προκατεργασίας δειγμάτων και αναλυτικών μεθόδων, με σκοπό τον προσδιορισμό των εν λόγω ενώσεων σε βιολογικά δείγματα. Στόχος της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας απλής και αποτελεσματικής αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό επτά parabens με την τεχνική της υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography) με ανιχνευτή ορατού - υπεριώδους (UV). Ως τεχνική προκατεργασίας του ανθρώπινου μητρικού γάλακτος επιλέχθηκε η εκχύλιση με προσρόφηση σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) η οποία συνέβαλε στην ταυτόχρονη εκχύλιση και των επτά αναλυτών. Η ανάλυση βασίζεται στην χρήση 50 μL ανθρώπινου μητρικού γάλακτος το οποίο κατεργάστηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο FPSE που αναπτύχθηκε. Επόμενο βήμα είναι η συμπύκνωση του εκχυλίσματος σε ρεύμα αζώτου, ανασύσταση με 150 μL διάλυμα ACN/AMF 2,5mM 40/60 v/v , έντονη ανακίνηση, διήθηση με φίλτρο και τελικώς ένεση στο αναλυτικό σύστημα. Οι αναλύτες διαχωρίζονται χρωματογραφικά με ισοκρατική έκλουση σε αναλυτική στήλη Spherisorb ODS-1 C18 με κινητή φάση που αποτελείται από 34% ακετονιτρίλιο και 66% υδατικό διάλυμα άλατος μυρμηκικού αμμωνίου (AMF) συγκέντρωσης 49 mM. Επίσης, έχει προστεθεί μυρμηκικό οξύ σε ποσοστό 0,1% και η ταχύτητα ροής είναι 0,25 mL/min. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος γραμμικότητας με καμπύλη αναφοράς προτύπων διαλυμάτων των αναλυτών σε εύρος συγκεντρώσεων από 20 – 500 ng mL⁻¹. Μελλοντικά, η μέθοδος χρειάζεται να βελτιστοποιηθεί ως προς τις χρωματογραφικές συνθήκες και ακολούθως να επικυρωθεί και εφαρμοστεί σε αναλύσεις κλινικών δειγμάτων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ, ΒΙΟΑΝΑΛΥΣΗ, ΜΗΤΡΙΚΟ ΓΑΛΑ, PARABENS, FPSE.

II

Abstract

In recent years, ongoing research on parabens and their impact on human health has drawn the attention of the global scientific community to develop new techniques for sample preparation and analytical methods, to determine these compounds in biological samples. In this dissertation, seven parabens, methyl paraben, ethyl paraben, iso-propyl paraben, propyl paraben, iso-butyl paraben, butyl paraben and benzyl paraben, were studied. The aim of this study was the development of a simple and an effective analytical method for the simultaneous determination of the seven parabens with the technique of High-Performance Liquid Chromatography with a visible-ultraviolet (UV) detector. As a pre-treatment technique for human breast milk samples, Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) was selected which contributed to the simultaneous extraction of all seven analytes. The analysis is based on the use of 50 μL of human breast milk sample which was processed according to the developed FPSE protocol. Next step is the condensation of the extract in nitrogen, reconstitution with 150 μL ACN / AMF solution 2.5 mM 40/60 v / v, intense shaking, filter filtration and finally injection into the analytical system. The analytes are chromatographically separated by reverse phase liquid chromatography in a Spherisorb®ODS-1 C18 analytical column with dimensions of 2.1x150 mm and particle size of 3 μm , with isocratic elution. The mobile phase consists of 34% acetonitrile and 66% aqueous solution of ammonium formate (AMF) with a concentration of 49 mM. containing 0.1% formic acid and pumped at a flow rate 0.25 mL min^{-1} . A linear calibration curve was constructed from the analysis of mixed working standard solutions of the seven parabens and over the concentration range 20 to 500 ng mL^{-1} .

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

Περιεχόμενα

1	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης	14
1.1	Ιστορική αναδρομή	14
1.2	Εισαγωγή.....	14
1.3	Διάκριση χρωματογραφικών τεχνικών	15
1.3.1	Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography).....	16
1.3.2	Χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography)	17
1.3.3	Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής (ion exchange chromatography).....	18
1.3.4	Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography)	18
1.3.5	Χρωματογραφία χημικής συγγένειας (affinity chromatography)	18
1.4	Οργανολογία HPLC.....	19
2	Parabens (Parabens).....	21
2.1	Εισαγωγή.....	21
2.2	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά.....	21
2.3	Πηγές και ανθρώπινη έκθεση	21
2.3.1	Καλλυντικά	22
2.3.2	Φαρμακευτικά προϊόντα	22
2.3.3	Τρόφιμα.....	23
2.3.4	Άλλες πηγές επιμόλυνσης.....	23
2.4	Τοξικότητα.....	24
2.4.1	Ενδοκρινική δράση	25
2.4.2	Υπογονιμότητα.....	26
2.4.3	Καρκινογένεση.....	26
2.4.4	Αλλεργίες.....	27
2.4.5	Μεταβολικό σύνδρομο.....	27
2.5	Μεταβολισμός.....	28
2.6	Νομοθετικό πλαίσιο	30
3	Φάρμακα και θηλασμός.....	32
3.1	Φυσιολογία γαλουχίας	32
3.1.1	Γαλακτογένεση I.....	32
3.1.2	Γαλακτογένεση II.....	33

3.1.3	Γαλακτογένεση ΙΙΙ	33
3.1.4	Υποστροφή.....	34
3.2	Σύσταση ανθρώπινου μητρικού γάλακτος.....	34
3.3	Φαρμακοκινητική κατά τον θηλασμό	35
3.4	Αλληλεπίδραση φαρμάκων με το νεογνό	37
4	Προκατεργασία βιολογικού υλικού	40
4.1	Εισαγωγή.....	40
4.2	Κλασικές τεχνικές προκατεργασίας.....	41
4.3	Σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας	43
4.4	Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE)	45
4.4.1	Ανατομία προσροφητικού μέσου.....	45
4.4.2	Sol-gel επίστρωση.....	46
4.5	Αρχή της FPSE	47
4.6	Χαρακτηριστικά της FPSE	48
Πειραματικό μέρος		
5	Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο και υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (FPSE-HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό Parabens σε μητρικό γάλα	50
5.1	Εισαγωγή.....	50
5.2	Αρχή μεθόδου	52
5.3	Εξοπλισμός-Οργανολογία.....	54
5.3.1	Σύστημα HPLC-UV	54
5.3.2	Αντιδραστήρια-Διαλύτες	54
5.3.3	Συσκευές-Υλικά-Αναλώσιμα.....	55
5.4	Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας.....	55
5.4.1	Διαλύματα παρακαταθήκης	55
5.4.2	Μεικτά διαλύματα εργασίας	57
5.5	Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων μητρικού γάλακτος	57
5.5.1	Εμβολιασμένα δείγματα καμπύλης αναφοράς.....	57
5.6	Βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών	Error! Bookmark not defined.
5.6.1	Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης	58
5.6.2	Επιλογή στατικής φάσης.....	58
5.6.3	Επιλογή κινητής φάσης.....	61
5.7	Τελικές χρωματογραφικές συνθήκες	Error! Bookmark not defined.

5.8	Προετοιμασία βιολογικού υλικού	67
5.8.1	Πρωτόκολλο εκχύλισης των προσδιοριζόμενων parabens από το ανθρώπινο γάλα με την τεχνική προκατεργασίας FPSE	Error! Bookmark not defined.
5.8.2	Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου τεχνικής προκατεργασίας FPSE.....	67
5.8.3	Διαλύτης έκλουσης	68
5.8.4	Συμπύκνωση και διαλύτης ανασύστασης	69
6	Αξιολόγηση της μεθόδου	Error! Bookmark not defined.
6.1	Έλεγχος Εκλεκτικότητας (Selectivity).....	Error! Bookmark not defined.
6.2	Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας	73
7	Σύγκριση με άλλες μεθόδους.....	82
8	Συμπεράσματα	82
9	Βιβλιογραφία	84

Σχήμα 1.1 - Χρωματογραφία προσρόφησης.....	16
Σχήμα 1.2 - Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	18
Σχήμα 1.3 - Τυπική διάταξη ενός συστήματος HPLC.....	20
Σχήμα 2.1 - Παρουσία parabens σε προϊόντα καταναλωτών καθημερινής χρήσης.....	23
Σχήμα 2.2 - Μεταβολίτες parabens σε ανθρώπινα ούρα μετά απο 48 ώρες απο χορήγησή τους δια στόματος.....	30
Σχήμα 3.1 - Αλλαγή στη συνοχή των γαλακτοκυττάρων πριν (Α) και μετά (Β) την έναρξη της γαλακτογένεσης ΙΙ.....	34
Σχήμα 3.2 - Σύνθεση ανθρώπινου μητρικού γάλακτος.....	35
Σχήμα 4.1 - Στόχοι προκατεργασίας δείγματος.....	41
Σχήμα 4.2 - Στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE).....	43
Σχήμα 4.3 - Στάδια μικροεκχύλισης υγρού-υγρού με διασπορά (DLLME).....	45
Σχήμα 4.4 - Σύγκριση της συμπεριφοράς ροής υγρού δια μέσω μη διαπερατού και διαπερατού υποστρώματος μικροεχύλισης.....	47
Σχήμα 4.5 - Χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα για την σύνθεση sol-gel PEG επικάλυψης πάνω σε υφασμάτινο μέσο.....	48
Σχήμα 4.6 - Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο.....	49
Σχήμα 4.7 - Σχηματική αναπαράσταση ολοκληρωμένου FPSE μέσου με υφασμάτινο υπόστρωμα κυτταρίνης και sol-gel υλικό επίστρωσης PEG.....	50
Σχήμα 5.1 - Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού διαλύματος μείγματος parabens συγκέντρωσης 10 µg/mL, με στήλη X TERRA MS C-18, ροή 0.4 mL/min και κινητή φάση MeOH/ AMF (27mM) 43/57 v/v	66
Σχήμα 5.2 - Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού διαλύματος μείγματος parabens συγκέντρωσης 500 ng/mL, με στήλη HYPERSIL GOLD C-18, με ροή 0.25 mL/min και κινητή φάση ACN/ AMF (15mM) 36/64 v/v.....	67

Σχήμα 5.3 - Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού διαλύματος μείγματος parabens συγκέντρωσης 500 ng/mL, με στήλη SPHERISORB-ODS1 C-18, με ροή 0.25 mL/min και κινητή φάση ACN/ AMF (15mM) 36/64 v/v.....	68
Σχήμα 5.4 - Επίδραση της συγκέντρωσης του άλατος AMF της κινητής φάσης στην συγκράτηση των αναλυτών σε βιολογικό υλικό.....	69
Σχήμα 5.5 - Επίδραση της συγκέντρωσης μυρμηκικού αμμωνίου στο εμβαδόν κορυφής, στον αριθμό θεωρητικών πλακών και στον παράγοντα συμμετρίας των κορυφών	70
Σχήμα 5.6 - Επίδραση μικρής μεταβολής ποσοστού οργ.τροποποιητή στο εμβαδόν κορυφής.....	71
Σχήμα 5.7 - Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος μητρικού γάλακτος με πρότυπο διάλυμα parabens (100ng/mL). Κινητή φάση : ACN/ AMF 50mM 35/65 v/v +0.1% HCOOH.....	72
Σχήμα 5.8 - Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος μητρικού γάλακτος με πρότυπο διάλυμα parabens (100ng/mL). Κινητή φάση : ACN/ AMF 49,2mM 34/66 v/v +0.1% HCOOH.....	72
Σχήμα 5.9 - Επίδραση του διαλύτη έκλουσης στο εμβαδόν κορυφής των αναλυτών.....	75
Σχήμα 5.10 - Επίδραση συμπύκνωσης και κατάλληλου διαλύματος ανασύστασης στο εμβαδόν κορυφής των αναλυτών.....	76
Σχήμα 6.1 - Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών βαθμονόμησης εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος.....	77
Σχήμα 7.1 - Κατανομή χρόνου της αναπτυσσόμενης μεθόδου.....	80

Πίνακας 2.1 - Σύγκριση δραστηριότητας διάφορων parabens απο in vitro μελέτες σε σχέση με το οιστρογόνο 17-β οιστραδιόλη εκφρασμένη σε μοριακή αναλογία.....	26
Πίνακας 2.2 - Μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις parabens σε καλλυντικά ανα τον κόσμο.....	31
Πίνακας 3.1 - Παράγοντες που ευνοούν την είσοδο φαρμάκων στο μητρικό γάλα.....	37
Πίνακας 3.2 - Ταξινόμηση φαρμάκων κατά τον θηλασμό.....	40
Πίνακας 5.1 - Μέθοδοι προσδιορισμού parabens σε δείγματα ανθρώπινου μητρικού γάλακτος	53
Πίνακας 5.2 - Ιδιότητες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος και των εστέρων του και η επιτρεπόμενη ημερήσια πρόσληψη για τον άνθρωπο.....	55
Πίνακας 5.3 - Παρασκευή μεικτού διαλύματος παρακαταθήκης Α.....	58
Πίνακας 5.4 - Παρασκευή μεικτού διαλύματος παρακαταθήκης Β.....	58
Πίνακας 5.5 - Αραιώσεις για την παρασκευή μεικτών διαλυμάτων εργασίας parabens.....	59
Πίνακας 5.6 - Εύρος εργασίας εμβολιασμένων δειγμάτων μητρικού γάλακτος	60
Πίνακας 5.7 - Δομή του methyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	61
Πίνακας 5.8 - Δομή του ethyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	62
Πίνακας 5.9 - Δομή του iso-propyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	62
Πίνακας 5.10 - Δομή του propyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	63
Πίνακας 5.11 - Δομή του iso-butyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	63
Πίνακας 5.12 - Δομή του butyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	64
Πίνακας 5.13 - Δομή του benzyl paraben και απεικόνιση φυσικοχημικών του ιδιοτήτων.....	64

1 Κεφάλαιο 1: Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης

1.1 Ιστορική αναδρομή

Ο όρος χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903), όταν στην προσπάθειά του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων παρατήρησε το σχηματισμός έγχρωμων στιβάδων. Αυτός εκχύλισε τα πράσινα μέρη των φύλλων σε πετρελαϊκό αιθέρα και διαβίβασε το εκχύλισμα μέσα από στήλη από κονιοποιημένο ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), οπότε τα συστατικά (χλωροφύλλες) διαχωρίστηκαν σε διακριτές έγχρωμες ζώνες (χρωματογραφία προσρόφησης). Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, η τεχνική ονομάστηκε διεθνώς χρωματογραφία, από τις ελληνικές λέξεις χρώμα και γράφω¹. Από τότε η τεχνική βελτιώθηκε και διαμορφώθηκαν και άλλες τεχνικές, ώστε σήμερα η χρωματογραφία να αποτελεί την καλύτερη τεχνική διαχωρισμού και αναλύσεως πολύπλοκων μιγμάτων και απομονώσεως ευπαθών ουσιών, έγχρωμων και άχρωμων. Το 1941 οι Martin και Synge ανακάλυψαν την χρωματογραφία κατανομής. Το 1944 οι Consden, Gordon και Martin ανακάλυψαν τη χρωματογραφία χάρτου. Το 1952 οι Martin και James ανακάλυψαν την αεριοχρωματογραφία. Το 1967 οι Huber και Hulsman ανακάλυψαν την υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)².

1.2 Εισαγωγή

Ο όρος χρωματογραφία (chromatography) περιλαμβάνει πλήθος αναλυτικών τεχνικών που εφαρμόζονται κοινώς στον διαχωρισμό των συστατικών μιγμάτων ουσιών. Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαχωρισμού εφαρμόζονται ευρύτατα για τη διαπίστωση της παρουσίας ή μη συστατικών σε μίγματα τα οποία περιέχουν ένα περιορισμένο αριθμό άλλων ουσιών/προσμίξεων, γνωστής, ως επί το πλείστον, ταυτότητας. Η επιβεβαίωση της ταυτότητας των συστατικών του μίγματος προαπαιτεί τον χρωματογραφικό διαχωρισμό αυτών με σκοπό την απομόνωσή τους. Ακολουθεί ανάλυση των συστατικών με χημικές ή φασματοσκοπικές τεχνικές.

Πέραν των εφαρμογών της στην κλινική ανάλυση, η χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτατα στη φαρμακευτική ανάλυση, την ανάλυση τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων, στη βιοχημική έρευνα, όπως και στην καθημερινή πρακτική ενός συνθετικού χημικού εργαστηρίου και αλλού. Σε συνδυασμό με επακόλουθη συζευγμένη τεχνική ανίχνευσης (tandem chromatography), κυρίως με φασματοσκοπικές τεχνικές όπως UV/Vis, MS ή IR, η

χρωματογραφία αποτελεί το αναγκαίο προκαταρκτικό στάδιο όχι μόνο για τον ποιοτικό χαρακτηρισμό, αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό των διαχωριζόμενων ουσιών μεταβολιτών φαρμάκων κ.α.

Κάθε χρωματογραφική τεχνική περιλαμβάνει μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία ρέει μεταφέροντας τις διαχωριζόμενες ουσίες – συστατικά ενός μίγματος- μέσω μίας στατικής φάσης (static phase). Η κινητή φάση αποτελείται από ένα διαλύτη ή σύστημα διαλυτών, ενώ η στατική φάση από πορώδες στερεό υλικό ή από υγρό καθηλωμένο σε στερεό υπόστρωμα. Ο διαχωρισμός των συστατικών στη χρωματογραφία βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασης του κάθε συστατικού με τις δύο φάσεις, ο οποίος καθορίζεται από την φυσικοχημική συγγένεια του συστατικού με την κάθε φάση. Κάθε μόριο μίας ουσίας κατά τη μετανάστευσή του μέσω της στήλης μετακινείται πάρα πολλές φορές μεταξύ της κινητής φάσης (όπου διαλύεται) και της στατικής φάσης (όπου προσροφάται ή κατανέμεται ή δεσμεύεται κ.τ.λ.) και αντίστροφα ^{3,4}.

Η τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) αποτελεί σημαντικά εξελιγμένη μορφή της χρωματογραφίας στήλης, όπου η κινητή φάση πλέον δεν ρέει υπό την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με τη βοήθεια αντλίας. Αυτό επιταχύνει την ανάλυση και επιτρέπει τη χρήση χρωματογραφικών στηλών με μικρό μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης. Η χρήση μικρού μεγέθους σωματιδίων υλικού πλήρωσης αυξάνει το εμβαδόν της επιφάνειας της στατικής φάσης, που είναι διαθέσιμο να αλληλοεπιδράσει με τα μόρια που μεταφέρονται μέσω της κινητής φάσης. Κατά συνέπεια, βελτιώνεται ο διαχωρισμός των αναλυόμενων μορίων και μειώνεται σημαντικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Η τεχνική αυτή παρέχει άμεσα ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό για κάθε αναλύτη ξεχωριστά, ο οποίος διαθέτει μοναδικό χρόνο συγκράτησης και χαρακτηριστική κορυφή. Η ευρεία εφαρμογή της HPLC στην φαρμακευτική ανάλυση, σε χορηγούμενα φάρμακα και μεταβολίτες τους αλλά και στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων που περιέχουν τους αναλύτες, την κατατάσσει σε μια από τις κορυφαίες ενόργανες αναλυτικές τεχνικές ⁵.

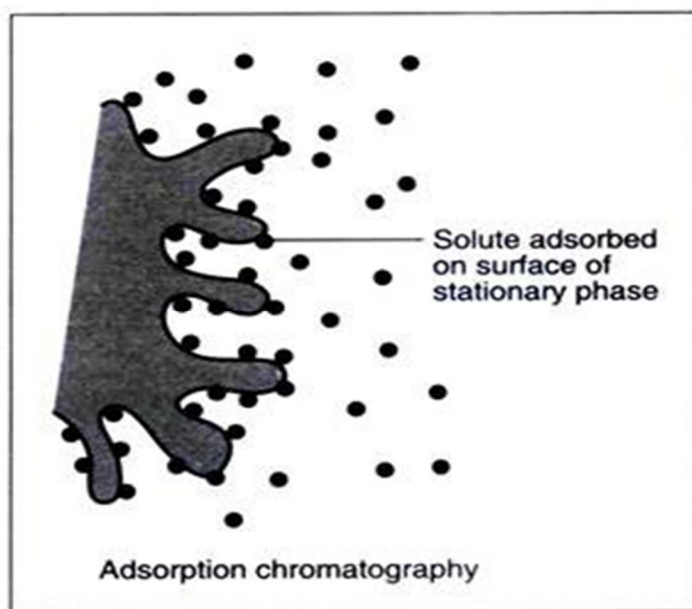
1.3 Διάκριση χρωματογραφικών τεχνικών

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ομαδοποιηθούν, με διάφορα κριτήρια. Έτσι, με βάση το μηχανισμό αλληλεπίδρασης που επικρατεί ανάμεσα στις ουσίες προς διαχωρισμό και την

στατική φάση, οι χρωματογραφικές τεχνικές διακρίνονται σε χρωματογραφία προσρόφησης, κατανομής, ιοντανταλλαγής, μοριακού αποκλεισμού και συγγένειας^{2,5,6}.

1.3.1 Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography)

Στη χρωματογραφία προσρόφησης, ο διαχωρισμός των διαφόρων ουσιών βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης τους στη στατική φάση. Οι αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στον αναλύτη και τη στατική φάση οφείλονται κυρίως σε αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, van der Waals και σε δεσμούς υδρογόνου. Για να χρησιμοποιηθεί το φαινόμενο της προσρόφησης σε διαχωρισμό μείγματος αναλυτών, πρέπει να είναι αντιστρεπτό ώστε με τη βοήθεια της κινητής φάσης να γίνεται η εκρόφιση των αναλυτών από την στατική φάση.



Σχήμα 1.1 - Χρωματογραφία προσρόφησης ΠΗΓΗ: Heftmann et al., 2013.

Ανάλογα με τη σχέση της πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης:

α) Χρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal phase chromatography)

Στην HPLC κανονικής φάσης ως πληρωτικό υλικό χρησιμοποιείται κάποιο πολικό υλικό, όπως οξείδιο του πυριτίου (SiO_2) ή οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3). Η πολικότητα των υλικών αυτών οφείλεται στις υδροξυλομάδες που περιέχουν. Αντίθετα, η κινητή φάση είναι μειωμένης πολικότητας. Κοινώς χρησιμοποιούνται μη πολικοί διαλύτες, όπως εξάνιο ή χλωροφόρμιο, ενώ

δεν περιέχεται στην κινητή φάση νερό. Έτσι, οι πολικές ενώσεις στο διαχωριζόμενο μίγμα αλληλοεπιδρούν ισχυρότερα με την πολική στατική φάση, σε σύγκριση με τις μη πολικές ενώσεις. Συνεπώς, οι λιγότερο πολικές ενώσεις διασχίζουν τη στήλη ταχύτερα και εκλούνται από αυτήν νωρίτερα.

β) Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (Reversed phase chromatography)

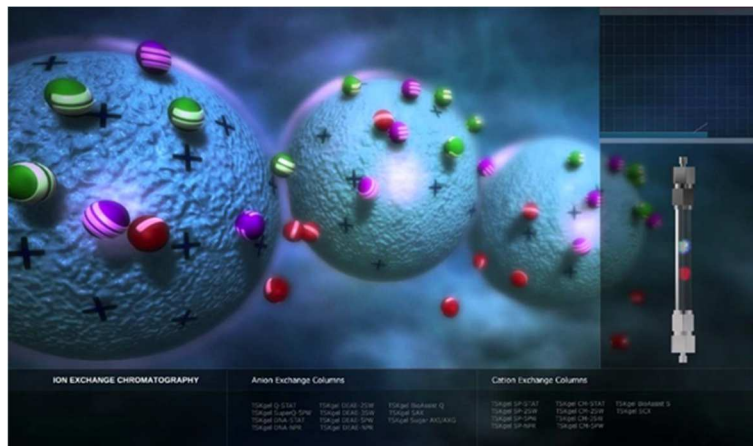
Εδώ ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση υδρόφοβων μορίων σε υδρόφοβη στατική φάση, υπό την ροή κινητής φάσης αυξημένης πολικότητας. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο, οκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες κ.α., οι οποίες προσδίδουν στη στατική φάση ιδιαίτερα άπολο χαρακτήρα. Η κινητή φάση αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή με νερό. Η έκλυση των προσροφημένων μορίων από τη χρωματογραφική στήλη επιτυγχάνεται με τη μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης κατά την αύξηση του περιεχόμενου σε αυτή ποσοστού του οργανικού διαλύτη. Η μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης ελαττώνει την υδρόφοβη αλληλεπίδραση μεταξύ των προσροφημένων μορίων και της στατικής φάσης: είναι προφανές ότι όσο περισσότερο λιπόφιλο είναι ένα διαχωριζόμενο μόριο, τόσο περισσότερο χρόνο θα αλληλοεπιδράσει με τη μη πολική στατική φάση και τόσο υψηλότερη θα είναι η συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, που θα απαιτείται για να επιτευχθεί η αποδέσμευσή του.

1.3.2 Χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography)

Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται στο διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων χαμηλού ή μέτριου μοριακού βάρους. Στην επιφάνεια του αδρανούς στερεού υποστρώματος υπάρχει ακινητοποιημένη λεπτή στοιβάδα υγρού (υψηλού σημείου ζέσεως). Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος μεταξύ της υγρής κινητής και της υγρής στατικής φάσης. Η χρωματογραφία κατανομής διαιρείται σε δύο υποομάδες, ανάλογα με τον τρόπο που η στατική φάση συγκρατείται στα σωματίδια του υλικού στήριξης: τη χρωματογραφία υγρού-υγρού, όπου η υγρή στατική φάση συγκρατείται στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης με φυσική προσρόφηση, και τη χρωματογραφία συνδεδεμένης φάσης, όπου η στατική φάση δεσμεύεται χημικά στην επιφάνεια του υλικού στήριξης.

1.3.3 Χρωματογραφία ιοντανταλλαγής (ion exchange chromatography)

Η χρωματογραφία ιοντανταλλαγής εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν το διαχωρισμό στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας στη στατική φάση, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία. Εκτός από τις εφαρμογές της τεχνικής αυτής στην ανάλυση φαρμακευτικών μορίων, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι πιο συχνά χρησιμοποιούμενη για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό πρωτεϊνών, πολυπεπτιδίων, νουκλεϊνικών οξέων κ.λ.π.



Σχήμα 1.2 - Χρωματογραφία ιοντανταλλαγής: Αλληλεπίδραση κατιονταλλάκτη (στατική φάση) με αρνητικά φορτισμένους αναλύτες προς διαχωρισμό αυτών. (Meyer et al.,2010)

1.3.4 Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού (size exclusion chromatography)

Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000 Da. Εφαρμόζεται συνεπώς στην ανάλυση και το χαρακτηρισμό των πολυμερών ενώσεων (συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνών). Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μέγεθος (και το σχήμα) των μορίων των αναλυόμενων ενώσεων: ενώ τα μικρά μόρια καθυστερούν εισερχόμενα στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, τα μεγάλα μόρια δεν εισέρχονται στους πόρους της στατικής φάσης. Έτσι, τα τελευταία εξέρχονται πρώτα από τη στήλη.

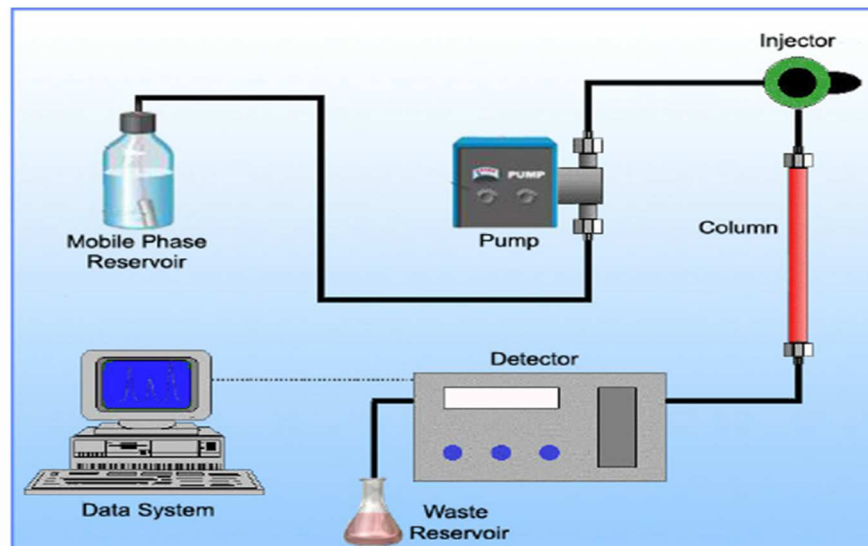
1.3.5 Χρωματογραφία χημικής συγγένειας (affinity chromatography)

Η χρωματογραφία χημικής συγγένειας εφαρμόζεται στο διαχωρισμό εναντιομερών ενώσεων. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι

ακίνητοποιημένοι στη στατική φάση. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η χρωματογραφία εναντιομερών (chiral chromatography), η οποία χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των εναντιομερών.

1.4 Οργανολογία HPLC

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγροχρωματογραφίας (σχήμα 1.3) περιλαμβάνει τα παρακάτω επιμέρους μέρη:



Σχήμα 1.3- Τυπική διάταξη ενός συστήματος HPLC. (Watson et al.,2012)

- Περιέκτες διαλυτών: Οι διαλύτες που θα αποτελέσουν την κινητή φάση βρίσκονται αποθηκευμένοι σε ειδικές φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για τη μεταφορά των δειγμάτων μέσα από το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας.
- Απαερωτής κενού: Ο απαερωτής εξασφαλίζει την απαέρωση της κινητής φάσης, ώστε να είναι εφικτός ο έλεγχος της πίεσης στη χρωματογραφική στήλη.
- Αντλία (pump): Η αντλία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους περιέκτες των διαλυτών μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος, υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος (injection system/ injector valve): περιλαμβάνει βρόγχο σταθερού όγκου ή αυτόματο σύστημα εισαγωγής, μεταβλητού (προεπιλεγμένου) όγκου

έγχυσης. Βρίσκεται πριν τη χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στη ροή της κινητής φάσης.

- Χρωματογραφική στήλη (column): στη στήλη επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Εφόσον ο διαχωρισμός καθορίζεται και από τη θερμοκρασία, η στήλη εμπεριέχεται σε θερμοστατούμενο κλίβανο (column oven).
- Ανιχνευτής (detector): Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται της στήλης γίνεται συνεχώς, κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο από τον ανιχνευτή φως προσπίπτει σε κυψελίδα συνεχούς ροής από χαλαζία και μετρείται η απορρόφηση του φωτός ⁷.

2 Κεφάλαιο 2: Εστέρες του π-υδροξυ βενζοϊκού οξέος (Parabens)

2.1 Εισαγωγή

Τα parabens από τη δεκαετία του 1920 χρησιμοποιούνται ως συντηρητικά. Λόγω της ευρείας χρήσης τους σε καλλυντικά, τρόφιμα και φάρμακα, η ανάλυσή τους αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα. Τα πλέον κοινά parabens είναι το methyl paraben (MPB), ethyl paraben (EPB), propyl paraben (PPB) και butyl paraben (BPB), ενώ τα λιγότερο χρησιμοποιούμενα είναι το iso-butyl paraben (iBP), iso-propyl paraben (iPPB) και benzyl paraben (BzPB). Επιπλέον, είναι ανθεκτικά σε μια σειρά περιβαλλοντικών και φυσικών συνθηκών και χρησιμοποιούνται ευρέως εμπορικά λόγω της αντιμικροβιακής τους ικανότητας, χαμηλότερης τοξικότητας και χαμηλότερου κόστους παραγωγής σε σύγκριση με άλλα συντηρητικά. Είναι αποτελεσματικά κυρίως ενάντια στα κατά Gram+ βακτήρια, στους μύκητες και τις ζύμες, ενώ έχουν ελάχιστη επίδραση σε βακτηριακούς σπόρους και καμία επίδραση στους ιούς ⁶¹.

2.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά

Τα parabens ή paraben, είναι εστέρες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος με ορισμένες αλκοόλες (π.χ. μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη και βουτανόλη). Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες και η σταθερότητα των parabens σχετίζονται άμεσα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας τους. Όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος αλυσίδας αλκυλίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η σταθερότητα και η αντιμικροβιακή δράση. Ωστόσο, η αύξηση του μήκους της αλυσίδας αυξάνει τη λιποφιλία τους. Γενικότερα, τα parabens θεωρούνται σταθερά, μη πτητικά, είναι λευκά, άοσμα, κρυσταλλικά και βιοδιασπώμενα από μια σειρά μη ειδικών ενζύμων στη φύση ⁸.

2.3 Πηγές και ανθρώπινη έκθεση

Οι κύριες πηγές ανθρώπινης επιμόλυνσης από parabens είναι τα καλλυντικά, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα τρόφιμα και παρακάτω θα εξεταστούν ξεχωριστά. Πρόσφατες εκτιμήσεις στις ΗΠΑ δείχνουν ότι ο μέσος όρος της ολικής έκθεσης των parabens ανά άτομο είναι περίπου 76 mg /ημέρα (μέχρι 1,3 mg / kg ημερησίως για ένα άτομο που ζυγίζει 70 kg). Καλλυντικά και προϊόντα προσωπικής φροντίδας αποτελούν περίπου τα 2/3 της ανθρώπινης έκθεσης σε parabens, 50 mg /

ημέρα, τα φαρμακευτικά προϊόντα 25 mg / ημέρα και τα τρόφιμα μόλις 1 mg / ημέρα ή και λιγότερο⁹.

2.3.1 Καλλυντικά

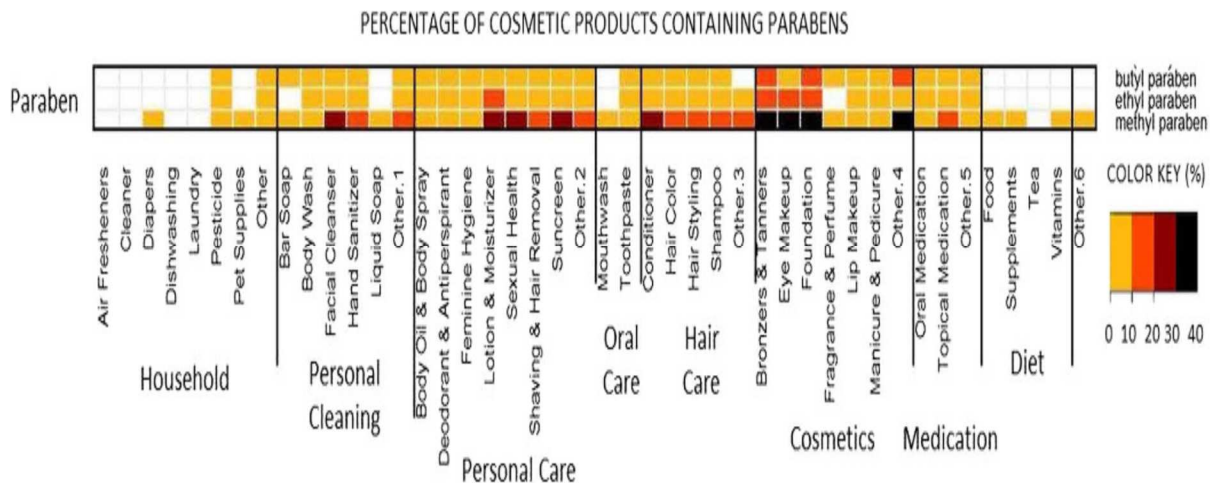
Η χρήση parabens αυτούσια ή σε συνδυασμό με άλλες ενώσεις, είναι κατάλληλη για τη συντήρηση των καλλυντικών. Είναι πιο δραστικά έναντι των ζυμών και μυκήτων και χρησιμοποιούνται με επιτυχία στα καλλυντικά για πάνω από μισό αιώνα. Τα parabens γενικώς έχουν καλή συμβατότητα στη σύνθεση καλλυντικών προϊόντων καθώς δε διαθέτουν αισθητή οσμή ή γεύση, δεν προκαλούν αποχρωματισμό, έχουν σχεδόν ουδέτερο pH και δεν προκαλούν σκλήρυνση ή λασπώδη υφή στο προϊόν. Επιπλέον έχουν χαμηλή τοξικότητα, είναι αδρανή, νομοθετικά αποδεκτά παγκοσμίως και το χαμηλό κόστος. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι η εξαιρετική χημική τους σταθερότητα σε σχέση με το pH (αποτελεσματικά μεταξύ pH 4,5-7,5) και τη θερμοκρασία¹⁰. Ευρωπαϊκή μελέτη βρήκε παρουσία parabens στο 99% των καλλυντικών προϊόντων απορρόφησης (leave on products) και στο 77% καλλυντικών προϊόντων έκπλυσης (rinse off products)¹¹. Μια άλλη έρευνα χρησιμοποίησε έναν 38975 δείγματα προϊόντων περιποίησης και μελετώντας τη σύστασή τους διαπίστωσε ότι τα 4435 περιείχαν methyl paraben σε ποσοστό 11,4%, τα 1356 περιείχαν ethyl paraben σε ποσοστό 3,5% και τα 1008 περιείχαν butyl paraben σε ποσοστό 2,6%¹².

2.3.2 Φαρμακευτικά προϊόντα

Τα parabens χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά στην παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων στα μέσα της δεκαετίας του 1900 και από τότε αποτελούν σύνηθες συστατικό σε πολλές συνθέσεις φαρμάκων ως συντηρητικά, με το propyl paraben να ξεχωρίζει λόγω της αποτελεσματικής δράσης του έναντι των μυκήτων. Μια ποικιλία φαρμακευτικών παρασκευασμάτων όπως υπόθετα, αναισθητικά, χάπια, σιρόπια, ενέσιμα διαλύματα και τα αντισυλληπτικά είναι γνωστό ότι περιέχουν parabens ως συντηρητικά. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ότι τα methyl και propyl paraben λαμβάνουν χώρα συνήθως σε μη συνταγογραφούμενα φάρμακα (over-the-counter drugs)¹³. Η ανθρώπινη έκθεση σε parabens μέσω λήψης φαρμακευτικών παρασκευασμάτων μελετήθηκε μέσω της ανάλυσης δειγμάτων ούρων ασθενών, όπου και μέσα σε λίγες ώρες μετά από την χορήγησή τους ήταν δυνατή η ανίχνευση parabens στα ούρα¹⁴.

2.3.3 Τρόφιμα

Τα τρόφιμα αποτελούν μια ακόμη πηγή επιμόλυνσης του ανθρώπου σε parabens καθώς προϊόντα όπως δημητριακά, γαλακτοκομικά, θαλασσινά, φρούτα, μαγειρικά έλαια, επεξεργασμένα λαχανικά, μπαχαρικά και χυμούς περιέχουν σημαντικές ποσότητες parabens, κυρίως methyl, ethyl και propyl paraben. Σύμφωνα με μελέτη που διεξήχθη σε 282 δείγματα τροφίμων που αναλύθηκαν, το 99% βρέθηκε να περιέχουν parabens. Πιο συγκεκριμένα, η μέση συγκέντρωση parabens που υπάρχει στα τρόφιμα βρέθηκε να είναι περίπου 39,3 ng / g του προϊόντος. Οι αναλύσεις parabens μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών τροφίμων έχουν αποκαλύψει πως τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν σε λαχανικά (109 ng / g), καρυκεία (75,4 ng / g) και δημητριακά (25,2 ng / g) ¹⁵.



Σχήμα 2.1 - Παρουσία parabens σε προϊόντα καταναλωτών καθημερινής χρήσης (Liao et al., 2013)

2.3.4 Άλλες πηγές επιμόλυνσης

Παρουσία parabens έχει παρατηρηθεί στον αέρα και στην σκόνη και προφανώς προέρχονται από τα προϊόντα προσωπικής φροντίδας που χρησιμοποιούνται στα νοικοκυριά, μέσω της εισπνοής και της στοματικής κατάποσης. Πιο συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις parabens που ανιχνεύτηκαν στον αέρα εσωτερικού χώρου φτάνουν μέχρι 21 ng / m³ για MePB, 4,0 ng / m³ για EtPB και 3,2 ng / m³ για BuPB). Οι εκτιμώμενοι ημερήσιοι ρυθμοί αναπνοής για ενήλικες (16-70 ετών) και τα παιδιά (0-2 ετών) είναι 185 dm³ / kg βάρους / ημέρα και 658 dm³ / kg bw / ημέρα, αντίστοιχα . Υποθέτοντας ότι το συχνότερα ανιχνευόμενο MePB (67%) είναι παρών στον αέρα εσωτερικού

χώρου σε μέση συγκέντρωση ($2,9 \text{ ng} / \text{m}^3$) και λαμβάνοντας υπ όψιν τον μέσο ρυθμό αναπνοής, η ημερήσια πρόσληψη MePB μέσω της εισπνοής είναι ίση σε $0.547 \text{ ng} / \text{kg}$ σωματικού βάρους ανά ημέρα και $1.91 \text{ ng} / \text{kg}$ σωματικού βάρους ανά ημέρα για ενήλικες και παιδιά αντίστοιχα^{9,16,17}. Μια άλλη περιβαλλοντική πηγή parabens αποτελούν το χώμα, τα ιζήματα και η λάσπη. Σε μια μελέτη που αναλύθηκαν δείγματα δασικών, γεωργικών εδάφων και ιζημάτων, βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις MePB και PrPB. Οι καταγεγραμμένες τιμές ήταν μέχρι $6,35$, $5,10$, $0,29$, $4,03$, $0,71 \text{ ng} / \text{g}$ ξηρού βάρους (dw) για MePB, EtPB, iPrPB, PrPB, και BuPB, αντίστοιχα. Δείγματα απο μονάδες επεξεργασίας λυμάτων (water waste treatment plants) λήφθηκαν και σε όλα βρέθηκαν parabens, σε συγκεντρώσεις που φτάνουν τα $79600 \text{ ng} / \text{L}$. Τα parabens είναι κυρίως παρόντα στην υδατική φάση των λυμάτων και κατά τη διάρκεια των αναερόβιων διεργασιών που πραγματοποιούνται στο πρώτο στάδιο επεξεργασίας του νερού, η συγκέντρωση όλων των παρόντων parabens μειώθηκε σημαντικά και συνεχίζει να μειώνεται στην επακόλουθη βιολογική επεξεργασία¹⁸.

2.4 Τοξικότητα

Για μεγάλο χρονικό διάστημα, τα parabens θεωρούνταν αβλαβή και ασφαλή στη χρήση τους σε πληθώρα προϊόντων που οι άνθρωποι έρχονται καθημερινά σε επαφή. Στα τέλη του 20^{ου} αιώνα, τα parabens έδειξαν να παρουσιάζουν οιστρογονική δράση, γεγονός που προκάλεσε μια αρχική ανησυχία όσον αφορά την ασφάλειά τους¹⁹. Το 2004, η ανησυχία αυτή επιβεβαιώνεται καθώς parabens εντοπίστηκαν σε όγκους ανθρώπινου μαστού από τον Darbre και τους συνεργάτες του²⁰. Αυτή η αναφορά και επόμενες που ακολούθησαν τροφοδότησαν τη διαμάχη σχετικά με το αν τελικά οι ουσίες αυτές ενδείκνυται για ανθρώπινη χρήση. Οι ιατρικές και επιστημονικές κοινότητες συνεχίζουν, ακόμη και σήμερα, να εξετάζουν ποια είναι η σημασία αυτών των ευρημάτων και ποιο είναι το αντίκτυπο στην ανθρώπινη υγεία. Λόγω του χαμηλού χρόνου ημιζωής που παρουσιάζουν τα parabens όταν απορροφούνται συστηματικά μέσω του δέρματος ή παρεντερικά, θεωρητικά δεν μπορεί να υπάρξει κάποια επιβλαβή βιολογική επίδραση στον οργανισμό. Ωστόσο, η χρόνια χορήγηση parabens μέσω προϊόντων που τα περιέχουν, θα μπορούσε να καταλήξει σε διατήρηση των ουσιών αυτών σε ορισμένα επίπεδα σε βιολογικά υλικά όπως το πλάσμα και ο ιστός.

2.4.1 Ενδροκρινική δράση

Τα parabens έχουν μελετηθεί σε έναν αριθμό *in vitro* και *in vivo* συστημάτων που εξετάζουν την οιστρογονική δραστηριότητα αυτών των ενώσεων²¹⁻²³. Τόσο τα *in vitro* όσο και τα *in vivo* δεδομένα είναι πολύτιμα για την αξιολόγηση της πιθανότητας ότι εξωγενείς ενώσεις με μια ασθενή οιστρογονική δραστηριότητα μπορούν να αποτελέσουν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία²⁴. Από τη μια πλευρά, τα δεδομένα προερχόμενα από *in vitro* ελέγχους παρέχουν χρήσιμες προσεγγίσεις τάξης ισχύος μεταξύ εξεταζόμενων ενώσεων και οιστρογόνων και επίσης μπορεί να καθοριστεί η φύση και η έκταση με την οποία οι ουσίες αυτές αλληλεπιδρούν με έναν υποδοχέα ορμονών. Για παράδειγμα, οι συγκρίσεις ισχύος βασίζονται συνήθως στη σύγκριση μοριακής αναλογίας του μελετώμενου parabene που απαιτείται για να παράγει ένα ισοδύναμο αποτέλεσμα π.χ. ανταγωνιστική δέσμευση σε οιστρογονικό υποδοχέα (ER-α) σε ανθρώπινα MCF-7 κύτταρα, με την ένωση αναφοράς (π.χ., οιστραδιόλη). Μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για τα methyl, ethyl, propyl, butyl και benzyl parabens έχουν διαλευκάνει και σε άλλες πτυχές της οιστρογονικότητας των ενώσεων αυτών, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητας ρύθμισης έκφρασης του γονιδίου CAT που εισάγεται σε κύτταρα MCF-7 και επίδραση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MCF-7²⁵.

Πίνακας 2.1- Σύγκριση δραστηριότητας διάφορων parabens από <i>in vitro</i> μελέτες σε σχέση με το οιστρογόνο 17-β οιστραδιόλη εκφρασμένη σε μοριακή αναλογία ²⁴			
Μελέτες	Συνδέτης που προσδένεται ανταγωνιστικά σε ER των MCF-7 κυττάρων σε σύγκριση με το οιστρογόνο (μοριακή αναλογία)	Ρύθμιση έκφρασης του γονιδίου CAT σε MCF-7 κύτταρα σε σύγκριση με το οιστρογόνο (μοριακή αναλογία)	Πολλ/σμος MCF-7 κυττάρων σε σύγκριση με το οιστρογόνο (μοριακή αναλογία)
Byford et al.(2002)	Estrogen (1) Methyl PB (1.000.000) Ethyl PB (1.000.000) Propyl PB (100.000)	Estrogen (1) Methyl PB (10.000) Ethyl PB (10.000) Propyl PB (10.000)	Estrogen (1) Methyl PB (1.000.000) Ethyl PB (1.000.000) Propyl PB (100.000)
Darbre et al. (2002, 2003)	ButylPB (100.000) iso-ButylPB (100.000) BenzylPB (1000)	ButylPB (1000) iso-ButylPB (1000) BenzylPB (1000)	ButylPB (100.000) iso-ButylPB (100.000) BenzylPB (100.000)
Okubo et al. (2001)			

Από την άλλη πλευρά, μόνο τα *in vivo* δεδομένα μπορούν να αποδείξουν ότι οι ουσίες με ενδοκρινικοί δράση επηρεάζονται από την απορρόφηση, τη διανομή, το μεταβολισμό και την απέκκριση σε έναν ζωντανό οργανισμό. Η σύγκριση δραστηριότητας βασίζεται στη χαμηλότερη δόση ενός parabens που παρήγαγε στατιστικά σημαντική επίδραση σε σύγκριση με την ένωση αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη²³. Συνεπώς, μία συνδυασμένη *in vitro* /*in vivo* προσέγγιση είναι απαραίτητη για να κατανοηθεί πλήρως η δραστηριότητα των εν λόγω ενώσεων.

2.4.2 Επιδράσεις στο αναπαραγωγικό σύστημα

Τα parabens έχουν εμπλακεί στην εξασθένιση του αναπαραγωγικού συστήματος αρσενικών πειραματόζωων, και υπάρχει ανησυχία για αντίστοιχη επίδρασή τους στην ανθρώπινη γονιμότητα. Η κρυπτορχιδία, η μειωμένη ποιότητα σπέρματος, ο καρκίνος των όρχεων και η υποσπαδίαση, ομαδοποιούνται ως μέρος του συνδρόμου δυσγενεσίας των όρχεων (testicular dysgenesis). Πιο συγκεκριμένα, *in vitro* μελέτες έδειξαν πως τα methyl, propyl και butyl parabens είναι ανταγωνιστές υποδοχέα ανδρογόνου και για αυτό οι ενώσεις αυτές έχουν προταθεί ως πιθανή αιτία του παραπάνω συνδρόμου^{21,24}.

2.4.3 Καρκινογένεση

Ο Darbre και οι συνεργάτες του απέδειξαν την παρουσία μεμονωμένων parabens σε όγκους ανθρώπινου μαστού²⁰. Μεταγενέστερες μελέτες αξιολόγησαν την παρουσία πέντε parabens σε τέσσερις σειριακές θέσεις σε όλο το γυναικείο στήθος, από τη μασχάλη έως το στέρνο, σε 60 γυναίκες που υποβλήθηκαν σε μαστεκτομή σε περιπτώσεις καρκίνου του μαστού. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι ένα ή περισσότερα parabens ήταν μετρήσιμα σε 158 από τα 160 δείγματα ιστών (99%) και σε 96 από τα 160 δείγματα ιστών (60%) και τα πέντε parabens ήταν παρόντα (methyl, ethyl, propyl, butyl, benzyl - paraben). Τα υψηλότερα επίπεδα βρέθηκαν στην περιοχή της μασχάλης, που παραδοσιακά αποτελεί τον υψηλότερο ανατομικό κίνδυνο για εκδήλωση καρκίνου του μαστού σε σχέση με τις άλλες περιοχές. Αυτό διαπιστώθηκε ακόμα και στις γυναίκες που δεν είχαν χρησιμοποιήσει ποτέ αποσμητικό²⁶.

Μετά από τοπική εφαρμογή τα parabens υδρολύονται σε κάποιο ποσοστό σε π-υδροξυβενζοϊκό οξύ από τις καρβοξυεστεράσες του δέρματος, αν και η υδρόλυση αυτή δεν είναι πλήρης¹⁹. Αυτός ο ανεπαρκής μεταβολισμός των parabens συνεπάγεται αυξημένο κίνδυνο παραμονής στο δέρμα και μεγαλύτερη απορρόφησή τους²⁷. Ο Ishiwatari και οι συνεργάτες του ανίχνευαν ποσότητα methyl paraben στην επιδερμίδα και εξέτασαν την επίδραση του. Εντοπίστηκε βιολογική

δραστηριότητα η οποία συμπεριελάμβανε τη μεταβολή μορφολογίας των κυττάρων κερατίνης, τη μείωση της έκφρασης της υαλουρονικής συνθάση τύπου I και II και του κολλαγόνου τύπου IV, αλλαγές που παίζουν ρόλο στη γήρανση των κυττάρων της κεράτινης στοιβάδας. Επιπλέον, έχει μελετηθεί η επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε συνδυασμό με τη δράση των parabens στα κερατινοκύτταρα. Η επαγωγή οξειδωτικού στρες, η παραγωγή νιτρικού οξειδίου και η υπεροξειδωση λιπιδίων έχουν αναφερθεί *in vitro* και είναι πολύ πιθανό να λάβουν χώρα σε ασθενείς που χρησιμοποιούν καλλυντικά που περιέχουν parabens και να οδηγήσουν σε δημιουργία καρκινωμάτων κερατινοκυττάρων^{28,29}. Μέχρι σήμερα δεν υπάρχουν αποτελέσματα από *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους που να συνδέουν την πρόκληση καρκίνου του δέρματος από συνδυασμό UV ακτινοβολίας και parabens.

2.4.4 Αλλεργίες

Τα parabens, όπως συμβαίνει με πολλά συντηρητικά, μπορεί να είναι αλλεργιογόνα σε ένα μικρό υποσύνολο του πληθυσμού. Αυτή η ευαισθητοποίηση εκδηλώνεται συνήθως με τη μορφή εκζεματώδους εξανθήματος. Τα ποσοστά αναφερόμενης ευαισθητοποίησης σε parabens κυμαίνονται από 0,5% έως 3,5% και είναι μεταξύ των χαμηλότερων από όλα τα συντηρητικά^{74,75}. Επιπλέον, υπάρχουν αναφορές άμεσων αλλεργικών αντιδράσεων οι οποίες σπανίζουν, όπως κνίδωση και βρογχοσπασμός, οι οποίες είναι αποτέλεσμα της πρόσδεσης μορίου parabens σε υποδοχείς της IgE που βρίσκεται προσκολλημένη στη μεμβράνη των σιτευτικών κυττάρων και των βασεόφιλων^{76,77}.

2.4.5 Μεταβολικό σύνδρομο

Στοιχεία από *in vitro* μελέτες δείχνουν πως τα parabens μπορούν να δεσμευτούν σε υποδοχείς οιστρογόνων και να αναστείλουν την σουλφοτρανσφεράση των οιστρογόνων (SULT), ένα ένζυμο που διευκολύνει τη βιομετατροπή πολλών φαρμακευτικών ουσιών. Η ανασταλτική δράση στο ένζυμο αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του επιπέδου των οιστρογόνων στον οργανισμό, γεγονός που μπορεί να προκαλέσει δυσμενείς επιπτώσεις^{78,79}. Στους ενήλικες άντρες, τα οιστρογόνα προστατεύουν τον οργανισμό από την παχυσαρκία και το μεταβολικό σύνδρομο μέσω μηχανισμών, συμπεριλαμβανομένης της μετατροπής του λευκού σε υγρές καφέ λίπος, της εναπόθεσης του λίπους στον υποδόριο ιστό και όχι στα σπλάχνα, του περιορισμού της όρεξης και της αύξησης της βασικής ενέργειας για τις λειτουργίες του μεταβολισμού (BEE)⁸⁰. Όταν τα

επίπεδα οιστρογόνων δεν είναι σε ισορροπία με αυτά της τεστοστερόνης στους άντρες, μπορεί να προκληθούν περιπτώσεις μεταβολικού συνδρόμου αλλά και να προκληθεί αρνητική επίδραση στις ορμόνες του αναπαραγωγικού συστήματος. Σε μια πρόσφατη μελέτη που διεξήχθη σε πληθυσμό του Καναδά, παρατηρήθηκε ότι άνδρες που έπασχαν από μεταβολικό σύνδρομο σχετίζονται με ορισμένες συγκεντρώσεις propyl paraben που ανιχνεύτηκαν σε δείγματα ούρων, ενώ στον εξεταζόμενο γυναικείο πληθυσμό δεν παρατηρήθηκε αυτή η συσχέτιση ⁸¹. Αυτή η μελέτη βιοπαρακολούθησης είναι η πρώτη που ασχολήθηκε σε εθνικό επίπεδο με τη συσχέτιση parabens με περιπτώσεις μεταβολικού συνδρόμου, και τα αποτελέσματα αυτά για να επιβεβαιωθούν θα πρέπει να διεξαχθούν περισσότερες αντίστοιχες μελέτες .

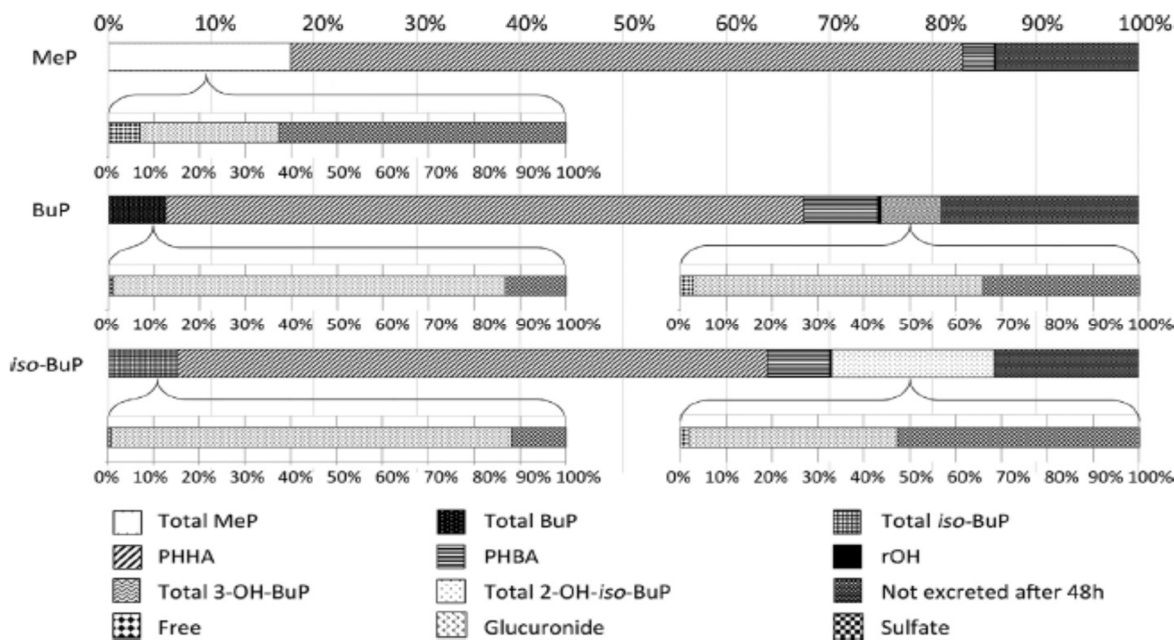
2.5 Μεταβολισμός

Πολλοί ερευνητές έχουν μελετήσει το μεταβολισμό των parabens στους ζωντανούς οργανισμούς. Η βιβλιογραφία έχει δείξει ότι τα parabens απορροφώνται ύστερα από τοπική εφαρμογή τους καθώς και μετά από λήψη τροφής και μέσω της εισπνοής ^{9,30}. Μετά από τη δερματική απορρόφηση τους στα κερατινοκύτταρα, οι εστέρες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος υδρολύονται μερικώς σε PHBA και μεταφέρονται εύκολα στην κυκλοφορία του αίματος. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή μειώνει τις αρνητικές επιδράσεις των parabens όπως η αυξημένη παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) και νιτρικού οξειδίου (NO) καθώς και τη νέκρωση των κερατινοκυττάρων ³¹.

Το πρώτο στάδιο της βιομετατροπής των parabens είναι η διαδικασία υδρόλυσης σε PHBA και αλκοόλη. Αυτή η αντίδραση καταλύεται από τις εστεράσες, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων καρβοξυλεστεράσεων 1 (hCE1) και 2 (hCE2). Τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από διαφορετική συγγένεια υποστρώματος: η hCE1 εμφανίζει υψηλότερη συγγένεια με parabens με μικρή αλκυλο- υποκαταστάτη (MeP και EtP), ενώ η hCE2 είναι πιο επιλεκτική προς ενώσεις με μακρά αλκυλική αλυσίδα (BuP και BzP). Πολλές μελέτες σε ανθρώπους και ζώα επιβεβαίωσαν ότι η υδρόλυση του εστερικού δεσμού στα parabens πραγματοποιείται σε μικροσώματα του ήπατος, στο λεπτό έντερο και εν μέρει στα δερματικά στρώματα επιδερμίδα και δερμίδα. Η ταχύτητα της υδρόλυσης στα μικροσώματα του ανθρώπινου ήπατος μειώνεται με αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας ^{32,33}.

Η δεύτερη φάση της βιομετατροπής των parabens λαμβάνει χώρα στα μικροσώματα του ήπατος, όπου πραγματοποιείται σύζευξη με γλυκουρονικό οξύ,θειικό οξύ και γλυκίνη. Ο σχηματισμός

των γλυκουρονικών παραγώγων καταλύεται από τις UDP-γλυκουρονοζυλτρανσφεράσες ³⁰. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα γλυκουρονικά παράγωγα των MeP και PrP που βρέθηκαν να είναι σταθερά στο πλάσμα ακόμη και μετά από 30 ημέρες από την χορήγησή τους ³⁴. Σύμφωνα με τους Abbas και συνεργάτες του, τα parabens μεταβολίζονται στον οργανισμό και δε συσσωρεύονται στους ιστούς ³⁵. Ωστόσο, όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως, η παρουσία parabens σε καρκινικό ιστό από ανθρώπινο μαστό οδήγησε στη συζήτηση σχετικά με την καρκινογόνο δράση των ουσιών αυτών. Η παρατηρούμενη συσσώρευση MeP, BuP, και BzP σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα του μαστού (MCF7) θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της έλλειψης των καρβοξυλεστερασών CE1 και CE2 σε αυτά τα κύτταρα ³⁶. Η κύρια απεκκριτική οδός των θεικών και γλυκουρονικών παραγώγων των parabens (μεταβολίτες) είναι μέσω των ούρων και σε μικρότερο βαθμό μέσω των περιττωμάτων και της χολής ^{9,30,37}. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μικρές ποσότητες parabens (MeP, EtP, PrP) χαμηλού μοριακού βάρους απεκκρίνονται μέσω των ούρων χωρίς να έχουν υποστεί καμία βιομετατροπή ³⁸. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αξιολόγηση των μεταβολιτών των parabens στα ούρα χρησιμοποιείται στη βιοπαρακολούθηση της έκθεσης του οργανισμού στις εν λόγω ουσίες.



Σχήμα 2.2 - Μεταβολίτες parabens σε ανθρώπινα ούρα μετά από 48 ώρες από *peros* χορήγησή τους. (Aubert et al.,2012)

2.6 Νομοθετικό πλαίσιο

Στα τέλη του 20^{ου} αιώνα, ο φορέας FDA ταξινόμησε τα parabens ως γενικώς αναγνωρισμένα ασφαλή (GRAS), ακόμη και αν και η χρήση τους περιορίστηκε από άλλους φορείς ^{13,38}. Το 1974, από κοινού ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) και η επιτροπή εμπειρογνομόνων για τα πρόσθετα τροφίμων (JECFA), καθόρισε την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) των MePB, EtPB και PrPB ως 10 mg/kg b.w./24h. Ωστόσο, το 2007, ως απάντηση στις συχνά αναφορές σχετιζόνταν με υψηλή κυτταροτοξικότητα, η οποία δεν είναι τόσο αμελητέα όπως ισχυριζόταν παλαιότερα, η JECFA απέσυρε το PrPB από την αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη. Το 2010, η Επιστημονική Κοινότητα για την Ασφάλεια των Καταναλωτών (SCCS) συνέστησε ότι η συγκέντρωση των PrPB και BuPB στα καλλυντικά προϊόντα δεν πρέπει να υπερβαίνει το 0,19% ³⁹. Επιπλέον, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) και τον FDA, parabens που χρησιμοποιούνται ως καλλυντικά πρόσθετα δεν πρέπει να υπερβαίνουν σε συγκέντρωση το 0,4%, όταν πρόκειται για έναν εστέρα και τη συγκέντρωση 0,8% όταν χρησιμοποιούνται ως μείγμα.

Πίνακας 2.2- Μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις parabens σε καλλυντικά ανα τον κόσμο		
Οργανισμός	Οδηγία	Υψηλότερη επιτρεπόμενη συγκέντρωση
Ευρωπαϊκή Ένωση	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία (EC) No.1223/2009	<ul style="list-style-type: none">• 0,4 % για έναν εστέρα• 0,8 % για μείγμα εστέρων
Δανία	Υπουργείο Περιβάλλοντος/Διάταξη για καλλυντικά προϊόντα	<ul style="list-style-type: none">• 0,4 % για έναν εστέρα• 0,8 % για μείγμα εστέρων• PrPB, iso-PrPB, ButPB, iso-ButPB και τα άλατα τους απαγορεύεται να χρησιμοποιούνται σε προϊόντα για παιδιά κάτω των 3 ετών
ΗΠΑ	Ομοσπονδιακός νόμος για τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά (FD&C Act)	<ul style="list-style-type: none">• 0,4 % για έναν εστέρα• 0,8 % για μείγμα εστέρων

Ιαπωνία	Νόμος περι φαρμακευτικών ζητημάτων (Japan's Pharmaceutical and Cosmetic Act)	<ul style="list-style-type: none"> • 1,0% για έναν εστέρα • 1,0 % για μείγμα εστέρων
Καναδάς	Νόμος περί τροφίμων και φαρμάκων (Food and Drugs Act)	Δεν υπάρχουν περιορισμοί

Από το 2014, στις χώρες της ΕΕ συμπεριλαμβανομένης και της Πολωνίας, το περιεχόμενο των EtP και BuP στα καλλυντικά μειώθηκε από 0,4% σε 0,14% για έναν μόνο εστέρα. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία που αναφέρει την υψηλή κυτταροτοξικότητα των parabens που είναι διακλαδισμένα ή διαθέτουν μακρά αλκυλική αλυσίδα, έχει εισαχθεί απαγόρευση σχετικά με τη χρήση των iso-PrPB και iso-BuPB, καθώς και για τα BzPB και PrPB. Στην περίπτωση των φαρμάκων, τα parabens είτε μεμονωμένα είτε ως μείγμα, δεν μπορούν να υπερβούν το 0,1% και 0,3% αντίστοιχα. Επιπλέον στα τρόφιμα, η παρουσία parabens θα πρέπει να υποδηλώνεται σαφώς με το σύμβολο E πάνω στην ετικέτα του προϊόντος. Τα parabens στα τρόφιμα ταξινομούνται ως "Συντηρητικά" και κατηγοριοποιούνται μεταξύ E200-E299. Στον πίνακα 2.2 παρουσιάζονται οι μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις parabens σε καλλυντικά ανα τον κόσμο

3 Φάρμακα και θηλασμός

3.1 Φυσιολογία της γαλουχίας

Η διαδικασία της γαλακτογένεσης και ο μητρικός θηλασμός είναι αρκετά σύνθετοι μηχανισμοί, καθώς ποικίλοι εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες επηρεάζουν την ικανότητα κάθε μητέρας να θηλάσει. Η σωματική και ψυχική υγεία της, κοινωνικοοικονομικοί παράγοντες, προηγούμενες εμπειρίες σχετικές με τον θηλασμό, αλλά και η αλληλεπίδραση μητέρας-νεογνού τις πρώτες ημέρες μετά τον τοκετό είναι κάποιοι από αυτούς. Προϋπόθεση είναι η διαμόρφωση του μαστικού αδένα από την εμβρυική ζωή, η οποία κατά τη διάρκεια της κύησης οδηγεί στη γαλουχία με τα τρία στάδια της γαλακτογένεσης και την υποστροφή^{40,41}.

Η γαλουχία παρουσιάζει τέσσερα στάδια:

- Την εκκριτική διαφοροποίηση (Γαλακτογένεση I),
- την εκκριτική ενεργοποίηση (Γαλακτογένεση II) και
- την γαλακτοποίηση (Γαλακτογένεση III)
- την υποστροφή

3.1.1 Γαλακτογένεση I

Η γαλακτογένεση I ή εκκριτική διαφοροποίηση κατά την παλαιότερη ορολογία, είναι η περίοδος κατά την εγκυμοσύνη που τα μαστικά επιθηλιακά κύτταρα διαφοροποιούνται σε γαλακτοκύτταρα, δηλαδή σε κύτταρα ικανά να συνθέσουν τα συστατικά του γάλακτος. Η γαλακτογένεση I ξεκινά μετά το 1^ο τρίμηνο κύησης. Στο πλαίσιο της γαλακτογένεσης I, κατά το δεύτερο ήμισυ της εγκυμοσύνης, η εκκριτική δραστηριότητα επιταχύνεται με αποτέλεσμα τα λοβία και οι κυψελίδες να διαστέλλονται από τη συσσώρευση σταγονιδίων λίπους και πρωτεϊνών για την παραγωγή του πρωτογάλακτος (πύαρ). Ουσίες, ωστόσο, όπως η λακτόζη, η καζεΐνη, η α-λακταβουλμίνη επαναρροφώνται στην κυκλοφορία, στο πρώτο μισό της εγκυμοσύνης, λόγω των χαλαρών συνδέσεων μεταξύ των γαλακτοκυττάρων, που επιτρέπουν τη διόδο αυτών των συστατικών προς τη μητρική κυκλοφορία.

3.1.2 Γαλακτογένεση II

Η γαλακτογένεση II ή εκκριτική ενεργοποίηση, όπως είναι ο παλαιότερος όρος, είναι η έναρξη της άφθονης παραγωγής του γάλακτος, που συνοδεύεται από αλλαγές στη σύστασή του και συμβαίνει μέσα στις πρώτες 4 ημέρες από τον τοκετό, συνήθως γύρω στις 30-40 ώρες μετά τον τοκετό. Μετά την έξοδο του πλακούντα στον τοκετό και την υποχώρηση της προγεστερόνης, η προλακτίνη γίνεται ο κυρίαρχος ορμονικός παράγων που ρυθμίζει την γαλακτοπαραγωγή. Στη φάση αυτή η προλακτίνη παράγεται μόνο από την υπόφυση (κεντρική παραγωγή). Κατά τη γαλακτογένεση II, οι κυτταρικές συνδέσεις μεταξύ των γαλακτοκυττάρων, οι οποίες ως τώρα ήταν χαλαρές (A), με αποτέλεσμα να διακινούνται υψηλές συγκεντρώσεις νατρίου, χλωριούχων και πρωτεϊνών μεταξύ των κυττάρων, κλείνουν προοδευτικά (B). Παύει, δηλαδή, να λειτουργεί το «παρακυτταρικό» μονοπάτι μεταφοράς συστατικών μεταξύ τριχοειδών αιμοφόρων αγγείων και γαλακτοφόρων κυψελίδων με αποτέλεσμα να αλλάζει η σύσταση του γάλακτος από το πύαρ (1^η- 4^η ημέρα), στο μεταβατικό γάλα (4^η-14^η ημέρα) και τελικά προς το ώριμο γάλα (>14^η ημέρα).



Σχήμα 3.1 - Αλλαγή στη συνοχή των γαλακτοκυττάρων πριν (A) και μετά (B) την έναρξη της γαλακτογένεσης II (Ballard et al., 2013)

3.1.3 Γαλακτογένεση III

Η γαλακτογένεση III ή γαλακτοποίηση και εδραίωση είναι η φάση στην οποία διατηρείται η γαλουχία, μέσα από αυτοκρινείς μηχανισμούς που δρουν ανεξάρτητα σε κάθε στήθος. Ξεκινά μετά

την 3η ημέρα, ρυθμίζεται από ποικίλες ορμόνες και χαρακτηρίζεται από τη μετάβαση στην αυτοκρινική λειτουργία του μαζικού αδένου. Η παραγωγή της προλακτίνης δε γίνεται πλέον αυτόματα από την υπόφυση αλλά εξαρτάται από τον συχνό ερεθισμό της θηλής. Όταν το μωρό θηλάζει, ο ερεθισμός της θηλής οδηγεί σε διέγερση του υποθαλάμου, με αναστολή της ντοπαμίνης και αύξηση των επιπέδων της προλακτίνης 30-45 λεπτά μετά την έναρξη του θηλασμού.

3.1.4 Υποστρόφη

Κατά τη φάση του αποθηλασμού, ο μαστός αρχίζει να υποστρέφει, καθώς η διακοπή του ερεθισμού του μαστού οδηγεί σε μείωση των γαλακτογόνων ορμονών. Έτσι το στήθος επιστρέφει αργά στην προ της εγκυμοσύνης κατάσταση.

3.2 Σύσταση ανθρώπινου μητρικού γάλακτος

Το ανθρώπινο μητρικό γάλα είναι μια πολύπλοκη μήτρα που περιέχει 3 - 5% λίπος, 0,8% - 0,9% πρωτεΐνη, 6,9 - 7,2% υδατάνθρακες υπολογιζόμενες ως λακτόζη και 0,2% ανόργανα συστατικά εκφραζόμενα ως τέφρα. Με άλλα λόγια, αυτό το βιολογικό υλικό περιέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά και συστατικά που προστατεύουν το ανοσοποιητικό σύστημα, ικανοποιώντας έτσι τις διατροφικές απαιτήσεις του βρέφους και εξασφαλίζοντας την υγιή ανάπτυξή του ^{42,43}. Κατά τη διάρκεια των πρώτων εβδομάδων γαλουχίας, το βρέφος λαμβάνει το λεγόμενο πύαρ ή πρωτόγαλα, που είναι ένα διαυγές κιτρινωπό υγρό με υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, ανοσοσφαιρίνες, αλλά χαμηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και υδατάνθρακες (λακτόζη). Μέχρι το τέλος του πρώτου μήνα θηλασμού, το γάλα λαμβάνει την τελική του σύνθεση, που συνεπάγεται με μείωση των πρωτεϊνών και αύξηση της λακτόζης και του λίπους. Το γάλα αυτό ονομάζεται ώριμο γάλα, και είναι ουσιαστικά ένα γαλάκτωμα αποτελούμενο από 88% έως 95% υδατική φάση με πρωτεΐνη και υδατάνθρακες και τη λιπαρή φάση να αποτελεί το υπόλοιπο ποσοστό του γαλακτώματος. Η σύνθεση του ανθρώπινου γάλακτος ποικίλλει ανάλογα με την περίοδο θηλασμού αλλά και τη μητρική διατροφή⁴⁴.



Σχήμα 3.2 - Σύνθεση ανθρώπινου μητρικού γάλακτος (Ballard et all.,2013)

Ο θηλασμός προστατεύει τα βρέφη από μολύνσεις και φλεγμονές, συμβάλλει στην ανάπτυξη του ανοσοποιητικού συστήματος και των οργάνων και επιτρέπει τον αποικισμό υγιούς μικροχλωρίδας^{45,46}. Μικρά λιπόφιλα οργανικά μόρια, τα οποία είναι μη ιονισμένα σε φυσιολογικές τιμές pH, προερχόμενα από το πλάσμα του αίματος εύκολα διεισδύουν τα κύτταρα των μαστικών αδένων ώστε να συγκεντρωθούν στα σφαιρίδια λίπους. Κατά συνέπεια, μπορούν να μεταφερθούν σημαντικές ποσότητες πολλών χημικών ουσιών στο ανθρώπινο γάλα μετά από μακροχρόνια έκθεση (συσσώρευση ενώσεων) ή περιοδικά υψηλή έκθεση⁴⁷. Το μητρικό γάλα είναι η κύρια οδός από την οποία τα θηλάζοντα βρέφη εκτίθενται σε περιβαλλοντικές χημικές ουσίες, όπως ενώσεις που περιέχονται στα προϊόντα προσωπικής φροντίδας. Πράγματι, οι θηλάζουσες γυναίκες μπορούν να εκθέσουν τα παιδιά τους σε επιβλαβή επίπεδα parabens στα πρώτα στάδια της ζωής τους, όταν τα βρέφη είναι ιδιαίτερα ευάλωτα⁴⁸. Για το λόγο αυτό η ανάλυση parabens σε δείγματα μητρικού γάλακτος έχει γίνει ένα θέμα με μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον.

3.3 Φαρμακοκινητική κατά τον θηλασμό

Με βάση μόνο το μοριακό βάρος, τα περισσότερα φάρμακα μπορούν να διασχίσουν βιολογικές μεμβράνες στο μητρικό γάλα σε κάποιο βαθμό, με εξαίρεση τα φάρμακα υψηλού μοριακού

βάρους, όπως η ηπαρίνη. Ο βαθμός ιοντισμού του φαρμάκου και το σχετικό pH του μητρικού πλάσματος και του μητρικού γάλακτος παίζουν επίσης κάποιο ρόλο, όπως και η σχετική συγγένεια του φαρμάκου με το γάλα και τις πρωτεΐνες του πλάσματος. Τα φάρμακα που δεσμεύονται σε υψηλό ποσοστό με πρωτεΐνες στο πλάσμα, έχουν περιορισμένη απομάκρυνση από το μητρικό πλάσμα προς το μητρικό γάλα. Έρευνες ωστόσο υπέδειξαν ύπαρξη φορέων μεταφοράς φαρμάκων σε όλο το στήθος, έτσι πολύ περισσότερη ποσότητα κατέληγε στο μητρικό γάλα από το αναμενόμενο.

Πίνακας 3.1- Παράγοντες που ευνοούν την είσοδο φαρμάκων στο μητρικό γάλα	
Μοριακό Βάρος	Τα φάρμακα με χαμηλό MB (<500 Da) έχουν υψηλότερα επίπεδα στο πλάσμα της μητέρας.
Πρόσδεση σε πρωτεΐνες του πλάσματος	Η υψηλή πρόσδεση του φαρμάκου στις πρωτεΐνες του πλάσματος της μητέρας μειώνει την έκθεση του βρέφους στο φάρμακο
pKa φαρμάκου	Υψηλό (pKa>7.2) συνεπάγεται παγίδευση του φαρμάκου στο μητρικό γάλα, διότι το μητρικό γάλα έχει pH 7-7.2
Λιποφιλία	Όσο πιο λιπόφιλο το φάρμακο τόσο υψηλότερες οι συγκεντρώσεις του στο γάλα
Χρόνος μετά τον τοκετό	Τις πρώτες ημέρες της λακτογένεσης οι συνδέσεις μεταξύ των γαλακτοκυττάρων είναι χαλαρές. Αυτό επιτρέπει μεταφορά φαρμάκων στο μητρικό γάλα μέσω των συνδέσεων των κυττάρων. Μερικές μέρες μετά τον τοκετό που τα γαλακτοκύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος, οι διακυτταρικές αυτές συνδέσεις κλείνουν πιο στεγανά

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την είσοδο ενός φαρμάκου στο μητρικό γάλα περιλαμβάνουν τη δόση, τη συχνότητα, τη συμμόρφωση κατά τη λήψη και την οδό χορήγησης του μητρικού φαρμάκου. Επίσης, οι φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες του φαρμάκου στον οργανισμό της θηλάζουσας μητέρας και πιο συγκεκριμένα ο χρόνος του θηλασμού σε συνάρτηση με το χρονοδιάγραμμα χορήγησης του φαρμάκου είναι ύψιστης σημασίας καθώς καθορίζουν τι

ποσότητα φαρμάκου θα καταναλώσει το βρέφος. Συμπερασματικά, φάρμακα με χαμηλή πρωτεϊνική σύνδεση, χαμηλό μοριακό βάρος, υψηλή λιποφιλία και κατιοντικό χαρακτήρα, έχουν περισσότερες πιθανότητες να μεταφερθούν στο μητρικό γάλα. Ωστόσο, γίνεται εμφανές ότι η ποικιλία των παραγόντων που επηρεάζουν τη μεταφορά φαρμάκων εντός του μητρικού γάλακτος, κάνει πολυπλοκότερες τέτοιου είδους μελέτες ⁴⁹.

3.4 Αλληλεπίδραση φαρμάκων με το νεογνό

Το μητρικό γάλα, εκτός από τον θρεπτικό και προστατευτικό χαρακτήρα που έχει όσον αφορά το νεογνό, αποτελεί κύρια οδό μεταφοράς φαρμακευτικών ουσιών από τη μητέρα που θηλάζει στο βρέφος. Το γεγονός ότι κάποια φάρμακα έχουν αποδεδειγμένες ανεπιθύμητες ενέργειες κατά την εγκυμοσύνη ή είναι εμβρυοτοξικά δεν σημαίνει ότι απαραίτητα θα είναι επιβλαβή κατά το θηλασμό ⁵⁰.

Πίνακας 3.2 - Ταξινόμηση φαρμάκων κατά τον θηλασμό	
Ταξινόμηση κατά Hale	Ιδιότητες φαρμάκων
L1	Ασφαλέστατο: υπάρχουν μελέτες και πολυετής κλινική εμπειρία (παρακεταμόλη, ιβουπροφαίνη, επινεφρίνη)
L2	Ασφαλέστερο: υπάρχει περιορισμένη κλινική εμπειρία, αλλά δεν έχουν αναφερθεί ανεπιθύμητες ενέργειες στα βρέφη (δικλοφενάκη, φαιντανύλη, σετιριζίνη, ομεπραζόλη, κεφαλοσπορίνες)
L3	Σχετικώς ασφαλή (ακαρβόζη, ασπιρίνη, ινδομεθακίνη, κωδεΐνη, μορφίνη)
L4	Πιθανώς επικίνδυνα (Κολχικίνη, λίθιο, εργοταμίνη)
L5	Αντενδείκνυται: ουσίες που ανήκουν στην κατηγορία των αναστολέων του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (κιναπρίλη, περινδοπρίλη, ραμιπρίλη, καπτοπρίλη, βεναζεπρίλη, λισινοπρίλη)

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την δράση των φαρμάκων, τα οποία λαμβάνει η μητέρα, στο θηλάζον νεογνό είναι οι παρακάτω:

- Η οδός χορήγησης του φαρμάκου στη μητέρα και η απορρόφησή του.

- Ο μεταβολισμός, η σύνδεσή του με πρωτεΐνες του πλάσματος, η διαλυτότητά του στο νερό και η απέκκριση του φαρμάκου στο γάλα της μητέρας.
- Ο αριθμός των δόσεων, άπαξ ημερησίως ή περισσότερες δόσεις, η μακροχρόνια ή διακεκομμένη χορήγηση.
- Η φαρμακοκινητική του φαρμάκου.
- Η ωριμότητα του νεογνού, η οποία καθορίζει την ικανότητά του να απορροφά, να μεταβολίζει και να αποβάλλει την ουσία. Τα πρόωρα, τα άρρωστα και τα ελλιποβαρή νεογνά έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης αυξημένων επιπέδων φαρμάκων στην κυκλοφορία τους.
- Το ολικό ποσό των φαρμάκων που μεταφέρονται στο νεογνό και το βρέφος μέσω του γάλακτος της μητέρας, είναι πολύ μικρότερο από τα ποσά που μεταφέρονται μέσω του πλακούντα κατά την εγκυμοσύνη.

Δείκτες Εκτίμησης της Έκθεσης του Βρέφους στο φάρμακο:

- Milk/Plasma ή Milk/Serum ratio: Ένας δείκτης που χρησιμοποιείται συχνά για την εκτίμηση της φαρμακολογικής έκθεσης του βρέφους σε φάρμακο που χορηγείται στην μητέρα κατά τη γα-λουχία και είναι ο λόγος μεταξύ των συγκεντρώσεων του φαρμάκου στο γάλα προς τη συγκέντρωσή του στο πλάσμα ή τον ορό (M/P ή M/S). Αν ο λόγος είναι μικρότερος του 1, τότε το φάρμακο θεωρείται ασφαλές κατά τη γαλουχία. Ο λόγος αυτός είναι παράμετρος εξαρτώμενη από παράγοντες όπως ο χρόνος έκθεσης, η σύσταση του γάλακτος και η φαρμακοκινητική.
- Ο δείκτης έκθεσης του βρέφους στο φάρμακο (E.I.) είναι μια σταθερά, που συνδυάζει το λόγο M/P, την ποσότητα του γάλακτος που παίρνει το μωρό και την κάθαρση του φαρμάκου από το μωρό. Εκφράζεται με ποσοστό επί της εκατό της θεραπευτικής δόσης του φαρμάκου για το βρέφος μετά από προσαρμογή στο βάρος του

$$\text{Δείκτης έκθεσης (Exposure Index \%)} = \frac{100 \times \frac{M}{P} \times A}{\text{Κάθαρση γάλακτος από το βρέφος (mL/kg/min)}}$$

Όπου A = ημερήσια πρόσληψη γάλακτος από το μωρό

Συνεπώς φάρμακα με χαμηλά επίπεδα κάθαρσης έχουν υψηλό δείκτη έκθεσης. Επίσης η ποσότητα γάλακτος που παίρνει το μωρό είναι καθοριστικός παράγων έκθεσης π.χ. ένα μωρό που τρέφεται αποκλειστικά με μητρικό γάλα είναι λογικό να εκτίθεται περισσότερο στο ίδιο φάρμακο σε σχέση με ένα νήπιο που θηλάζει 2-3 φορές/ημέρα. Δεν υπάρχει επιστημονικά τεκμηριωμένο ασφαλές όριο έκθεσης. Δείκτης έκθεσης άνω του 10 % έχει επικρατήσει να θεωρείται υψηλός και μη ασφαλής για το βρέφος.

Σχετική δόση βρέφους (Relative Infant Dose): Είναι το πηλίκο της ημερήσιας δόσης φαρμάκου ανά κιλό βάρους που μπορεί να λαμβάνει το βρέφος προς την ημερήσια δόση της μητέρας ανά κιλό βάρος σώματός της. Πρέπει να είναι μικρότερη του 10 %, για να θεωρηθεί ότι το φάρμακο είναι ασφαλές και να χρησιμοποιηθεί κατά τον θηλασμό.

$$\text{Σχετική δόση βρέφους (Relative Infant Dose \%)} = \frac{\text{Δόση Φαρμάκου στο βρέφος (}\mu\text{g/kg/ημέρα)} \times 100}{\text{Δόση φαρμάκου που λαμβάνει η μητέρα (}\mu\text{g/kg/ημέρα)}}$$

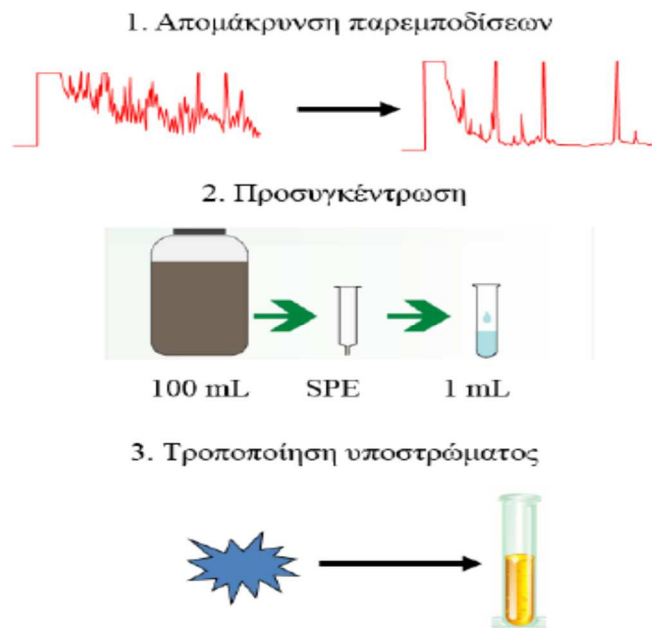
Λόγω της ύπαρξης χρόνιων ή ευκαιριακών προβλημάτων υγείας σε πολλές νέες μητέρες που επιθυμούν να θηλάσουν, πρέπει να ληφθεί θεραπεία για να βελτιωθεί η κατάστασή τους. Σε τέτοιες περιπτώσεις, πρέπει να αξιολογείται η θεραπευτική αξία και επιτακτικότητα λήψης φαρμακευτικής αγωγής, ώστε να διασφαλίζεται η απαραίτητη ασφάλεια για το νεογνό.

4 Κεφάλαιο 4. Μέθοδοι κατεργασίας βιολογικών δειγμάτων

4.1 Εισαγωγή

Η προκατεργασία του δείγματος είναι ένας σημαντικός παράγοντας σε κάθε προτεινόμενη αναλυτική μέθοδο. Καταλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος του συνολικού χρόνου ανάλυσης, οπότε παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαμόρφωση του τελικού χρόνου που απαιτείται για την έκδοση του αποτελέσματος για κάθε δείγμα. Τα δείγματα υφίστανται κατάλληλη τροποποίηση και προετοιμασία, έτσι ώστε να απομακρυνθούν οι οποιεσδήποτε παρεμποδίσεις, να προσυγκεντρωθεί εκλεκτικά το σύνολο των προσδιοριζόμενων ενώσεων, ενώ παράλληλα προστατεύεται και το χρησιμοποιούμενο όργανο αποφεύγοντας προβλήματα, όπως το μπλοκάρισμα της αναλυτικής στήλης ή η μη αναστρέψιμη προσρόφηση των ενώσεων στη στήλη⁵¹. Η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου προκατεργασίας έγκειται:

- Στην εκλεκτική παραλαβή των ενώσεων, αφήνοντας στο υπόστρωμα τις τυχόν υπάρχουσες παρεμποδίσεις.
- Στην αυξημένη ταχύτητα ανάλυσης, έτσι ώστε να μπορεί να εφαρμοστεί σε μεγάλο αριθμό δειγμάτων.
- Στην επαναληψιμότητα των ανακτήσεων των ενώσεων για τις ίδιες συνθήκες.
- Στην ευκολία της προκατεργασίας.
- Στο χαμηλό κόστος αγοράς αλλά και στη φιλικότητα ως προς το περιβάλλον, βάσει του συνολικού όγκου κατανάλωσης των διαλυτών. Επιπλέον, στις σύγχρονες απαιτήσεις συμπεριλαμβάνονται και η δυνατότητα αυτοματοποίησης, σμίκρυνσης, αλλά και η προσαρμογή στις προσαγές της πράσινης αναλυτικής χημείας



Σχήμα 4.1 - Στόχοι προκατεργασίας δείγματος (Moldoveanu et all.,2002)

4.2 Κλασικές τεχνικές προκατεργασίας

➤ Κατακρήμιση πρωτεϊνών (PP)

Οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στα βιολογικά υγρά πρέπει να απομακρυνθούν πριν την ανάλυση με HPLC, γιατί καθιζάνουν παρουσία οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση ή δεσμεύονται μη εκλεκτικά και μη αναστρέψιμα από τα τυχόν ελεύθερα υδροξύλια που υπάρχουν στην επιφάνεια του υλικού πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών. Οι συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας για απομάκρυνση πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη μετουσίωσή τους με προσθήκη οργανικού διαλύτη π.χ. CH_3OH ή CH_3CN ή με ελάττωση του pH π.χ. με HClO_4 , CCl_3COOH και φυγοκέντρωση. Οι τεχνικές αυτές παρότι είναι απλές, έχουν το μειονέκτημα ότι κατά την καταβύθιση μπορεί να συμπαρασειρουν και τους αναλύτες ή οι τελευταίοι να εγκλειστούν στο σχηματιζόμενο ίζημα⁵².

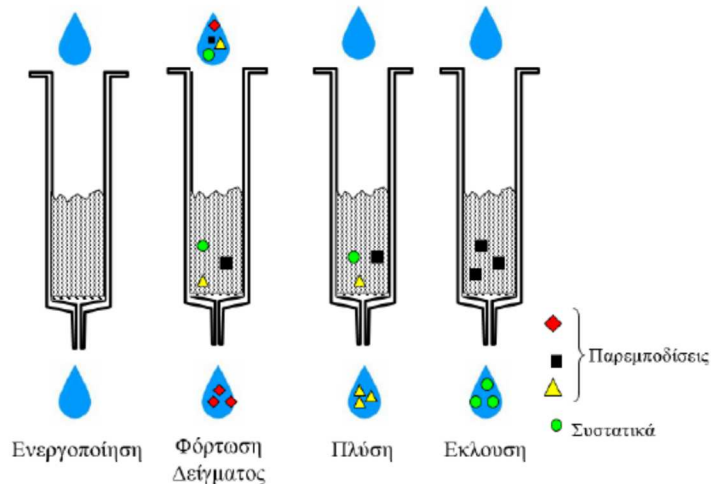
➤ Εκχύλιση Υγρού σε Υγρό (LLE)

Στην εκχύλιση υγρού σε υγρό χρησιμοποιείται διαλύτης που δεν αναμειγνύεται με το διαλύτη του δείγματος. Οι αναλύτες κατανέμονται στον κατάλληλο διαλύτη ανάλογα με τις ιδιότητές τους.

Αφού διαχωριστούν, η οργανική στιβάδα που περιέχει τους αναλύτες απομακρύνεται, εξατμίζεται μέχρι ξηρού, και το ξηρό υπόλειμμα διαλύεται σε κατάλληλο διαλύτη συμβατό με την κινητή φάση. Ένας περιορισμός αυτής της τεχνικής είναι ότι δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν υδατοδιαλυτοί διαλύτες για την εκχύλιση. Άλλα μειονεκτήματα της τεχνικής είναι η χρήση μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, η οποία οδηγεί σε ένα υπολογίσιμο κόστος για την απόκτηση και τη διάθεσή τους, όπως και ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάμιξης και το γεγονός ότι απαιτείται απομάκρυνση του οργανικού διαλύτη με εξάτμιση, η οποία συνεπάγεται αύξηση του χρόνου προκατεργασίας. Επίσης, δε μπορεί να αποφευχθεί η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος που παρεμποδίζουν, λόγω του ότι έχουν παραπλήσιες ιδιότητες, καθώς οι διαλύτες δεν είναι εκλεκτικοί^{51,53}.

➤ Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPE)

Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των αναλυτών ανάμεσα σε δύο φάσεις: τη στερεή φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσεις. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεής φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλυσης των ενώσεων. Η εκχύλιση στερεάς φάσης απαιτεί σχετικά μικρό χρόνο διεξαγωγής και χαμηλή κατανάλωση διαλυτών, ενώ πραγματοποιεί ικανοποιητικό καθαρισμό του δείγματος και προσυγκέντρωση των ενώσεων. Παράλληλα, η SPE προσφέρει αυξημένη ευαισθησία, καλή επαναληψιμότητα και υψηλά ποσοστά ανάκτησης. Τέλος, δύναται να συνδυαστεί on-line με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας, καθώς και να αυτοματοποιηθεί⁵⁴.



Σχήμα 4.2 - Στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) (Locatelli et al.,2017)

4.3 Σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας

➤ Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) αναπτύχθηκε το 1990 από τους Arthur και Pawliszyn και επιτρέπει την επίτευξη ορίων ανίχνευσης της τάξης των 5 – 50 ng/L (ppt) για πτητικά, ημιπτητικά και μη πτητικά συστατικά με καλή γραμμικότητα και ευαισθησία. Είναι μια γρήγορη, ευαίσθητη, εύκολα αυτοματοποιούμενη, οικονομική και χωρίς χρήση διαλυτών (solvent-free), διαχωριστική τεχνική. Παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών διαχωρισμού, καθώς συνδυάζει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού από αέρια, υγρά ή στερεά δείγματα, με άμεση μεταφορά του για ανάλυση σε ένα κλασικό σύστημα αέριας ή υγρής χρωματογραφίας. Πρόκειται για μια διαδικασία δύο σταδίων η οποία περιλαμβάνει ταυτόχρονη εκχύλιση και προσυγκέντρωση των αναλυτών από το υπόστρωμα των δειγμάτων. Στο πρώτο στάδιο, μια ίνα τετηγμένου διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) επικαλυμμένη με μια στατική φάση (coating) από πολυμερές υλικό, εκτίθεται στο φιαλίδιο το οποίο περιέχει το δείγμα ενώ το προσδιοριζόμενο συστατικό κατανέμεται μεταξύ του υποστρώματος και του πολυμερούς υλικού της στατικής φάσης. Σε δεύτερο στάδιο, η ίνα με τα επιθυμητά συστατικά μεταφέρεται στον εισαγωγέα του αναλυτικού οργάνου για εκρόφηση, διαχωρισμό και ποσοτικοποίηση. Συνήθως, δεν απαιτείται ενδιάμεσο στάδιο καθαρισμού, λόγω της μεγάλης εκλεκτικότητας του πολυμερούς υλικού. Τυπικά, η εκχύλιση με την τεχνική SPME θεωρείται ότι έχει ολοκληρωθεί, όταν η

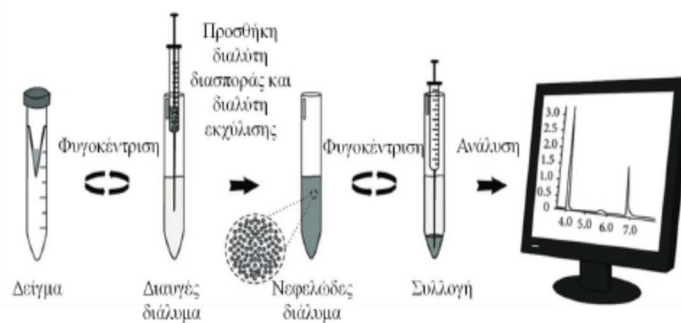
συγκέντρωση του επιθυμητού συστατικού έχει φτάσει σε ισορροπία μεταξύ του υποστρώματος του δείγματος και του πολυμερούς της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι, όταν επέλθει ισορροπία, το ποσό του επιθυμητού συστατικού που εκχυλίζεται είναι σταθερό μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και ανεξάρτητο του επιπλέον χρόνου εκχύλισης^{55,56}.

➤ Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά (DLLME)

Η μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά έγινε γνωστή το 2006 και πραγματοποιείται με τη χρήση ενός διαλύτη εκχύλισης, ο οποίος είναι διασκορπισμένος στο υδατικό διάλυμα δείγματος με τη βοήθεια ενός δεύτερου διαλύτη, γνωστού ως διαλύτη διασποράς. Η υψηλή επιφάνεια επαφής του διαλύτη εκχύλισης με το δείγμα οδηγεί σε γρήγορη και αποτελεσματική εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Έχουν προταθεί διάφορες τροποποιήσεις της τεχνικής, όπως:

- DLLME υποβοηθούμενη από υπερήχους (ultrasound-assisted DLLME)
- DLLME με ιοντικά υγρά (ionic liquid-DLLME)

Η DLLME είναι μια απλή, φθηνή και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική εκχύλισης, καθώς χρησιμοποιεί μειωμένες ποσότητες οργανικών διαλυτών. Ωστόσο, εμφανίζει συχνά περιορισμούς σχετικά με την επιλογή του διαλύτη διασποράς και του διαλύτη εκχύλισης. Επίσης, ο μηχανισμός εκχύλισης δύο σταδίων από το διάλυμα του δείγματος στη φάση εκχύλισης μειώνει σημαντικά την καθαρότητα του δείγματος και καθιστά δύσκολη την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων^{55,57}.



Σχήμα 4.3 - Στάδια μικροεκχύλισης υγρού-υγρού με διασπορά (DLLME) (Rezaee et al., 2006)

➤ Εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους (UAE)

Η εκχύλιση υποβοηθούμενη από υπερήχους παρέχει υψηλή απόδοση εκχύλισης, είναι εύκολο να λειτουργήσει, απαιτεί χαμηλότερους όγκους διαλύτη, μειώνει το κόστος, και παράγει λιγότερα υπολείμματα. Το πέρασμα του υπερηχητικού κύματος παράγει ακουστικές κενώσεις (acoustic cavitations) εντός του διαλύτη και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα μια βελτιωμένη εκχύλιση αναλυτών. Αυτές οι κενώσεις, αυξάνουν την πίεση και τη θερμοκρασία στο σύστημα και η κατάληξη είναι κατάρρευση αυτών των φυσαλίδων και η δημιουργία ενός «shock wave» που διέρχεται διαμέσου του διαλύτη. Συνήθως αυτή η μέθοδος προκατεργασίας συνδυάζεται αρκετά καλά και με λυοφυλιοποίηση (freeze drying), η οποία έχει προηγηθεί και το παραγόμενο «shock wave» επιτρέπει την διείσδυση του διαλύτη εντός του βιολογικού υλικού, αυξάνοντας το εμβαδόν επαφής μεταξύ του στερεού (π.χ λυοφιλιωμένο γάλα) και της υγρής φάσης. Τα μειονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης και η χαμηλή αναπαραγωγικότητα⁵⁸.

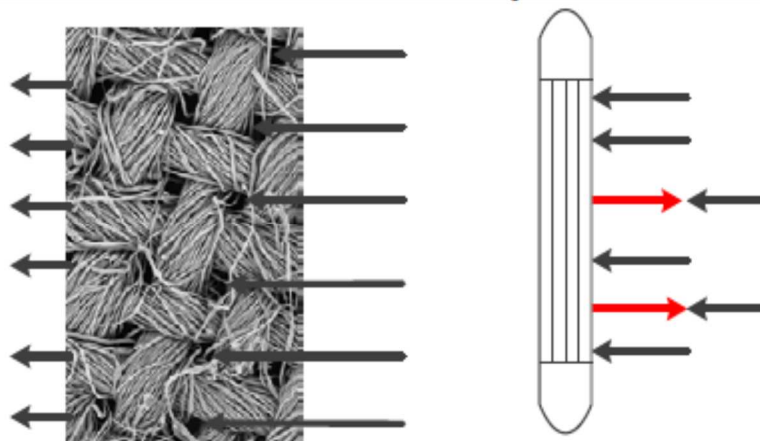
4.4 Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE)

Η εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο είναι μια εξαιρετικά ελπιδοφόρα και ευέλικτη τεχνική προετοιμασίας βιολογικών δειγμάτων που έχει πρόσφατα εισαχθεί από τους Kabir και Furton. Μέχρι τώρα, έχει εφαρμοστεί στην απομόνωση διαφόρων αναλυτών όπως αντιβιοτικά στο γάλα, τα ζιζανιοκτόνα τριαζίνης στα ύδατα, μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα σε δείγματα νερού, επιλεγμένα οιστρογόνα και βενζοδιαζεπίνες στον ορό αίματος κ.ά. Η FPSE χρησιμοποιεί μια εύκαμπτη επιφάνεια υφάσματος (βαμβάκι, πολυεστέρα, ίνες γυαλιού, μείγμα βαμβάκι-πολυεστέρα) ως πλατφόρμα υποστρώματος το οποίο είναι χημικώς επικαλυμμένο με sol-gel υβριδικό οργανικό-ανόργανο προσροφητικό σε μια μορφή λεπτής επίστρωσης.

4.4.1 Ανατομία προσροφητικού μέσου

Η παρασκευή του προσροφητικού μέσου της FPSE αποτελεί μια sol-gel διαδικασία. Στην επιστήμη των υλικών, η διαδικασία sol-gel είναι μια μέθοδος παραγωγής στερεών υλικών από μικρά μόρια. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την κατασκευή μεταλλικών οξειδίων, ειδικά των οξειδίων του πυριτίου (Si) και του τιτανίου (Ti). Η διαδικασία περιλαμβάνει μετατροπή μονομερών σε κolloειδές διάλυμα (sol) που δρα ως πρόδρομος για ένα ολοκληρωμένο δίκτυο (gel) είτε διακριτών σωματιδίων είτε πολυμερών δικτύου. Τυπικοί πρόδρομοι είναι τα αλκοξείδια μετάλλων. Η διαπερατότητα του υποστρώματος μικροεκχύλισης παίζει καθοριστικό ρόλο στον ρυθμό μεταφοράς μάζας από το πλέγμα του βιολογικού δείγματος στο προσροφητικό μέσο. Ένα εύλογο μοντέλο που εξηγεί τα γεγονότα που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας

εκχύλισης τόσο για το μη διαπερατό όσο και για το διαπερατό υπόστρωμα παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Σχήμα 4.4 – Σύγκριση της συμπεριφοράς ροής υγρού δια μέσω μη διαπερατού (αριστερά) και διαπερατού (δεξιά) υποστρώματος μικροεκχύλισης. (Abuzar Kabir et all.,2017)

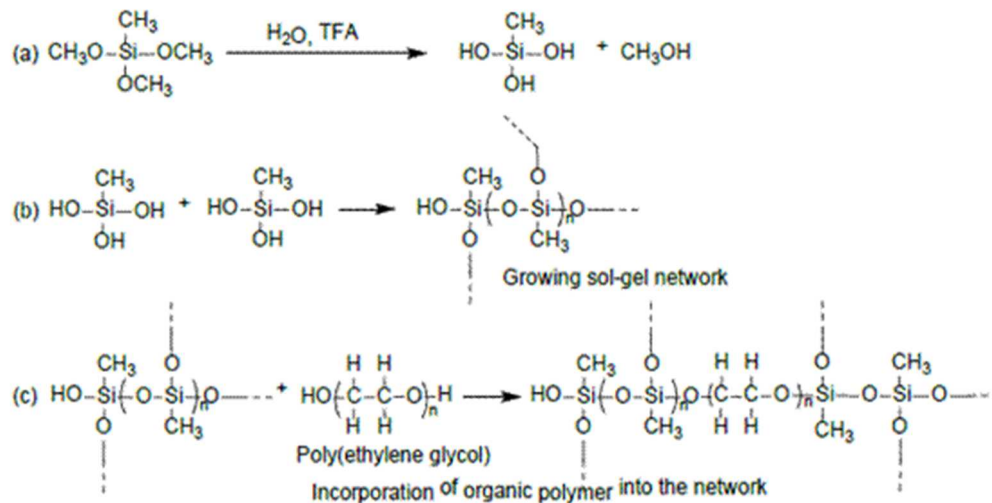
Όταν ένα μη διαπερατό υπόστρωμα χρησιμοποιείται, όπως ίνες συντηγμένης πυριτίας, η ροή του υγρού διαλύματος αναπηδά προς τα πίσω και συγκρούεται με την εισερχόμενη ροή, ανακατευθύνοντας μέρος της εισερχόμενης ροής μακριά από την επιφάνεια του υποστρώματος. Κατά συνέπεια, μόνο ένα κλάσμα των αναλυτών μπορεί να αλληλεπιδράσει με το προσροφητικό υλικό του υποστρώματος. Αντιθέτως, όταν το υπόστρωμα είναι διαπερατό, το μεγαλύτερο μέρος της εισερχόμενης ροής του δείγματος διεισδύει στην επιφάνεια χωρίς ανακατεύθυνση. Ως αποτέλεσμα, η μεταφορά μάζας μεταξύ του προσροφητικού υλικού και του δείγματος πραγματοποιείται γρήγορα και αποτελεσματικά. Αξίζει να αναφερθεί ότι μεταξύ όλων των σύγχρονων τεχνικών μικροεκχύλισης με προσροφητικό υπόστρωμα, η FPSE είναι η μόνη που χρησιμοποιεί διαπερατό υπόστρωμα για να επιταχύνει την ισορροπία εκχύλισης (extraction equilibrium)

4.4.2 Sol-gel επίστρωση

Η κυτταρίνη αποτελεί το πιο διάσημο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την παρασκευή FPSE μέσων. Όντας ένα υδρόφιλο γραμμικό πολυμερές β-D-γλυκοπυρανόζης που κάθε διμερές του περιέχει τρεις λειτουργικές ομάδες υδροξυλίου στις θέσεις 2, 3 και 6, μπορεί να συμμετέχει στην πολυσυμπύκνωση κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επίστρωσης με το sol-gel υλικό.

Η δημιουργία της επίστρωσης πάνω σε ένα υπόστρωμα (π.χ κυτταρίνη) , περιλαμβάνει τις παρακάτω αντιδράσεις:

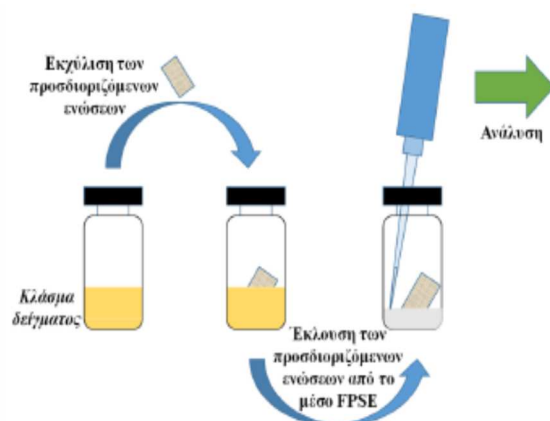
- Υδρόλυση της/των πρόδρομης/ων sol-gel ένωσης/ων
- Πολυσυμπύκνωση των υδρολυμένων προϊόντων και άλλων sol-gel ενεργών ενώσεων, οι οποίες υπάρχουν στο σύστημα
- Τυχαία ενσωμάτωση ενεργού οργανικού πολυμερούς στο αναπτυσσόμενο δίκτυο sol-gel (π.χ PEG)
- Ακινητοποίηση του αναπτυσσόμενου δικτύου sol-gel στην επιφάνεια του υποστρώματος μέσω πολυσυμπύκνωσης



Σχήμα 4.5 - Χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα για την σύνθεση sol-gel PEG επικάλυψης πάνω σε υφασμάτινο μέσο. (Abuzar Kabir et al.,2017)

4.5 Αρχή της FPSE

Κατά την προκατεργασία με FPSE, το προσροφητικό μέσο εισάγεται απευθείας στο δοχείο που περιέχει το αρχικό δείγμα και πραγματοποιείται εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Εν συνεχεία, το μέσο βυθίζεται σε ένα άλλο δοχείο που περιέχει τον κατάλληλο διαλύτη, προκειμένου να γίνει η έκλυση των ενώσεων. Τέλος, το έκλουσμα εισάγεται στο όργανο για ανάλυση.

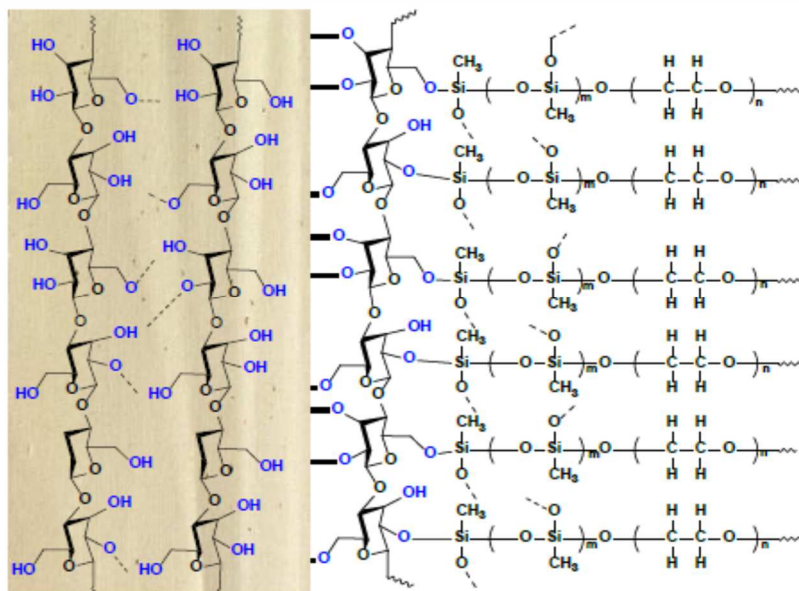


Σχήμα 4.6 - Σχηματική αναπαράσταση της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (Abuzar Kabir et al.,2017)

4.6 Χαρακτηριστικά της FPSE

Η τεχνική της FPSE έχει ενσωματώσει τις τεχνικές SPME και SPE σε μια ενιαία πλατφόρμα τεχνολογίας, συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματά τους. Αφενός, το προσροφητικό μέσο παραμένει βυθισμένο στο δείγμα ή στο υδατικό διάλυμα, το οποίο περιέχει την προσδιοριζόμενη ένωση, γεγονός που θυμίζει πολύ την τεχνική SPME. Αφετέρου, η διαπερατότητα του υποστρώματος και το πορώδες δίκτυο του sol-gel προσροφητικού οδηγούν σε ένα σύστημα ροής παρόμοιο με αυτό της τεχνικής SPE. Σε αντίθεση με τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην SPE και στην SPME, αυτά που χρησιμοποιούνται στην FPSE δεν είναι αδρανή, καθώς είναι είτε υδρόφιλα (κυτταρίνη), είτε υδρόφοβα (πολυεστέρας) ή συνδυασμός αυτών και συμβάλλουν στην εκλεκτικότητα και στη συνολική πολικότητα του μέσου FPSE. Ο ισχυρός χημικός δεσμός μεταξύ του υποστρώματος και του προσροφητικού προσδίδουν στο υλικό υψηλή χημική και θερμική σταθερότητα. Η υψηλών προδιαγραφών επιφάνειας επαφής και η γεωμετρία του FPSE μέσου σε συνδυασμό με το πορώδες, τύπου σπώγγου sol-gel προσροφητικό υλικό που έχει τη μορφή εξαιρετικά λεπτής επικάλυψης, επιτρέπει την ταχεία αλληλεπίδραση προσροφητικού υλικού – αναλύτη, έτσι ώστε να μπορεί να εκλουστεί η ένωση-στόχος από πολύπλοκες μήτρες βιολογικού δείγματος και σε ένα εύλογο χρονικό διάστημα σε σύγκριση με άλλες συμβατικές τεχνικές⁶⁰. Κατά συνέπεια, το υλικό FPSE μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί πολλές φορές, χωρίς να

παρατηρηθεί απώλεια στην προσροφητική του ικανότητα, καθώς και να εκτεθεί σε οποιοδήποτε οργανικό διαλύτη έκλυσης⁶¹.



Σχήμα 4.7 - Σχηματική αναπαράσταση ολοκληρωμένου FPSE μέσου με υφασμάτινο υπόστρωμα κυτταρίνης και sol-gel υλικό επίστρωσης PEG (Abuzar Kabir et al.,2017)

5 Κεφάλαιο 5. Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο και υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (FPSE-HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό Parabens σε μητρικό γάλα

5.1 Εισαγωγή

Εδώ και πολλά χρόνια είναι γνωστό πως η χρήση των parabens ως συντηρητικά είναι ευρεία στην βιομηχανία των φαρμάκων καλλυντικών και τροφίμων. Για τον λόγο αυτό και επειδή τα τελευταία χρόνια μελέτες άρχισαν να εγείρουν προβληματισμούς ως προς την ασφάλεια στη μακροχρόνια χρήση τους, η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στην αξιολόγηση αυτών των ουσιών και την επίδραση τους στην ανθρώπινη υγεία. Οι προβληματισμοί επιβεβαιώθηκαν καθώς από δημοσιευμένες μελέτες προέκυψε πως ορισμένα parabens διαθέτουν πιθανή οιστρογονική δράση και σε συνδυασμό με την παρουσία τους σε όγκους ανθρώπινου μαστού, η χρήση των ενώσεων αυτών είναι πλέον αμφιλεγόμενη. Άρα από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό πως υπάρχει επιτακτική ανάγκη ανάπτυξης βιοαναλυτικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των parabens σε βιολογικά υλικά ώστε να εκτιμάται ο βαθμός έκθεσης του ανθρώπινου οργανισμού στις ενώσεις αυτές και να αξιολογείται η ενδεχόμενη τοξικότητα.

Στο πλαίσιο εκπόνησης της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε μια βιβλιογραφική ανασκόπηση μέσω της οποίας μελετήθηκαν επιστημονικές εργασίες που αναφέρονται στον προσδιορισμό των εξεταζόμενων parabens (methyl paraben, ethyl paraben, iso-propyl paraben, propyl paraben, iso-butyl paraben, butyl paraben και benzyl paraben) με διάφορες τεχνικές κατεργασίας σε ανθρώπινο μητρικό γάλα.

Πίνακας 5.1 Μέθοδοι προσδιορισμού parabens σε δείγματα ανθρώπινου μητρικού γάλακτος

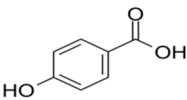
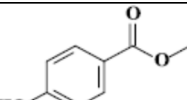
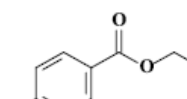
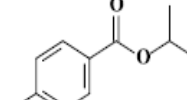
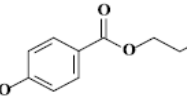
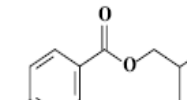
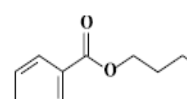
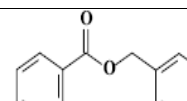
Αναλύτες	Τεχνική Κατεργασίας	Όγκος βιολογικού δείγματος (mL)	Χρωματογραφική Τεχνική	Αναλυτική Στήλη	Χρόνος Ανάλυσης (min)	Συγγραφείς
MPB EPB PPB	-MA/MSPD - DLLME	0.2	LC-UV	SB-C18 Column 250mm x 4,6mm 5µm particle size	15	Fotouhi et al.
MPB EPB PPB	DLLME	1.75	LC-MS/MS	Gemini C18 Column 100mm x 2mm 3µm particle size	8.5	Vela-Soria et al.
MPB EPB PPB	On line in tube SPME	40	HPLC-UV	ODS-3 Column 250mm x 4,6mm 5µm particle size	12	Asiabi et al.
MPB EPB PPB BPB	PPT	0.2	HPLC-MS	Luna C18 Column 50 x 2 mm 5µm particle size	3.7	Schlumpf et al.
MPB EPB PPB BPB BzPB	SPE	1.0	GC-MS	DB- MS Capillary Column 30m x 0,25mm	24.5	Azzouz et al.
MPB EPB iPPB PPB iBPB BPB BzPB	UAE	9.9	UHPLC-MS/MS	UPLC BEH C18 Column 50mm x 2,1mm 1.7µm particle size	10	Rodríguez-Gómez et al.

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 μητρικό γάλα. Η αναπτυχθείσα μέθοδος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες βιοπαρακολούθησης ώστε να αξιολογείται ο βαθμός έκθεσης τόσο των γυναικών που έρχονται σε επαφή με πηγές parabens , όσο και των νεογνών τα οποία γίνονται δέκτες των ενώσεων αυτών σε ένα ποσοστό.

5.2 Αρχή μεθόδου

Η αναλυτική μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των επτά parabens (MePB, EtPB, i-PrPB, PrPB, i-BuPB, BuPB, BzPB) σε ανθρώπινο μητρικό γάλα περιλαμβάνει σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτή ορατού - υπεριώδους (UV). Για να καταστεί το δείγμα κατάλληλο προς εισαγωγή στην αναλυτική διάταξη, υφίσταται κατεργασία μέσω της τεχνικής της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE). Η χρωματογραφική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση ήταν η Spherisorb ODS-1 C-18 σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Παρακάτω στον πίνακα 5.2 παρουσιάζονται οι χημικές δομές και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των επτά ενώσεων που αναλύθηκαν με την παρούσα μέθοδο καθώς και ο κυριότερος μεταβολίτης τους, το π-υδροξυβενζοϊκό οξύ.

Πίνακας 5.2 Ιδιότητες του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος και των εστέρων του και η επιτρεπόμενη ημερήσια πρόσληψη για τον άνθρωπο

Όνομασία	Χημική δομή	Εμφάνιση	Μοριακό βάρος (g/mole)	Διαλυτότητα στο νερό στους 25°C (g/100mL)	log _{k_{ow}}	pK _a	ADI (mg/kg)
p-hydroxy benzoic acid		Λευκή κοκκώδης σκόνη	138,12	1,45	1,39	4,54	<10
Methyl paraben		Λευκή κρυσταλλική σκόνη	152,14	2,00	1,66	8,47	0-10
Ethyl paraben		Λευκή κρυσταλλική σκόνη	166,17	0,86	2,19	8,50	0-10
Isopropyl paraben		Λευκό στερεό	180,2			8,40	
Propyl paraben		Λευκή κρυσταλλική σκόνη	180,2	0,30	2,71	8,47	0-10
Isobutyl paraben		Λευκό στερεό	194,23				
Butyl paraben		Λευκή κρυσταλλική σκόνη	194,23	0,15	3,24	8,47	Αναμένεται απόφαση
Benzyl paraben		Λευκοκίτρινη λεπτή σκόνη	228,24	0,05	3,56	8,20	

5.3 Εξοπλισμός-Οργανολογία

5.3.1 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 έκλουσης 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 mm x 2,0 mm και διάμετρο σωματιδίων 3 μm 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 mM 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 24 λεπτά.

Η κινητή φάση, απαερώθηκε σε συσκευή απαέρωσης Millipore της εταιρίας Waters με διήθηση υπό κενό με φίλτρα νάilon, 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.

5.3.2 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

Για την ανάπτυξη και αξιολόγηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- ✓ Ακετονιτρίλιο (CH₃CN, ACN), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,8%
- ✓ Μεθανόλη (CH₃OH, MeOH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας 99,8%
- ✓ Νερό (H₂O), δισαπεσταγμένο και περαιτέρω καθαρισμένο με συσκευή MilliQ plus, HPLC βαθμού καθαρότητας.
- ✓ Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας
- ✓ Μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH₄, AMF) αναλυτικού βαθμού καθαρότητας

5.3.3 Συσκευές-Υλικά-Αναλώσιμα

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- ✓ Αναλυτικός ζυγός ακριβείας $\pm 0,0001$ g
- ✓ Συσκευή Buchner για διήθηση υπό κενό διαλυμάτων κινητής φάσης
- ✓ Λουτρό υπερήχων
- ✓ Συσκευή vortex
- ✓ Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- ✓ Πιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου 20-200 μ L
- ✓ Μικροπιπέτα ρυθμιζόμενου όγκου
- ✓ Φιαλίδια Eppendorf
- ✓ Φιάλη αζώτου
- ✓ Διάταξη ανακίνησης φιαλιδίων
- ✓ Υδρόφοβα φίλτρα διαμέτρου 0.22 μ m
- ✓ Γυάλινα φιαλίδια
- ✓ Προσροφητικό μέσο FPSE με υπόστρωμα κυτταρίνης CW-20M.

5.4 Διαλύματα παρακαταθήκης και διαλύματα εργασίας

5.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Ζυγίζονται με ακρίβεια 5 mg από κάθε αναλύτη, διαλύονται σε μεθανόλη (MeOH) και συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι χαραγής σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL. Ακολούθως, παρασκευάζονται δύο ειδών μεικτά διαλύματα παρακαταθήκης, MIX A και MIX B με συγκεντρώσεις 50 μ g/mL και 2,5 μ g/mL αντίστοιχα. Η παρασκευή του MIX A προήλθε από μεταφορά ακριβώς 1mL από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και ο όγκος αραιώνεται μέχρι χαραγής με νερό (πίνακας 5.3). Η παρασκευή του MIX B πραγματοποιήθηκε με μεταφορά ακριβώς 0,5 mL του MIX A σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL και ο όγκος αραιώνεται μέχρι χαραγής με νερό (πίνακας 5.4). Όλα τα διαλύματα φυλάσσονται σε σκουρόχρωμους περιέκτες, στο ψυγείο σε θερμοκρασία 4 °C, και διατηρούνται μέχρι το πέρας των πειραμάτων.

Πίνακας 5.3 Παρασκευή μεικτού διαλύματος παρακαταθήκης Α.

MIX A	Αρχικό Διάλυμα ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Όγκος (mL)	Διαλύτης	Τελικός όγκος (mL)	Τελική συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
MePB	500	1	Νερό (H ₂ O)	10	50
EtPB	500	1			
i-PrPB	500	1			
PrPB	500	1			
i-BuPB	500	1			
BuPB	500	1			
BzPB	500	1			

Πίνακας 5.4 Παρασκευή μεικτού διαλύματος παρακαταθήκης Β

MIX B	Αρχικό Διάλυμα ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Όγκος (mL)	Διαλύτης	Τελικός όγκος (mL)	Τελική συγκέντρωση ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
MIX A	50	0,5	Νερό (H ₂ O)	10	2,5

5.4.2 Μεικτά διαλύματα εργασίας

Λαμβάνοντας κατάλληλους όγκους από τα διαλύματα παρακαταθήκης και αραιώνοντας με νερό σε ογκομετρικές φιάλες των 10 mL, όπως φαίνεται στον πίνακα 5.5, παρασκευάζονται μεικτά πρότυπα διαλύματα εργασίας που περιέχουν και τους επτά αναλύτες σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5.5 - Αραιώσεις για την παρασκευή μεικτών διαλυμάτων εργασίας parabens					
	Αρχικό Διάλυμα (μg/mL)	Όγκος (μL)	Διαλύτης	Τελικός όγκος (mL)	Τελική συγκέντρωση (ng/mL)
MIXB	2.5	200	Νερό	10	50
MIXB	2.5	400	Νερό	10	100
MIXB	2.5	600	Νερό	10	150
MIXB	2.5	1000	Νερό	10	250
MIXA	50	100	Νερό	10	500
MIXA	50	200	Νερό	10	1000
MIXA	50	500	Νερό	10	2500

5.5 Προετοιμασία εμβολιασμένων δειγμάτων μητρικού γάλακτος

5.5.1 Εμβολιασμένα δείγματα για την ανάπτυξη της μεθόδου

Τα διαλύματα εργασίας που περιέχουν μείγματα των αναλυτών παρασκευάστηκαν σε τέτοιο εύρος συγκεντρώσεων, που να αντανακλούν τη συγκέντρωση που παρατηρείται στο βιολογικό υλικό μετά από ανθρώπινη χρήση. Για την ανάπτυξη της μεθόδου 50 μL ανθρώπινου μητρικού γάλακτος εμβολιάζονται αυθημερόν με 20 μL πρότυπου διαλύματος εργασίας διαφορετικών συγκεντρώσεων. Για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου εμβολιάστηκαν δείγματα σε περιοχή συγκεντρώσεων 20 – 500 ng/mL σύμφωνα με τον πίνακα 5.6.

Πίνακας 5.6 - Εύρος εργασίας εμβολιασμένων δειγμάτων μητρικού γάλακτος			
Συγκέντρωση διαλύματος εργασίας (ng/mL)	Όγκος (μL)	Όγκος μητρικού γάλακτος (μL)	Συγκέντρωση στο μητρικό γάλα (ng/mL)
50	20	50	20
100	20	50	40
150	20	50	60
250	20	50	100
500	20	50	200
1000	20	50	400
2500	10	50	500

5.6 Ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου

Η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου αποτελεί το σημαντικότερο κομμάτι μιας αναλυτικής μελέτης. Εξετάζονται διάφορες χρωματογραφικές συνθήκες και επιλέγονται προσεκτικά οι καλύτερες, ώστε να επιφέρουν το βέλτιστο και αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των αναλυτών.

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε αρχικά μια εξέταση της χρωματογραφικής συμπεριφοράς καθαρών αναλυτών και στη συνέχεια έγινε έλεγχος της συμπεριφοράς των αναλυτών παρουσία βιολογικού υλικού και άλλων παραγόντων. Αρχικά, πριν από οποιαδήποτε εργασία, μελετήθηκαν οι φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2, όπως η λιποφιλία και ο ιοντισμός τους.

5.6.1 Επιλογή μήκους κύματος ανίχνευσης

Τα φάσματα απορρόφησης UV των προσδιοριζόμενων ενώσεων (MPB, EPB, iPPB, PPB, iBPB, BPB, BzPB) μελετήθηκαν και επιλέχθηκε το βέλτιστο μήκος κύματος για τον ποσοτικό προσδιορισμό της κάθε ένωσης, που ήταν τα 257 nm, με τη χρήση ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (HPLC-PDA).

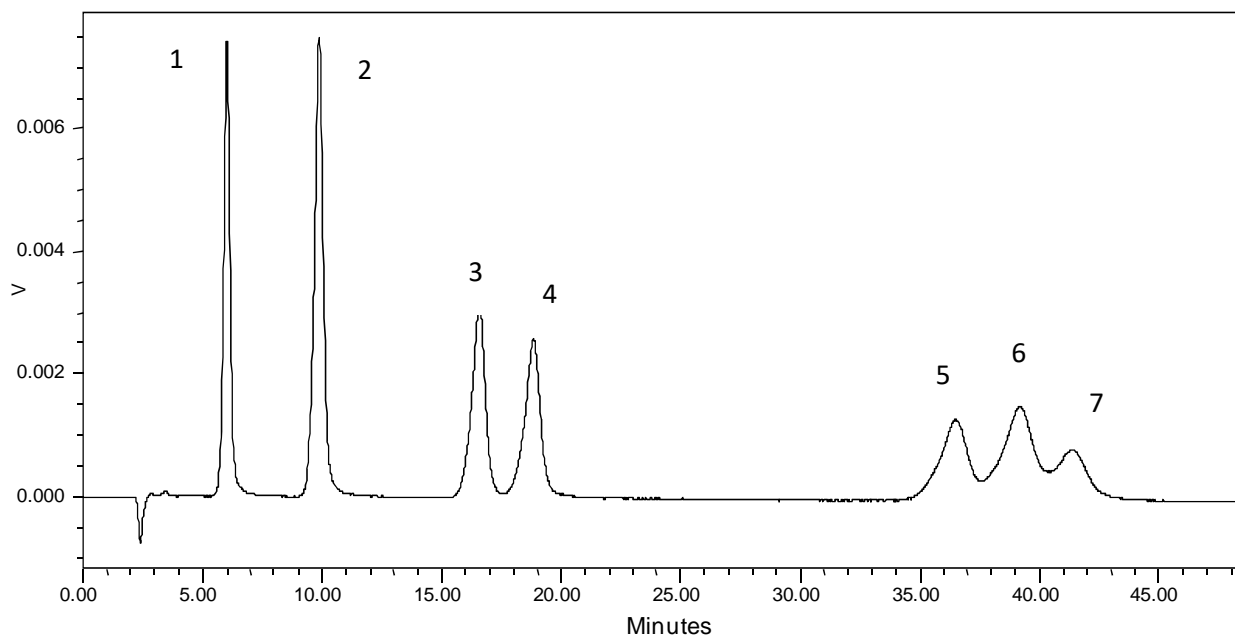
5.6.2 Επιλογή στατικής φάσης

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά την υλοποίηση της παρούσας αναλυτικής εργασίας, έγιναν αρχικά πειράματα μελέτης πάνω σε πρότυπες ουσίες, χωρίς την παρουσία βιολογικού υλικού.

Σκοπός αυτής της μελέτης, ήταν να αποκτηθεί μια εικόνα για τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών, και να γίνει επιλογή της χρωματογραφικής στήλης που θα χρησιμοποιηθεί παρουσία βιολογικού υλικού. Η επιλογή της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης αποτελεί το πρώτο βήμα για την ανάπτυξη μεθόδου.

❖ X TERRA MS C-18

Αρχικά εξετάστηκε η αναλυτική στήλη XTERRA MS C-18 με διαστάσεις 3,0 x 150 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm. Η υψηλού βαθμού επικάλυψη των ελεύθερων ομάδων σιλανόλης, η συμβολή της στην βελτίωση του σχήματος των χρωματογραφικών κορυφών αλλά και η ανθεκτικότητα του πληρωτικού υλικού σε ευρεία περιοχή τιμών pH (1-12) είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά αυτής της στατικής φάσης. Επιπλέον, οι στήλες XTerra MS C-18 είναι γενικής χρήσης, αποτελούνται από σωματίδια υβριδικής τεχνολογίας και είναι σχεδιασμένες να είναι συμβατές με εφαρμογές φασματομετρίας μαζών.

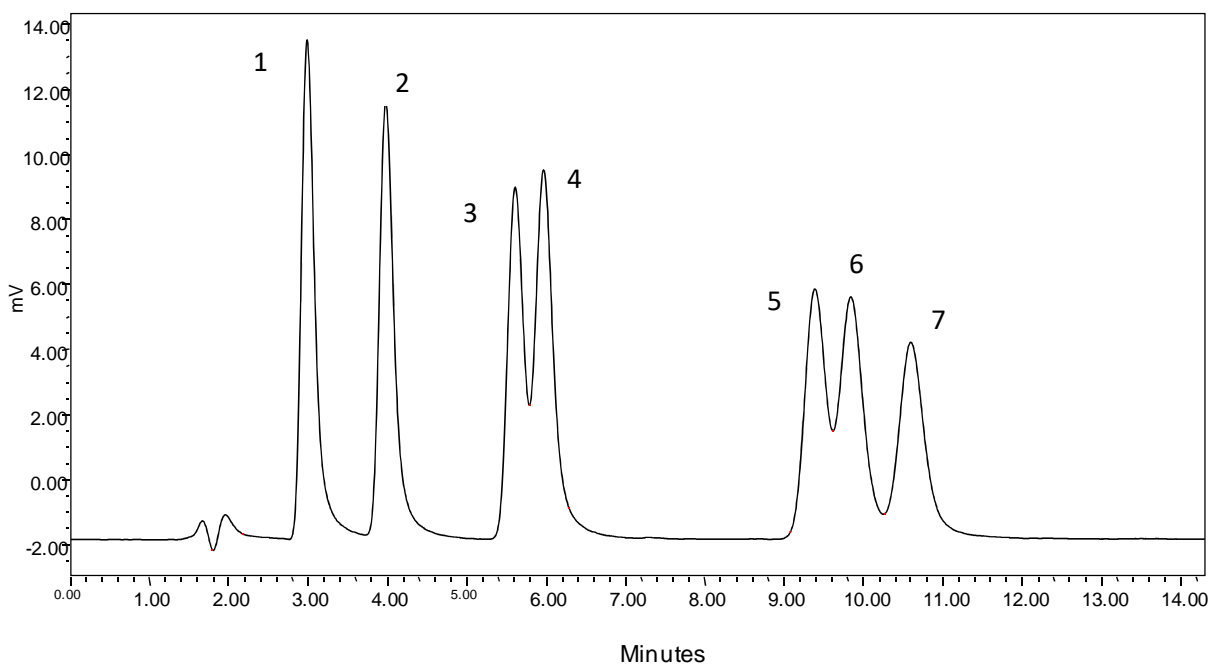


Σχήμα 5.1 - Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού διαλύματος μείγματος parabens συγκέντρωσης 10 μg/mL, με στήλη X TERRA MS C-18, ρυθμός ροής 0,4 mL/min και κινητή φάση μεθανόλη/ 27 mM υδατικό διάλυμα μωρμηκικού αμμωνίου σε 43/57 v/v 1:MPB 2: EPB 3: iPPB 4: PPB 5: iBPB 6: BPB 7: BzPB

❖ HYPERSIL GOLD C-18

Επιχειρήθηκε επίσης χρωματογραφικός διαχωρισμός των μελετούμενων parabens στην αναλυτική στήλη Hypersil Gold C-18 με διαστάσεις 2,1x150 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm.

Οι στήλες αυτής της τεχνολογίας βασίζονται σε υλικά πλήρωσης που έχουν ως βάση την πηκτή πυριτίας υψηλής καθαρότητας, μέρος της οποίας δεσμεύεται χημικά με αλκυλικές αλυσίδες. Αυτό το πληρωτικό υλικό έχει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως βελτίωση της συμμετρίας των χρωματογραφικών κορυφών, εξαιρετική διαχωριστική ικανότητα, απόδοση, ευαισθησία και ακρίβεια στην ποιότητα των αναλυτικών δεδομένων.

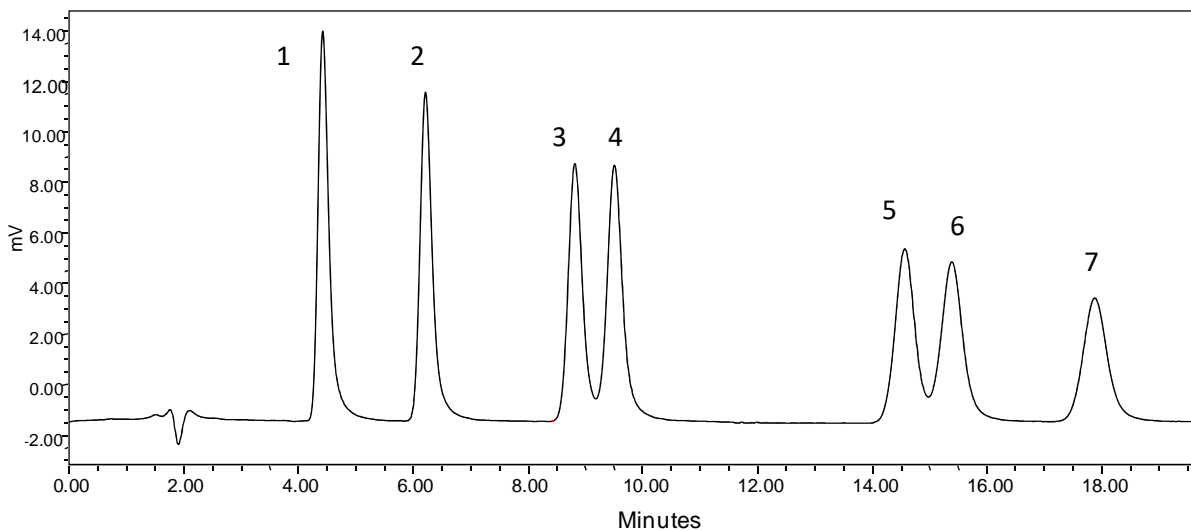


Σχήμα 5.2 - Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού διαλύματος μείγματος parabens συγκέντρωσης 500 ng/mL, με στήλη HYPERSIL GOLD C-18, με ρυθμός ροής 0,25 mL/min και κινητή φάση ακετονιτρίλιο/ 15 mM υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου 36/64 v/v 1:MPB 2: EPB 3: iPPB 4: PPB 5: iBPB 6: BPB 7: BzPB

❖ **SPHERISORB-ODS1 C-18**

Επιχειρήθηκε χρωματογραφικός διαχωρισμός των μελετούμενων parabens στην αναλυτική στήλη Spherisorb ODS-1 C-18 με διαστάσεις 4,6x150 mm και μέγεθος σωματιδίων 3 μm. Το υλικό πλήρωσης αποτελείται από πηκτή πυριτίας χημικά συνδεδεμένη με δεκαοκτυλο- ομάδες [(CH₂)₁₇-CH₃]. Τέτοιου τύπου στήλες χρησιμοποιούνται κυρίως σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης και έχουν ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών χάρη στον αυξημένο αριθμό θεωρητικών πλακών που διαθέτουν, στη γρήγορη εξισορρόπηση και στο χαμηλό κόστος τους. Οι αναλυτικές στήλες ODS -1 παρουσιάζουν πυκνότητα 6,2% σε άνθρακα, που αποτελεί την ποσότητα σε οργανικό

μέρος που είναι προσκολλημένο στην επιφάνεια της πηκτής πυριτίας. Ένας κύριος λόγος που επιλέχθηκε η στήλη αυτή είναι το μέγεθος πορωδών σωματιδίων εντός της στήλης. Η SPHERISORB-ODS1 C-18 διαθέτει σωματίδια μεγέθους 3 μm, μέγεθος μικρότερο από τα σωματίδια των παραπάνω στηλών που περιεγράφηκαν. Το γεγονός αυτό προσδίδει ένα πλεονέκτημα, καθώς το μειωμένο μέγεθος σωματιδίων προκαλεί αύξηση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης και συμβάλει στην υψηλή διαχωριστική ικανότητα των υπο ανάλυση ουσιών.



Σχήμα 5.3 - Χρωματογράφημα πρότυπου υδατικού διαλύματος μείγματος parabens συγκέντρωσης 500 ng/mL, με στήλη SPHERISORB-ODS1 C-18, ρυθμός ροής 0,25 mL/min και κινητή φάση ακετονιτρίλιο/ 15mM μυρμηκικό αμμώνιο 36/64 v/v. 1:MPB 2: EPB 3: iPPB 4: PPB 5: iBPB 6: BPB 7: BzPB

5.6.3 Επιλογή κινητής φάσης

Η κινητή φάση της μεθόδου αποτελείται από δυαδικό σύστημα διαλυτών, ενός οργανικού διαλύτη (ακετονιτρίλιο ή μεθανόλη) και ενός υδατικού μέρους που περιλαμβάνει συνήθως κάποιο άλας όπως μυρμηκικό αμμώνιο και μικρή ποσότητα μυρμηκικού οξέος. Επόμενο στάδιο είναι ο καθορισμός της βέλτιστης σύστασης της κινητής φάσης.

Συνεχίζοντας την εργασία στην HPLC-UV σε πρότυπα διαλύματα εργασίας, χωρίς βιολογικό υλικό, εξετάζονται τροποποιήσεις στην κινητή φάση. Με σκοπό να διερευνηθεί η συμπεριφορά των αναλυτών στην αναλυτική στήλη Spherisorb®-ODS1 πραγματοποιήθηκαν πειραματικές μελέτες της επίδρασης της σύνθεσης της κινητής φάσης στη συγκράτηση των αναλυτών. Κατά

τη διάρκεια των πειραμάτων μεταβαλλόταν ένας παράγοντας ενώ οι υπόλοιποι παρέμεναν σταθεροί με σκοπό να προσδιοριστούν οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες, ο κύκλος των πειραμάτων επαναλήφθηκε δύο φορές και παρακάτω αναφέρονται τα τελικά αποτελέσματα. Όλες οι μελέτες αυτή έγινε σε εμβολιασμένα δείγματα μητρικού γάλακτος.

5.6.3.1. Οργανικός τροποποιητής

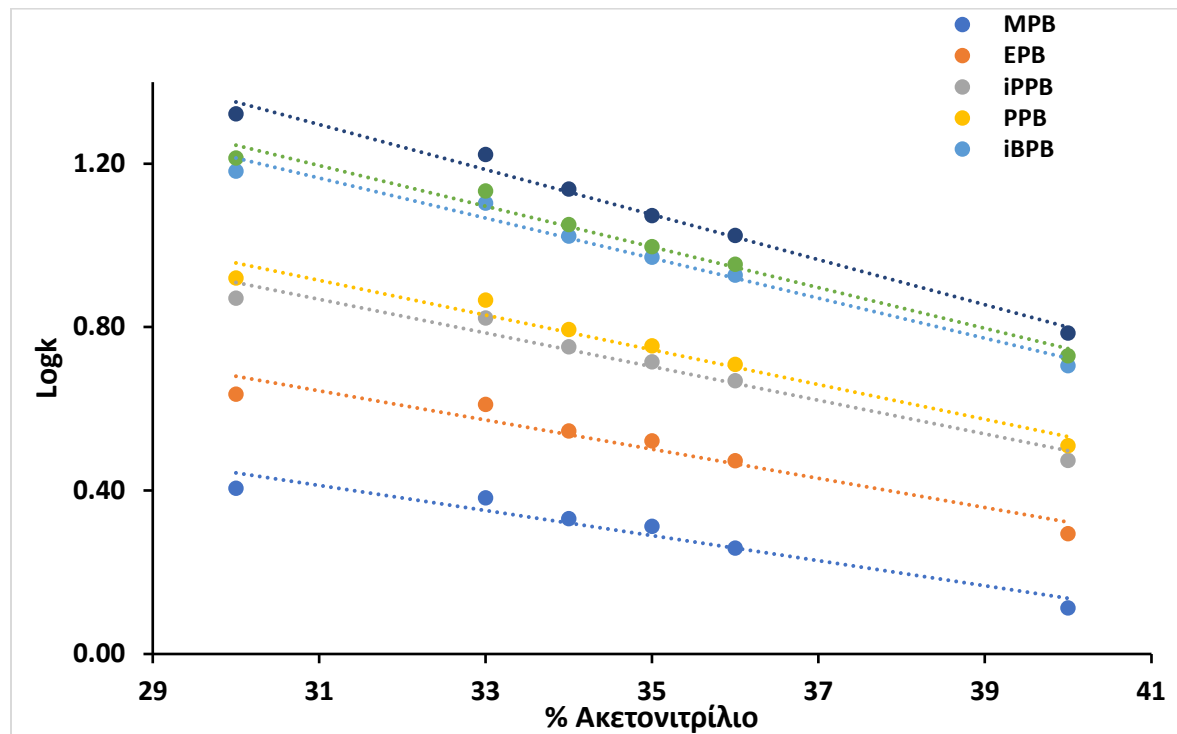
Αρχικά δοκιμάστηκε η μεθανόλη (MeOH) ως οργανικός τροποποιητής της κινητής φάσης σε διάφορες αναλογίες και στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από το ακετονιτρίλιο (ACN). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να επιτευχθεί γρηγορότερη έκλυση των αναλυτών αλλά και των υπόλοιπων συστατικών του βιολογικού δείγματος, όταν αυτό εμβολιάστηκε σε επόμενα πειράματα, με σκοπό τη μείωση του χρόνου ανάλυσης. Η MeOH οδηγεί σε σημαντική αύξηση του χρόνου ανάλυσης, λόγω της μειωμένης εκλουστικής ισχύς της σε σχέση με το ACN.

Σε γενικές γραμμές, το ACN πλεονεκτεί έναντι της MeOH στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσης στα παρακάτω σημεία:

- έχει χαμηλότερη απορροφητικότητα στο υπεριώδες φάσμα που οδηγεί σε χαμηλότερο θόρυβο υποβάθρου
- δημιουργεί χαμηλότερη πίεση κατά το χειρισμό των αναλυτικών οργάνων, λόγω του χαμηλότερου ιξώδους σε σχέση με τη μεθανόλη
- έχει αυξημένη εκλουστική ισχύ, που μειώνει κατά πολύ το χρόνο ανάλυσης

Ως οργανικός διαλύτης για τις μελέτες επιλέχθηκε το ακετονιτρίλιο. Παρατηρήθηκε ότι το ακετονιτρίλιο, σε σύγκριση με τη μεθανόλη, μειώνει τη συγκράτηση των αναλυτών και επιτρέπει τον επαρκή διαχωρισμό τους χωρίς παρεμπόδιση από το υλικό μήτρας. Η επίδραση του ποσοστού ακετονιτρίλιου στην κινητή φάση, ϕ_{ACN} , αξιολογήθηκε σε πειράματα όπου το ϕ_{ACN} κυμαινόταν από 30 έως 40 %, ενώ η συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου διατηρήθηκε σταθερή στα 31,5 mM σε ολόκληρη την κινητή φάση και το ποσοστό του μυρμηκικού οξέος ήταν σταθερό στο 0,1% v/v. Όπως παρατηρείται στο σχήμα 5.4, η αύξηση του ποσοστού ακετονιτρίλιου προκαλεί σε γραμμική μείωση του συντελεστή κατακράτησης (τιμές $\log k$) των αναλυτών, όπως αναμενόταν με βάση το μηχανισμό κατακράτησης της χρωματογραφίας

αντίστροφης φάσης. Κατά συνέπεια, ως η βέλτιστη περιεκτικότητα ακετονιτριλίου στην κινητή φάση επιλέχθηκε το ποσοστό 34 %, καθώς επιτρέπει επαρκή διαχωρισμό όλων των αναλυτών μέσα σε λιγότερο από 22 λεπτά.

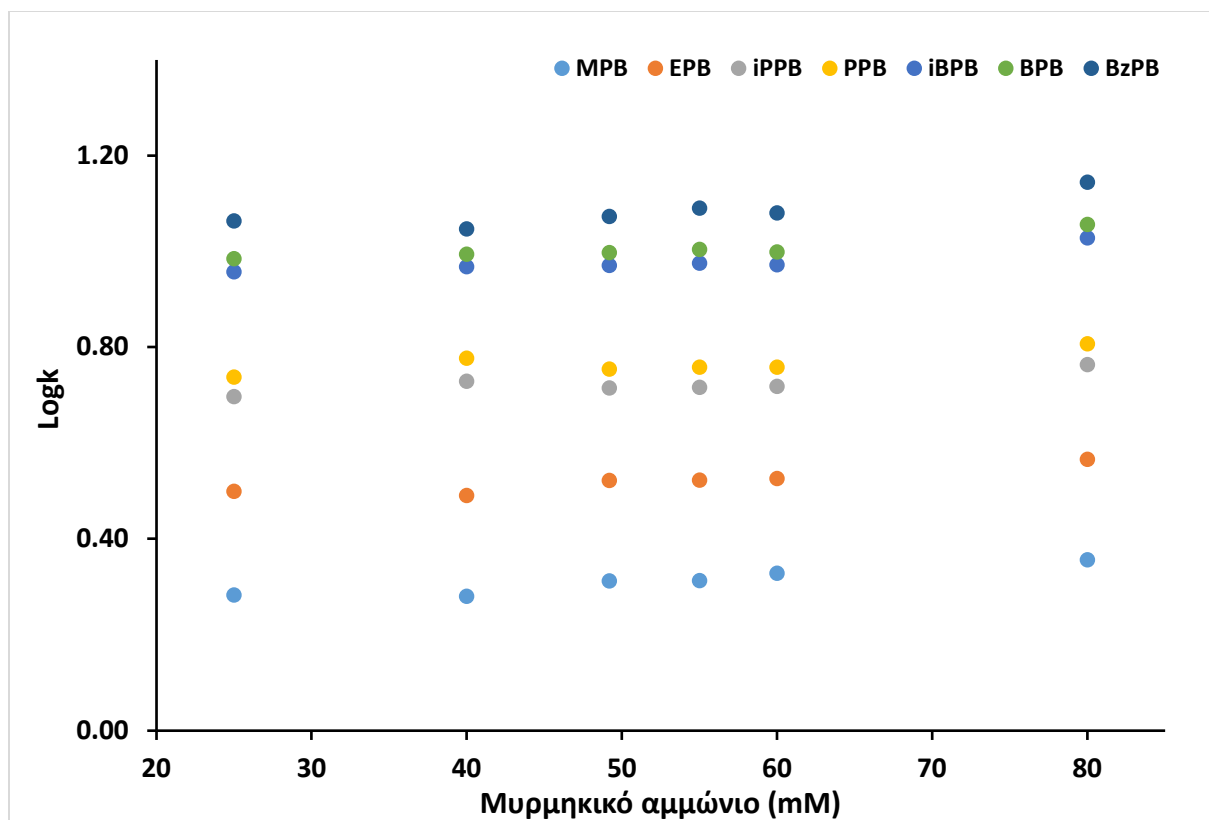


Σχήμα 5.4 Γραφική παράσταση $\log k'$ - ποσοστό ακετονιτριλίου στην κινητή φάση.

5.6.3.2 Συγκέντρωση άλατος μυρμηκικού αμμωνίου

Κατά την ανάπτυξη της χρωματογραφικής μεθόδου, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης τόσο στο λαμβανόμενο σήμα από τους αναλύτες, όσο και σε άλλους χρωματογραφικούς παράγοντες.

Με σταθερή περιεκτικότητα σε ακετονιτρίλιο της κινητής φάσης στα 34% και περιεκτικότητα σε μυρμηκικό οξύ στο 0,1%, η συγκέντρωση του μυρμηκικού αμμωνίου μεταβλήθηκε από 25 σε 80 mM. Το σχήμα 5.5 δείχνει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου αυξάνει ελαφρώς τους συντελεστές κατακράτησης (τιμές $\log k$) όλων των parabens χωρίς να επηρεάζει το διαχωρισμό των ισομερών.



Σχήμα 5.5 Γραφική παράσταση $\log k'$ – συγκέντρωσης μυρμηκικού αμμωνίου στην κινητή φάση.

Σε όλες τις δοκιμασμένες κινητές φάσεις, τα επιλεγμένα parabens εκκλούνται κατά σειρά αυξημένης λιποφιλίας. Έτσι, MPB που είναι λιγότερο λιπόφιλο ($\text{LogP } 1.46$) είναι εκλούεται πρώτο ακολουθούμενο από EPB ($\text{LogP } 1.83$), iPPB ($\text{LogP } 2.12$), PPB ($\text{LogP } 2.29$), iBPB ($\text{LogP } 2.69$), BPB ($\text{LogP } 2.71$) και BzPB ($\text{LogP } 3.20$). Διαπιστώθηκε επίσης ότι η πίεση της στήλης μειώθηκε και ο διαχωρισμός των αναλύτη από παρεμβολές στη μήτρα βελτιώθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του μυρμηκικού αμμωνίου της κινητής φάσης. Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε μια κινητή φάση που αποτελείται από 66% 49 mM υδατικό διάλυμα μυρμηκικού αμμωνίου σε ακετονιτρίλιο με 0,1% v/v μυρμηκικό οξύ για το διαχωρισμό των αναλυτών. Η εξισορρόπηση στήλης επιτυγχάνεται εντός 1 ώρας και η προτεινόμενη ισοκρατική μέθοδος LC επιτρέπει επαρκή διαχωρισμό χωρίς την ανάγκη εξισορρόπησης της σύστασης της κινητής φάσης στη στήλη πριν από κάθε ένεση

5.7 Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα των μελετών βελτιστοποίησης τόσο του υγροχρωματογραφικού συστήματος, καταλήξαμε στις ακόλουθες βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος HPLC-UV για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών:

Τα πειράματα εκτελέστηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, με χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης 22 λεπτά, ο βρόχος εισαγωγής δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 10 μL .

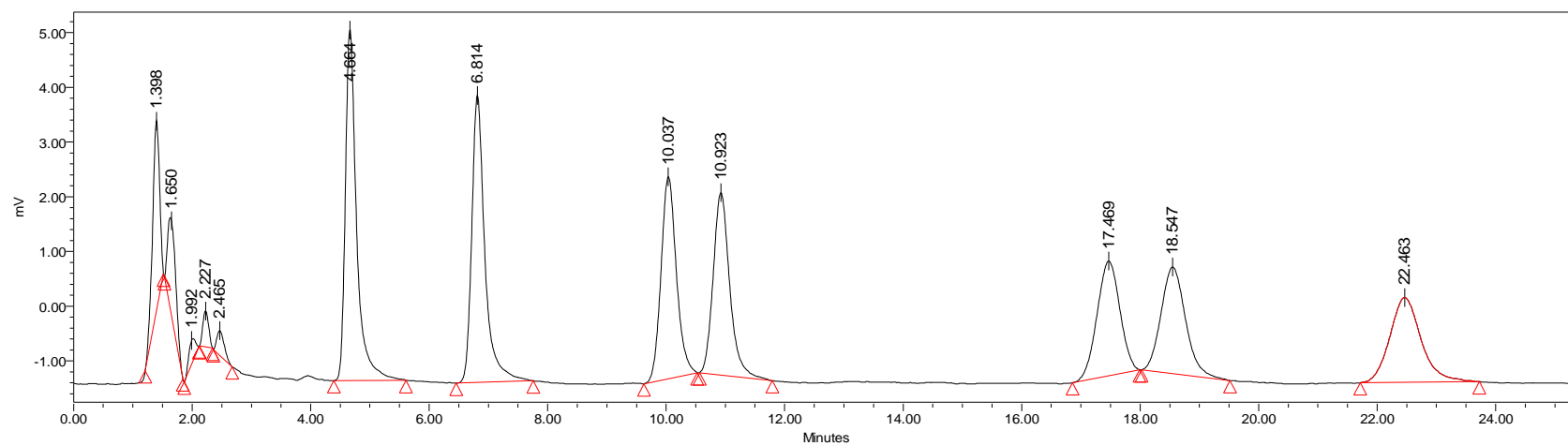
Στατική Φάση: Αναλυτική στήλη Spherisorb®ODS1 C18 analytical column (150.0 x 2.0 mm i.d., 3 μm).

Κινητή Φάση: Υδατικό διάλυμα 49 mM μυρμηκικού αμμωνίου σε ακετονιτρίλιο σε αναλογία 64:36, v/v, που περιέχει 0,1% μυρμηκικό οξύ.

Ταχύτητα ροής: 0,25 ml min⁻¹

Ανιχνευτής UV: 257 nm.

Στο σχήμα 5.6 παρουσιάζεται αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα που προήλθε από την ανάλυση μεικτού πρότυπου διαλύματος των αναλυτών σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹ από τους αναλύτες και 200 ng mL⁻¹ για τον κυριότερο μεταβολίτη τους, π-υδροξυ βενζοϊκό οξύ. Το χρωματογράφημα ελήφθη υπό τις βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας του συστήματος HPLC-UV.



Σχήμα 5.6 Τυπικό χρωματογράφημα μίγματος αναλυτών το οποίο αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS1 C-18, Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτρίλιου και 49 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

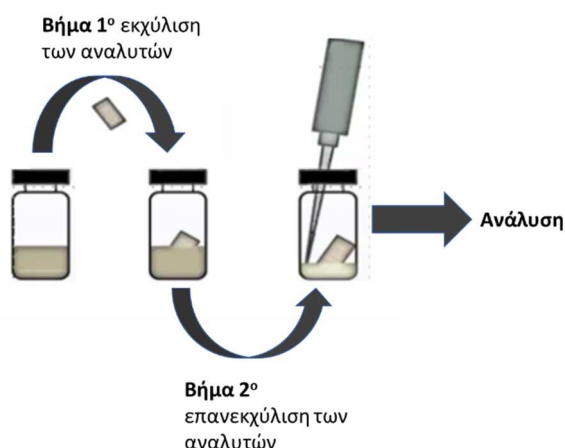
5.8 Προετοιμασία βιολογικού υλικού

Στην παρούσα εργασία, η κατεργασία δειγμάτων μητρικού γάλακτος πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο (FPSE). Η τεχνική αυτή επιλέχθηκε μεταξύ άλλων συμβατικών (π.χ SPE, LLE) κυρίως λόγω της εξοικονόμησης οργανικών διαλυτών, χρόνου αλλά και αποτελεσματικής ανάκτησης των αναλυτών από το βιολογικό υλικό. Από τη βιβλιογραφία μελετήθηκαν πρωτόκολλα FPSE σε διάφορα βιολογικά δείγματα και με τροποποίηση αυτών δημιουργήθηκε το κατάλληλο ώστε να είναι δυνατή η ταυτόχρονη εκχύλιση και των επτά parabens που μελετώνται από δείγματα μητρικού γάλακτος.

Το FPSE μέσο που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από υπόστρωμα κυτταρίνης με επίστρωση PEG (sol-gel Carbowax® 20M) και κόπηκε σε τετράγωνο σχήμα εμβαδού 2.25 cm².

5.8.1 Εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο

Τα στάδια της εκχύλισης προσρόφησης σε υφασμάτινο παρουσιάζονται στο σχήμα 5.7



Σχήμα 5.7 Εκχύλιση προσρόφησης σε υφασμάτινο μέσο

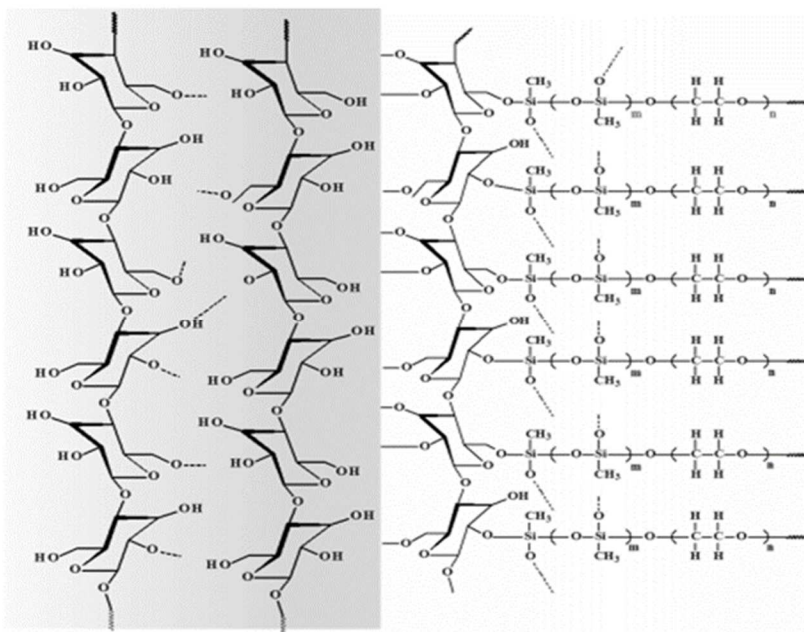
5.8.1.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλου τεχνικής προκατεργασίας FPSE

Για τη βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας του δείγματος για την εκχύλιση των parabens, εξετάστηκαν και αξιολογήθηκαν διάφοροι πειραματικοί παράγοντες. Ο κάθε παράγοντας μελετήθηκε διατηρώντας τους υπόλοιπους σταθερούς. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν τόσο στο στάδιο της εκχύλισης (Bήμα 1), όσο και στο στάδιο της επανεκχύλισης (Bήμα 2) ήταν: το είδος και ο όγκος του διαλύτη καθώς και ο χρόνος της ανάδευσης, επιπλέον μελετήθηκε η επίδραση της συμπύκνωσης του διαλύτη επανεκχύλισης στο αναλυτικό σήμα. Η

βελτιστοποίηση διεξήχθη με τη χρήση δειγμάτων μητρικού γάλακτος που εμβολιάστηκαν με πρότυπο διάλυμα των ενώσεων.

5.8.1.2 Βελτιστοποίηση του σταδίου της εκχύλισης (Βήμα 1)

Ο τύπος και ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης είναι κρίσιμες παράμετροι σε οποιαδήποτε διαδικασία FPSE και βελτιστοποιούνται ώστε να παρέχουν τη μέγιστη % ανάκτηση για κάθε αναλύτη. Στο στάδιο αυτό ακολουθήσαμε το πρωτόκολλο που είχε επικυρωθεί για άλλο βιολογικό υλικό και διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά και για τα δείγματα μητρικού γάλακτος. Τα επτά paraben που μελετώνται βρίσκονται σε ουδέτερη κατάσταση υπό όξινη συνθήκες, δεδομένου ότι οι τιμές pK_a είναι περίπου 8,9. Επομένως για να αυξηθεί η αλληλεπίδραση των αναλυτών με το ουδέτερο απορροφητικό εκχύλισης της μεμβράνης Carbowax® 20M (σχήμα 5.8), ο διαλύτης εκχύλισης θα πρέπει να προστεθεί με μικρή ποσότητα μυρμηκικού οξέος στο διάλυμα εκχύλισης.

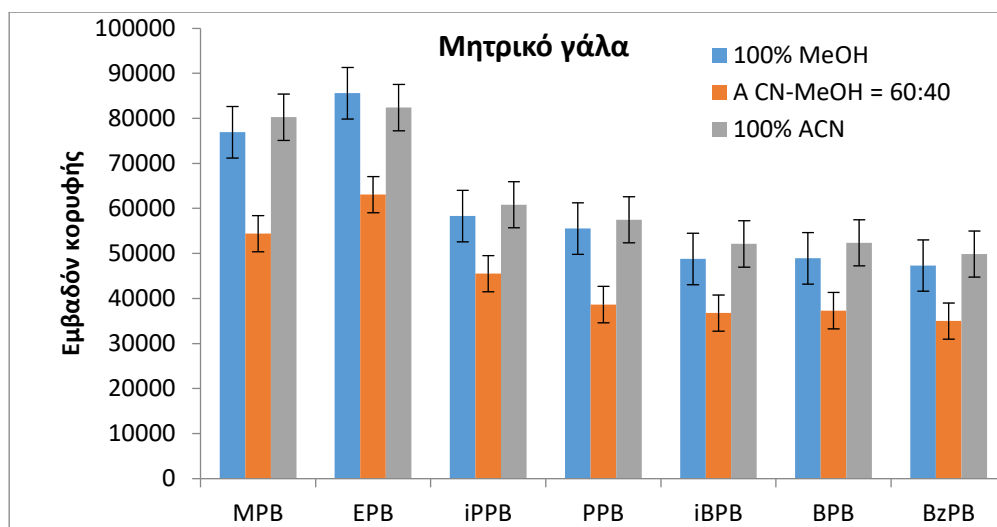


Σχήμα 5.8- Μembrάνη FPSE Carbowax® 20M

Οι βέλτιστες συνθήκες για το στάδιο αυτό ήταν: σε ακριβώς 50 μL μητρικού γάλακτος, προστίθενται 550 μL απεσταγμένου νερού και 200 μL of 0.1 % υδατικού διαλύματος μυρμηκικού οξέος. Ο βέλτιστος χρόνος ανάδευσης ήταν 20 λεπτά.

5.8.1.2 Βελτιστοποίηση του σταδίου της επανεκχύλισης (Βήμα 2)

Η επιλογή κατάλληλου διαλύτη επανεκχύλισης (back-extraction) είναι ένας από τους κρισιμότερους παράγοντες και συμβάλλει στην αποτελεσματική απομάκρυνση των αναλυτών από την επιφάνεια του προσροφητικού μέσου. Μελετήθηκε η εκλουστική ισχύς τόσο μεμονωμένων όσο και συστήματος διαλυτών και σύμφωνα με το παρακάτω διάγραμμα, τα διαλύματα 100% μεθανόλη και 100 % ακετονιτρίλιο απέδωσαν καλύτερη ανάκτηση των αναλυτών από το μητρικό γάλα.



Σχήμα 5.9- Επίδραση του διαλύτη επανεκχύλισης (Βήμα 2^ο) στο εμβαδόν κορυφής των αναλυτών

Επειδή και τα δύο μεμονωμένα οργανικά διαλύματα συνεισφέρουν παρόμοια σε αυξημένο αναλυτικό σήμα, επιλέχθηκε για την ανάπτυξη της μεθόδου η χρήση ακριβώς 800 μ L μεθανόλης.

5.8.2 Συμπύκνωση και ανασύσταση

Η συμπύκνωση του μεθανολικού εκλούσματος υπό θέρμανση με ρεύμα αερίου αζώτου (N_2) και η επιλογή κατάλληλου διαλύματος ανασύστασης του ξηρού υπολείμματος έδειξε ενθαρρυντικά. Ως βέλτιστος διαλύτης ανασύστασης επιλέχθηκε μίγμα ακετονιτρίλιου-2,5 mM μυρμηκικού αμμωνίου.

5.8.3 Βέλτιστες συνθήκες FPSE

Προετοιμασία του μέσου: Ενεργοποίηση του προσροφητικού μέσου FPSE με εμβάπτιση 2 mL διαλύματος CH₃OH:ACN (50:50 v/v) για 5 λεπτά και έκπλυση με 2 mL απιοντισμένου νερού για 5 λεπτά.

Βήμα 1ο: Εκχύλιση των αναλυτών

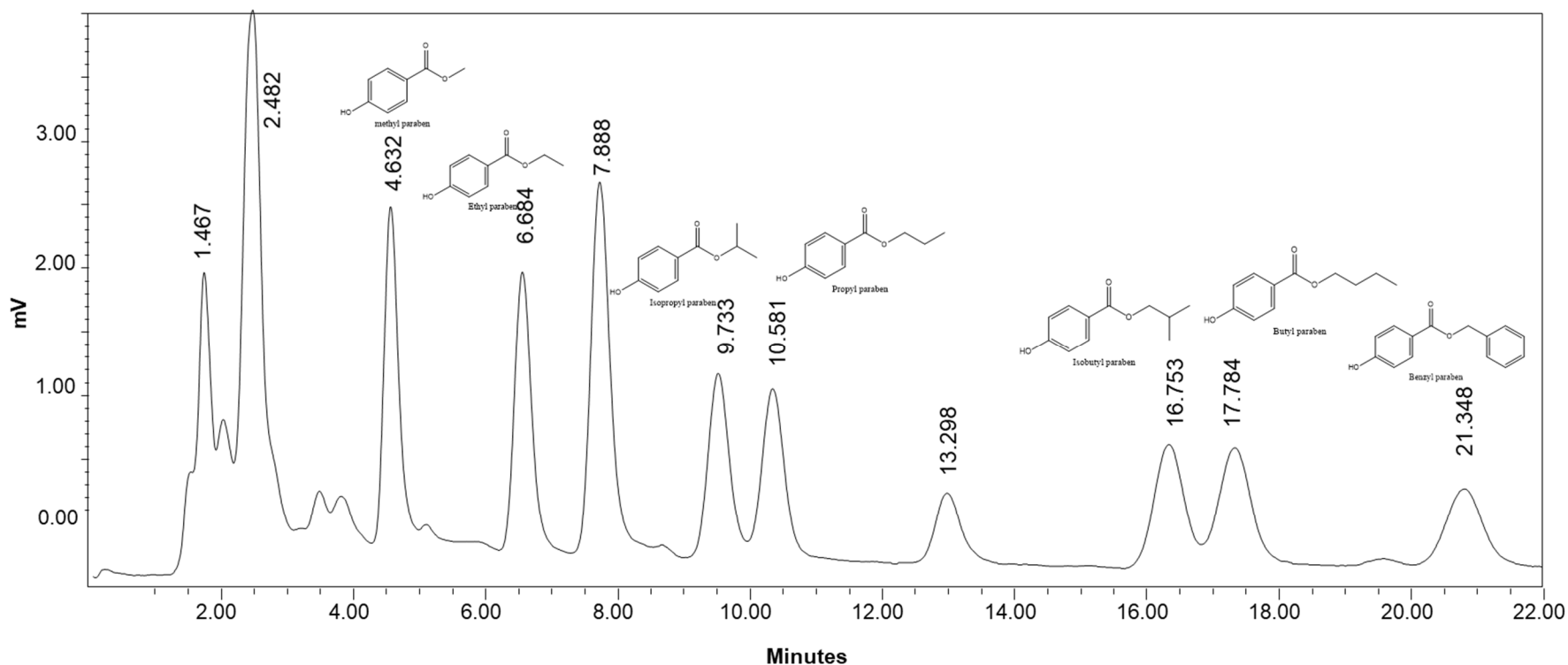
Προσθήκη 50 μ L μητρικού γάλακτος, 20 μ L υδατικού πρότυπου διαλύματος των ενώσεων, 200 μ L μυρμηκικού οξέος 0,1% (HCOOH) και 530 μ L απιοντισμένου νερού σε γυάλινο φιαλίδιο και ήπια ανακίνηση για 20 λεπτά

Βήμα 2ο: Επανεκχύλιση των αναλυτών

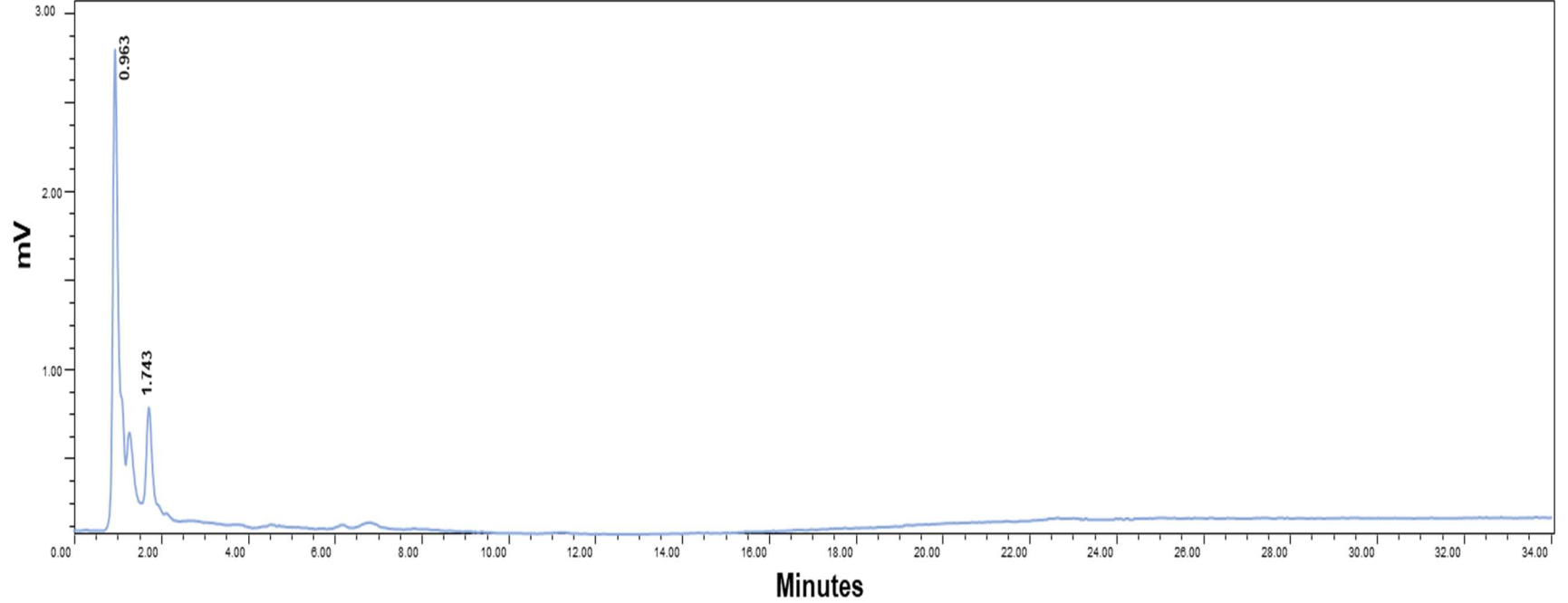
Προσθήκη 800 μ L διαλύτη έκλουσης (MeOH) σε γυάλινο φιαλίδιο και ήπια ανακίνηση για 20 λεπτά.

Μετά το πέρας της κατεργασίας του δείγματος, ακολουθεί συμπύκνωση του μεθανολικού εκλούσματος σε ροή αζώτου και ήπια θέρμανση και ανασύσταση του ξηρού υπολείμματος με 150 μ L διαλύματος ACN/AMF 2,5 mM 40/60 v/v, καλή ανακίνηση, διήθηση με hydrophobic PTFE 0,22 μ m φίλτρο σύριγγας και ένεση στο αναλυτικό σύστημα.

Στο Σχήμα 5.9 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος μητρικού γάλακτος εμβολιασμένο με τους αναλύτες σε συγκέντρωση 200 ng mL⁻¹ και τον κύριο μεταβολίτη των parabens, π-υδροξυ βενζοϊκό οξύ. Το δείγμα αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Με τις παραπάνω συνθήκες ο χρόνος έκλουσης για το methyl paraben είναι 4,63 λεπτά, για το ethyl paraben είναι 6,68 λεπτά, για το isopropyl paraben είναι 9,73 λεπτά, για το propyl paraben 10,58 λεπτά, για το isobutyl paraben είναι 16,75 λεπτά, για το butyl paraben 17,78 λεπτά και για το benzyl paraben είναι 21,35 λεπτά. Στο σχήμα 5.10 παρουσιάζεται τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος μητρικού γάλακτος το οποίο αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες και για χρόνο 30 λεπτά.



Σχήμα 5.10 Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση δείγματος μητρικού γάλακτος εμβολιασμένο με τους αναλύτες σε συγκέντρωση 200 ng mL^{-1} και τον κύριο μεταβολίτη των parabens , π-υδροξυ βενζοϊκό οξύ. Το δείγμα αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες. Αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS1 C-18, Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτρίλιου και 49 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 5.11 Τυπικό χρωματογράφημα που προκύπτει από την ανάλυση λευκού δείγματος μητρικού γάλακτος το οποίο αναλύθηκε σύμφωνα με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες και για χρόνο 30 λεπτά. Αναλυτική στήλη: Spherisorb ODS1 C-18, Κινητή φάση: μίγμα ακετονιτρίλιου και 49 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

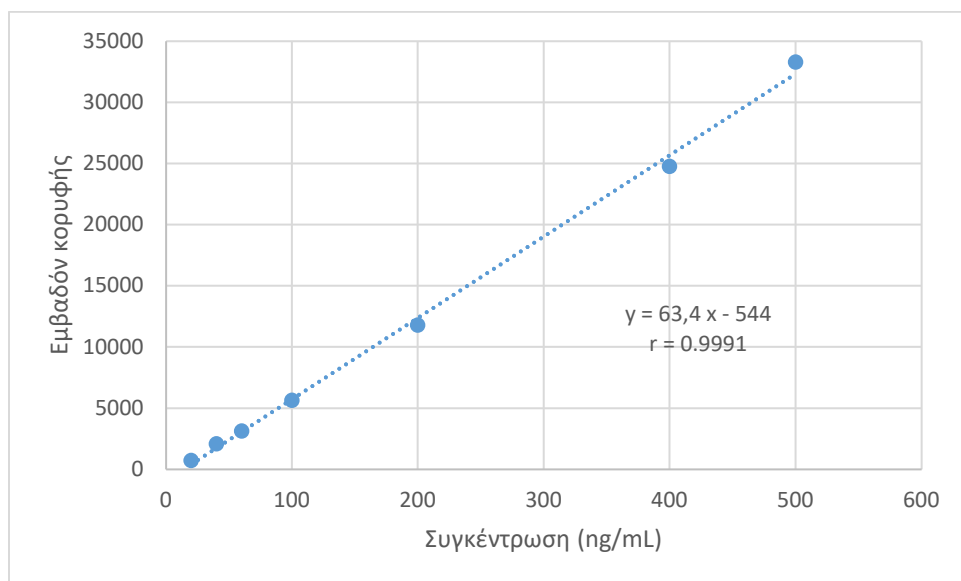
5.9 Καμπύλες βαθμονόμησης - Έλεγχος γραμμικότητας

Μια καμπύλη βαθμονόμησης απεικονίζει τη συσχέτιση της απόκρισης του οργάνου με τη συγκέντρωση του αναλύτη η οποία αξιολογείται σε ένα καθορισμένο εύρος συγκέντρωσης. Η περιοχή εργασίας που χρησιμοποιήθηκε, επιλέχθηκε ύστερα από βιβλιογραφική μελέτη και αξιολόγηση των δυνατοτήτων του αναλυτικού οργάνου μέτρησης. Τα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης προετοιμάζονται εμβολιάζοντας την βιολογική μήτρα με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυόμενων ουσιών. Η γραμμικότητα αναφέρεται στη γραμμική εξάρτηση της μετρούμενης ιδιότητας από τη συγκέντρωση και ελέγχεται με πρότυπα διαλύματα σε τουλάχιστον έξι επίπεδα συγκεντρώσεων ενώ εκφράζεται με το συντελεστή γραμμικής συσχέτισης (correlation coefficient r) ή το συντελεστή προσδιορισμού (coefficient of determination, r^2), οι οποίοι πρέπει να προσεγγίζουν τη μονάδα.

Για την αξιολόγηση της γραμμικότητας της προτεινόμενης μεθόδου χρησιμοποιούνται τα δεδομένα από καμπύλες αναφοράς που κατασκευάζονται με ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων μητρικού γάλακτος που παρασκευάζονται με τον τρόπο που ήδη αναφέρθηκε. Παράλληλα έγινε καμπύλη αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης με τα εμβολιασμένα δείγματα στο μητρικό υλικό. Για κάθε συγκέντρωση υπολογίζεται το εμβαδόν κορυφής του αναλύτη. Τα αποτελέσματα για αναλύτη παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5.9: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του MPB

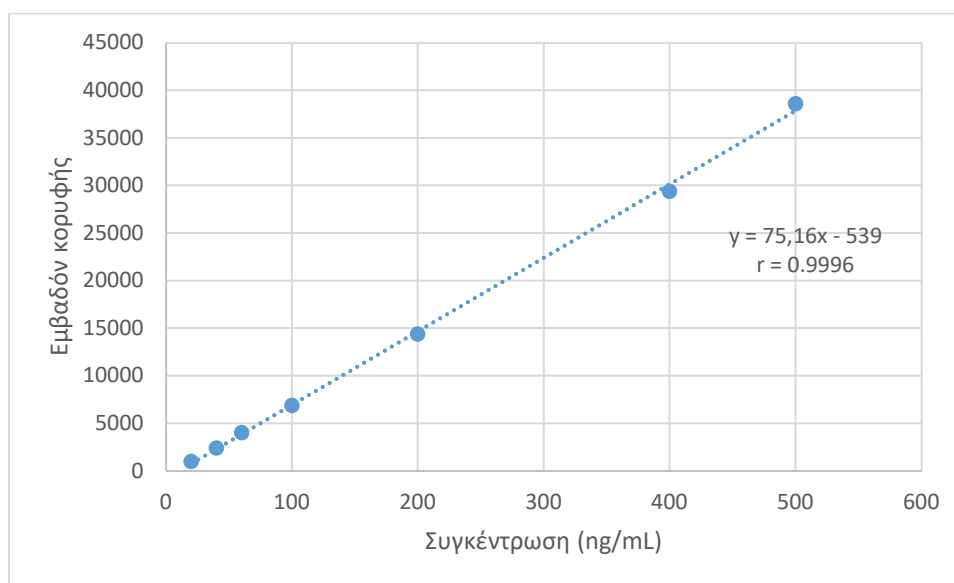
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	721	19,98	-0,1
40	2083	41,48	3,7
60	3121	57,86	-3,6
100	5647	97,73	-2,3
200	11798	194,82	-2,6
400	24759	399,41	-0,1
500	33284	533,97	6,8



Σχήμα 5.12 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του MPB

Πίνακας 5.10: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του EPB

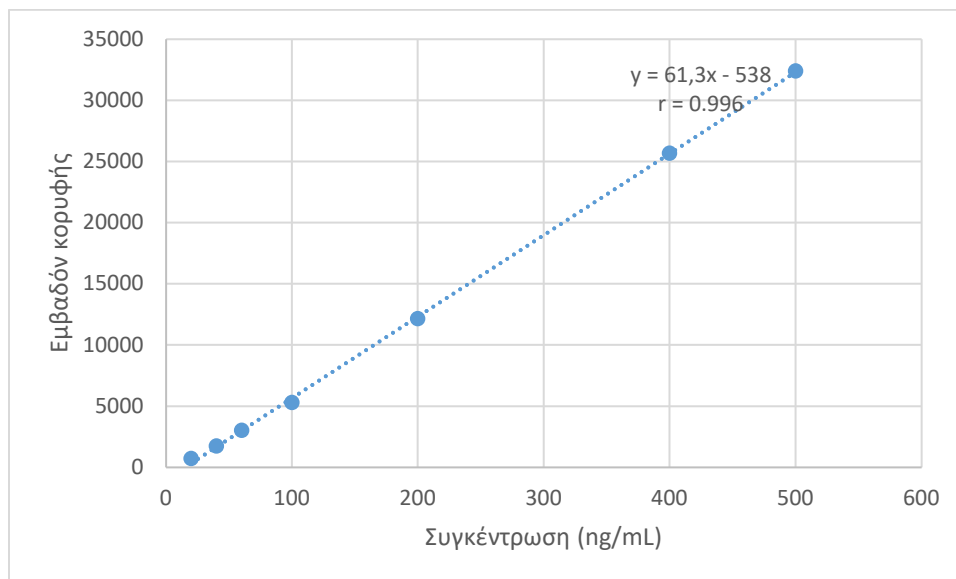
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	976	20,15	0,7
40	2392	38,98	-2,6
60	4005	60,43	0,7
100	6888	98,76	-1,2
200	14372	198,28	-0,9
400	29363	397,63	-0,6
500	38591	520,35	4,1



Σχήμα 5.13 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του EPB

Πίνακας 5.11: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του iPPB

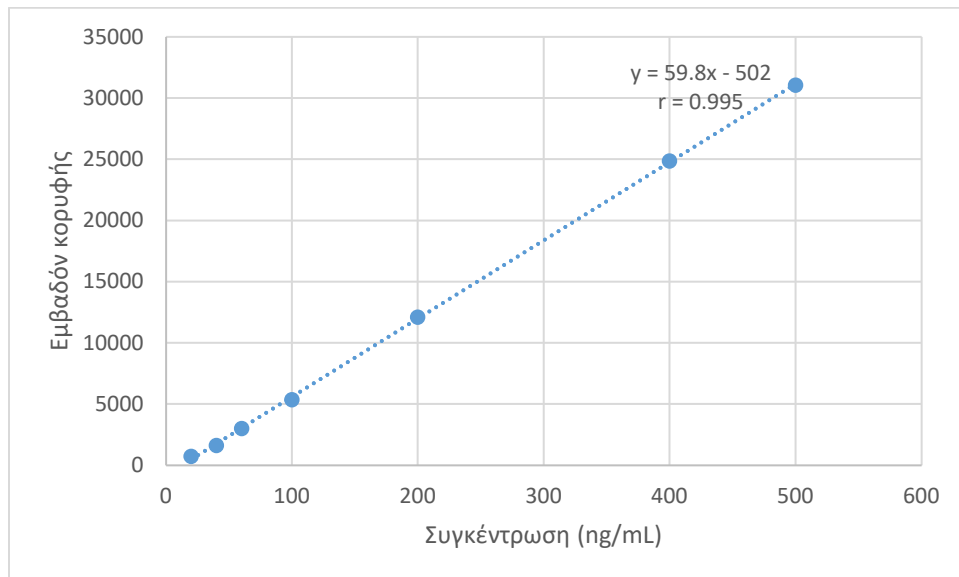
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	728	20,66	3,3
40	1734	37,07	-7,3
60	3025	58,12	-3,1
100	5305	95,30	-4,7
200	12150	206,92	3,5
400	25673	427,45	6,9
500	32400	537,15	7,4



Σχήμα 5.14 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του iPPB

Πίνακας 5.12: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του PPB

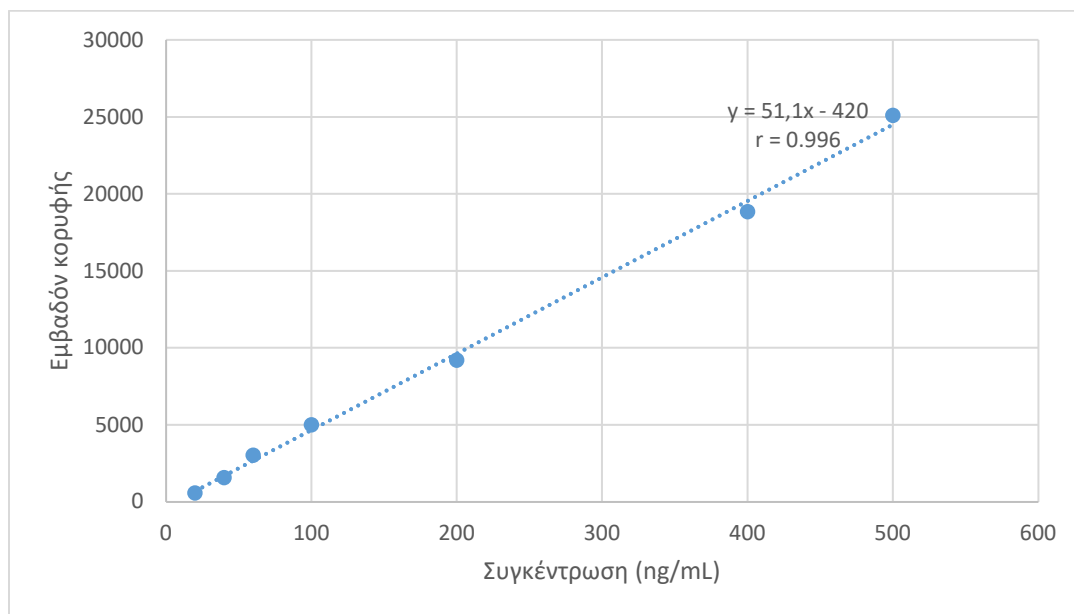
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	749	20,92	4,6
40	1639	35,80	-10,5
60	3017	58,85	-1,9
100	5371	98,21	-1,8
200	12103	210,79	5,4
400	24889	424,60	6,1
500	31087	528,24	5,6



Σχήμα 5.15 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του PPB.

Πίνακας 5.13: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του iBPB

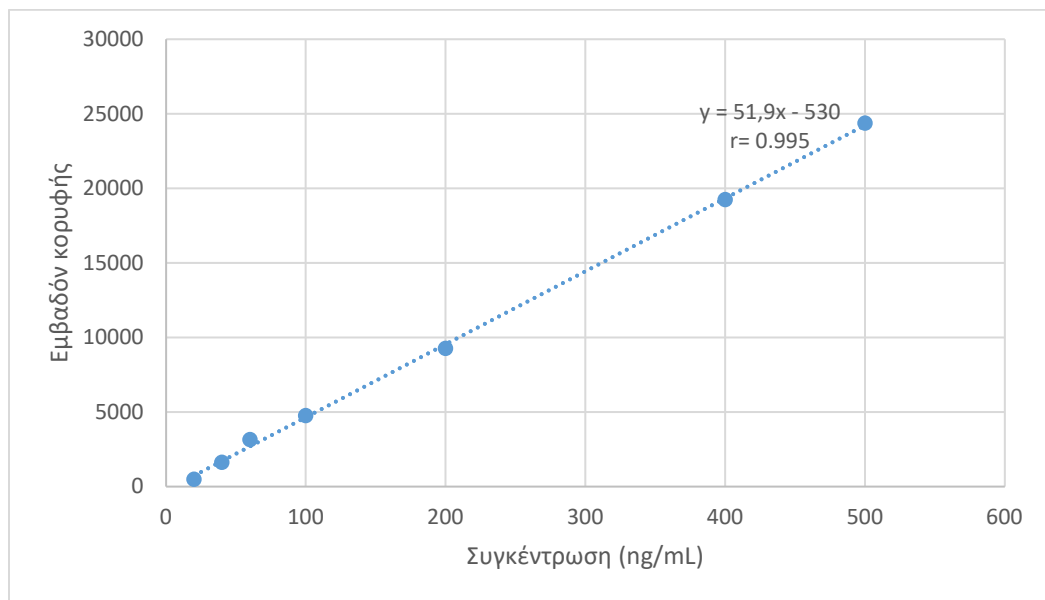
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	590	19,80	-1,0
40	1580	39,19	-2,0
60	3042	67,82	13,0
100	5017	106,50	6,5
200	9207	188,56	-5,7
400	18865	377,70	-5,6
500	25123	500,25	0,1



Σχήμα 5.15 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του iBPB.

Πίνακας 5.14: Πειραματικά δεδομένα μετρήσεων για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς του BPB

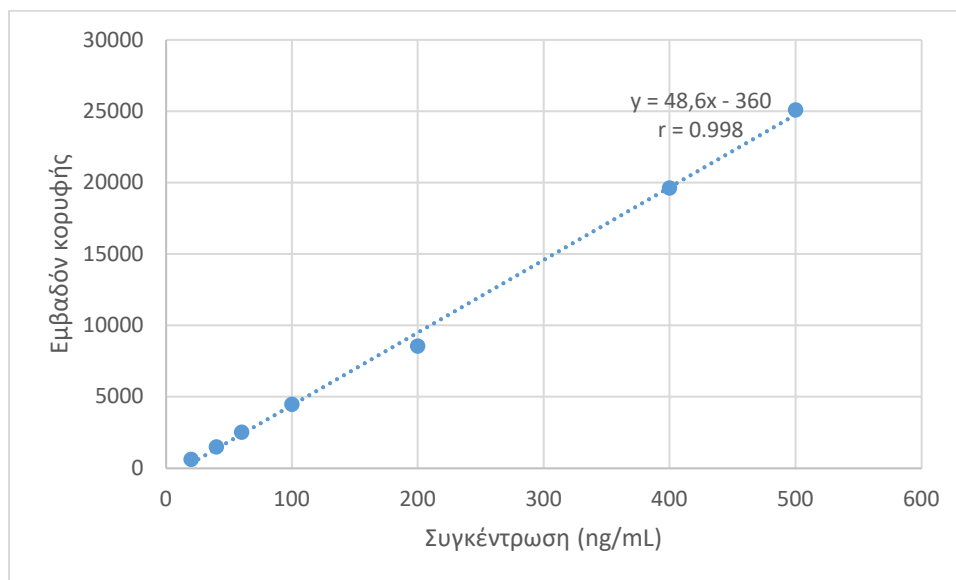
Θεωρητική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	Μέσος όρος εμβαδού κορυφής	Πειραματική συγκέντρωση (ng mL ⁻¹)	% Σχετικό αναλυτικό σφάλμα
20	490	19,62	-1,9
40	1634	41,63	4,1
60	3159	70,97	18,3
100	4753	101,64	1,6
200	9258	188,30	-5,8
400	19233	380,20	-4,9
500	24362	478,88	-4,2



Σχήμα 5.16 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του BPB.

Πίνακας 5.15: 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	630	20,23	1,2
40	1518	38,78	-3,1
60	2535	60,1	0,1
100	4495	100,94	0,9
200	8573	186,09	-7,0
400	19652	417,44	4,4
500	25102	531,24	6,2



Σχήμα 5.16 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς του BPB.

Πίνακας 5.16 Αποτελέσματα του ελέγχου γραμμικότητας για τον ποσοτικό προσδιορισμό των parabens σε μητρικό γάλα με την τεχνική FPSE-HPLC-UV.

Αναλύτης	Υλικό μήτρας	Γραμμική εξίσωση ^a	r ^b	Τυπική απόκλιση		S _e ^c
				Κλίση	Τομή	
MPB	H ₂ O	S _{MPB} = 113.9 × C _{MPB} - 795	0.998	2.6	92	0.05
	Μητρικό γάλα	S _{MPB} = 63.4 × C _{MPB} - 544	0.9991	1.3	45	0.04
EPB	H ₂ O	S _{EPB} = 122.1 × C _{EPB} - 805	0.9994	1.8	65	0.04
	Μητρικό γάλα	S _{EPB} = 75.16 × C _{EPB} - 539	0.9996	0.92	33	0.05
iPPB	H ₂ O	S _{iPPB} = 96.4 × C _{iPPB} - 774	0.991	4.1	145	0.08
	Μητρικό γάλα	S _{iPPB} = 61.3 × C _{iPPB} - 538	0.996	2.3	79	0.06
PPB	H ₂ O	S _{PPB} = 97.5 × C _{PPB} - 669	0.995	4.4	164	0.08
	Μητρικό γάλα	S _{PPB} = 59.8 × C _{PPB} - 502	0.995	2.6	93	0.09
iBPB	H ₂ O	S _{iBPB} = 98.1 × C _{iBPB} - 789	0.998	2.8	99	0.08
	Μητρικό γάλα	S _{iBPB} = 51.1 × C _{iBPB} - 420	0.996	1.9	65	0.08
BPB	H ₂ O	S _{BPB} = 97.5 × C _{BPB} - 907	0.9991	2.2	72	0.05
	Μητρικό γάλα	S _{BPB} = 51.9 × C _{BPB} - 530	0.995	2.4	72	0.10
BzPB	H ₂ O	S _{BzPB} = 92.5 × C _{BzPB} - 682	0.998	2.4	87	0.05
	Μητρικό γάλα	S _{BzPB} = 48.6 × C _{BzPB} - 360	0.998	1.1	36	0.04

^a Εμβαδόν κορυφής, S_i σε σχέση με τη συγκέντρωση, C, σε εύρος γραμμικότητας 20 to 500 ng mL⁻¹; ^b Συντελεστής συσχέτισης; ^c Τυπικό σφάλμα της μεθόδου.

Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα SPSS ver. 24.0. Σε όλες τις καμπύλες αναφοράς εφαρμόζεται ζυγισμένη γραμμική ανάλυση παλινδρόμησης με τη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων, ως συντελεστής στατιστικού βάρους χρησιμοποιείται ο όρος $w=1/y^2$ (όπου y είναι ο λόγος των επιφανειών πολλαπλασιαζόμενος με τον αντίστοιχο αριθμητικό όρο).

Τα αποτελέσματα της στατιστικής επεξεργασίας των καμπυλών αναφοράς παρουσιάζονται στον πίνακα 5.16. Για κάθε μία 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.

Επιπλέον πραγματοποιείται στατιστικός έλεγχος των καμπυλών αναφοράς για να ελεγχθεί αν ο σταθερός όρος για κάθε καμπύλη είναι διάφορος ή όχι του μηδενός. Για το σκοπό, αυτό

εφαρμόζεται η δοκιμασία Student (t - test). Όπως παρατηρούμε στον πίνακα για τις καμπύλες των αναλυτών, $t_{\text{πειρ}} < t_{\text{θεωρητικού}} = 2,36$. Ο όρος $t_{\text{πειρ}}$ αντιστοιχεί στη θεωρητική τιμή της δοκιμασίας για $f = n - 2 = 5$ βαθμούς ελευθερίας (df) και στάθμη εμπιστοσύνης 95 %. Επομένως, η τιμή του σταθερού όρου για όλες τις καμπύλες αναφοράς δε διαφέρει σημαντικά από το μηδέν.

6 Σύγκριση με άλλες μεθόδους

Η προτεινόμενη μέθοδος FPSE-HPLC/UV, συγκρίνεται ενδεικτικά με άλλες αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού parabens που έχουν προηγηθεί σε δείγματα μητρικού γάλακτος όπως φάνηκε σε παραπάνω κεφάλαιο στον πίνακα 5.1. Στην προτεινόμενη μέθοδο, ο όγκος του βιολογικού δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατά πολύ μικρότερος, ενώ ο χρόνος εκχύλισης και παραλαβής των οριζόμενων ενώσεων ήταν από τους μεγαλύτερους χρόνους που σημειώθηκαν σε σχέση με τις άλλες μεθόδους που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα, ενώ ο όγκος οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε σε όλη τη διαδικασία της FPSE ήταν περιορισμένος. Λαμβάνοντας υπόψη αυτές τις πειραματικές συνθήκες και τα αναλυτικά αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνεται ότι η αναπτυχθείσα μέθοδος είναι απλή, σχετικά γρήγορη και αποτελεσματική και ενδεχομένως μπορεί εφόσον επικυρωθεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των εξεταζόμενων parabens σε δείγματα ανθρώπινου μητρικού γάλακτος.

7 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αναπτύχθηκε μια μέθοδος για τον προσδιορισμό επτά parabens, του methyl paraben, ethyl paraben, iso-propyl paraben, propyl paraben, iso-butyl paraben, butyl paraben και benzyl paraben σε δείγματα μητρικού γάλακτος γυναικών. Τα βιολογικά δείγματα αρχικά κατεργάστηκαν με την τεχνική της εκχύλισης με προσρόφηση σε υφασμάτινο μέσο (Fabric Phase Sorptive Extraction, FPSE) και προσδιορίστηκαν με τεχνική της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σε σύζευξη με ανιχνευτή ορατού - υπεριώδους (UV). Για πρώτη φορά, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική προκατεργασίας δείγματος FPSE για την εκχύλιση parabens σε δείγματα ανθρώπινου μητρικού γάλακτος, σύμφωνα με την υπάρχουσα

διεθνή βιβλιογραφία. Αξιολογώντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την εν λόγω μελέτη, συμπεραίνεται ότι η μέθοδος χαρακτηρίζεται από:

- ✓ Ικανοποιητικές ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων ενώσεων, μετά τη βελτιστοποίηση της τεχνικής προκατεργασίας δείγματος FPSE.
- ✓ Απλότητα, καθώς δεν απαιτείται κάποια διαδικασία για την αποπρωτεΐνωση του μητρικού γάλακτος κατά την τεχνική προκατεργασίας.
- ✓ Εναρμόνιση με τις Αρχές της Πράσινης Χημείας, καθώς χρησιμοποιεί ελάχιστη ποσότητα οργανικών διαλυτών, παράγει μειωμένο όγκο αποβλήτων και δεν χρησιμοποιεί επικίνδυνες τοξικές ουσίες.
- ✓ Αποτελεσματικό χρωματογραφικό διαχωρισμό και ταυτόχρονο προσδιορισμό επτά parabens σε 25 min.
- ✓ Εκλεκτικότητα, καθώς δεν υπήρχαν παρεμποδίσεις κατά τον προσδιορισμό των ενώσεων.
- ✓ Επαναχρησιμοποίηση του μέσου προσρόφησης FPSE για τουλάχιστον τριάντα φορές, χωρίς να παρατηρηθεί απώλεια της προσροφητικής του ικανότητας.

Η προτεινόμενη μέθοδος μπορεί εφόσον επικυρωθεί να εφαρμοστεί σε αναλύσεις κλινικών δειγμάτων.

8 Βιβλιογραφία

- (1) Williams, K. R. Colored Bands: History of Chromatography. *J. Chem. Educ.* **2002**, *79* (8), 922. <https://doi.org/10.1021/ed079p922>.
- (2) Heftmann, E. *Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods. Pt. A, Pt. A*; Elsevier: Amsterdam; Boston, 2004.
- (3) Kruse, H.-P. R. Snyder, J. J. Kirkland and J. L. Glajch: Practical HPLC Method Development. Second edition, XXVI and 765 pages, numerous figures and tables. John Wiley & Sons, Inc., New York, Chichester, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto 1997. Price: 70.00 £. *Food Nahr.* **1997**, *41* (6), 380–380. <https://doi.org/10.1002/food.19970410622>.
- (4) *The Essence of Chromatography*; Elsevier Science Limited, 2003.
- (5) Meyer, V. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, 5th ed.; Wiley: Chichester, U.K, 2010.
- (6) Watson, D. G. *Pharmaceutical Analysis a Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*; Elsevier/Churchill Livingstone: Edinburgh; New York, 2012.
- (7) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 5th ed.; Saunders golden sunburst series; Saunders College Pub. ; Harcourt Brace College Publishers: Philadelphia : Orlando, Fla, 1998.
- (8) Raza, N.; Kim, K.-H.; Abdullah, M.; Raza, W.; Brown, R. J. C. Recent Developments in Analytical Quantitation Approaches for Parabens in Human-Associated Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *98*, 161–173. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.11.009>.
- (9) Błędzka, D.; Gromadzińska, J.; Wąsowicz, W. Parabens. From Environmental Studies to Human Health. *Environ. Int.* **2014**, *67*, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>.
- (10) Aalto, T. R.; Firman, M. C.; Rigler, N. E. P-Hydroxybenzoic Acid Esters as Preservatives*. *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed* **1953**, *42* (8), 449–457. <https://doi.org/10.1002/jps.3030420802>.
- (11) Rastogi, S. C.; Schouten, A.; de Kruijf, N.; Weijland, J. W. Contents of Methyl-, Ethyl-, Propyl-, Butyl- and Benzylparaben in Cosmetic Products. *Contact Dermatitis* **1995**, *32* (1), 28–30. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.1995.tb00836.x>.
- (12) Gabb, H. A.; Blake, C. An Informatics Approach to Evaluating Combined Chemical Exposures from Consumer Products: A Case Study of Asthma-Associated Chemicals and Potential Endocrine Disruptors. *Environ. Health Perspect.* **2016**, *124* (8), 1155–1165. <https://doi.org/10.1289/ehp.1510529>.
- (13) Soni, M. G.; Carabin, I. G.; Burdock, G. A. Safety Assessment of Esters of P-Hydroxybenzoic Acid (Parabens). *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43* (7), 985–1015. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.020>.

- (14) Wang, L.; Wu, Y.; Zhang, W.; Kannan, K. Characteristic Profiles of Urinary *p*-Hydroxybenzoic Acid and Its Esters (Parabens) in Children and Adults from the United States and China. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (4), 2069–2076. <https://doi.org/10.1021/es304659r>.
- (15) Liao, C.; Chen, L.; Kannan, K. Occurrence of Parabens in Foodstuffs from China and Its Implications for Human Dietary Exposure. *Environ. Int.* **2013**, *57–58*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.04.001>.
- (16) Canosa, P.; Pérez-Palacios, D.; Garrido-López, A.; Tena, M. T.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R. Pressurized Liquid Extraction with In-Cell Clean-up Followed by Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for the Selective Determination of Parabens and Triclosan in Indoor Dust. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1161* (1–2), 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.089>.
- (17) Rudel, R. A.; Camann, D. E.; Spengler, J. D.; Korn, L. R.; Brody, J. G. Phthalates, Alkylphenols, Pesticides, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Other Endocrine-Disrupting Compounds in Indoor Air and Dust. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37* (20), 4543–4553. <https://doi.org/10.1021/es0264596>.
- (18) Núñez, L.; Tadeo, J. L.; García-Valcárcel, A. I.; Turiel, E. Determination of Parabens in Environmental Solid Samples by Ultrasonic-Assisted Extraction and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1214* (1–2), 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.105>.
- (19) Fransway, A. F.; Fransway, P. J.; Belsito, D. V.; Yiannias, J. A. Paraben Toxicology: *Dermatitis* **2019**, *30* (1), 32–45. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000428>.
- (20) Darbre, P. D.; Aljarrah, A.; Miller, W. R.; Coldham, N. G.; Sauer, M. J.; Pope, G. S. Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours. *J. Appl. Toxicol.* **2004**, *24* (1), 5–13. <https://doi.org/10.1002/jat.958>.
- (21) Harvey, P. W.; Darbre, P. Endocrine Disrupters and Human Health: Could Oestrogenic Chemicals in Body Care Cosmetics Adversely Affect Breast Cancer Incidence in Women?: A Review of Evidence and Call for Further Research. *J. Appl. Toxicol.* **2004**, *24* (3), 167–176. <https://doi.org/10.1002/jat.978>.
- (22) Final Amended Report on the Safety Assessment of Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Isopropylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben, and Benzylparaben as Used in Cosmetic Products. *Int. J. Toxicol.* **2008**, *27*, 1–82. <https://doi.org/10.1080/10915810802548359>.
- (23) Routledge, E. J.; Parker, J.; Odum, J.; Ashby, J.; Sumpter, J. P. Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, *153* (1), 12–19. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8544>.
- (24) Golden, R.; Gandy, J.; Vollmer, G. A Review of the Endocrine Activity of Parabens and Implications for Potential Risks to Human Health. *Crit. Rev. Toxicol.* **2005**, *35* (5), 435–458. <https://doi.org/10.1080/10408440490920104>.

- (25) Byford, J. R.; Shaw, L. E.; Drew, M. G. B.; Pope, G. S.; Sauer, M. J.; Darbre, P. D. Oestrogenic Activity of Parabens in MCF7 Human Breast Cancer Cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2002**, *80* (1), 49–60. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00174-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00174-1).
- (26) Barr, L.; Metaxas, G.; Harbach, C. A. J.; Savoy, L. A.; Darbre, P. D. Measurement of Paraben Concentrations in Human Breast Tissue at Serial Locations across the Breast from Axilla to Sternum: Measurement of Parabens in Human Breast Tissue. *J. Appl. Toxicol.* **2012**, *32* (3), 219–232. <https://doi.org/10.1002/jat.1786>.
- (27) Harville, H.; Voorman, R.; Prusakiewicz, J. Comparison of Paraben Stability in Human and Rat Skin. *Drug Metab. Lett.* **2007**, *1* (1), 17–21. <https://doi.org/10.2174/187231207779814300>.
- (28) Ishiwatari, S.; Suzuki, T.; Hitomi, T.; Yoshino, T.; Matsukuma, S.; Tsuji, T. Effects of Methyl Paraben on Skin Keratinocytes. *J. Appl. Toxicol.* **2007**, *27* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/jat.1176>.
- (29) Handa, O.; Kokura, S.; Adachi, S.; Takagi, T.; Naito, Y.; Tanigawa, T.; Yoshida, N.; Yoshikawa, T. Methylparaben Potentiates UV-Induced Damage of Skin Keratinocytes. *Toxicology* **2006**, *227* (1–2), 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.07.018>.
- (30) Moos, R. K.; Angerer, J.; Dierkes, G.; Brüning, T.; Koch, H. M. Metabolism and Elimination of Methyl, Iso- and n-Butyl Paraben in Human Urine after Single Oral Dosage. *Arch. Toxicol.* **2016**, *90* (11), 2699–2709. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1636-0>.
- (31) Ye, X.; Bishop, A. M.; Reidy, J. A.; Needham, L. L.; Calafat, A. M. Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans. *Environ. Health Perspect.* **2006**, *114* (12), 1843–1846. <https://doi.org/10.1289/ehp.9413>.
- (32) Imai, T. Human Carboxylesterase Isozymes: Catalytic Properties and Rational Drug Design. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2006**, *21* (3), 173–185. <https://doi.org/10.2133/dmpk.21.173>.
- (33) Jewell, C.; Prusakiewicz, J. J.; Ackermann, C.; Payne, N. A.; Fate, G.; Voorman, R.; Williams, F. M. Hydrolysis of a Series of Parabens by Skin Microsomes and Cytosol from Human and Minipigs and in Whole Skin in Short-Term Culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *225* (2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.08.002>.
- (34) Ye, X.; Wong, L.-Y.; Jia, L. T.; Needham, L. L.; Calafat, A. M. Stability of the Conjugated Species of Environmental Phenols and Parabens in Human Serum☆. *Environ. Int.* **2009**, *35* (8), 1160–1163. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.07.011>.
- (35) Abbas, S.; Greige-Gerges, H.; Karam, N.; Piet, M.-H.; Netter, P.; Magdalou, J. Metabolism of Parabens (4-Hydroxybenzoic Acid Esters) by Hepatic Esterases and UDP-Glucuronosyltransferases in Man. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2010**, *25* (6), 568–577. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-10-RG-013>.

- (36) Dagher, Z.; Borgie, M.; Magdalou, J.; Chahine, R.; Greige-Gerges, H. P-Hydroxybenzoate Esters Metabolism in MCF7 Breast Cancer Cells. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50* (11), 4109–4114. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.08.013>.
- (37) Boberg, J.; Taxvig, C.; Christiansen, S.; Hass, U. Possible Endocrine Disrupting Effects of Parabens and Their Metabolites. *Reprod. Toxicol.* **2010**, *30* (2), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.03.011>.
- (38) Aubert, N.; Ameller, T.; Legrand, J.-J. Systemic Exposure to Parabens: Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Excretion Balance and Plasma Metabolites of [14C]-Methyl-, Propyl- and Butylparaben in Rats after Oral, Topical or Subcutaneous Administration. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50* (3–4), 445–454. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.045>.
- (39) European Commission; Directorate General for Health & Consumers. *Opinion on Parabens.*; European Commission: Brussels, 2010.
- (40) Hervada, A. R.; Feit, E.; Sgraves, R. Drugs in Breast Milk. *Perinat. Care* **1978**, *2* (8), 19–25.
- (41) Catz, C. S.; Giacoia, G. P. Drugs and Breast Milk. *Pediatr. Clin. North Am.* **1972**, *19* (1), 151–166. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)32673-6](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)32673-6).
- (42) Jenness, R. The Composition of Human Milk. *Semin. Perinatol.* **1979**, *3* (3), 225–239.
- (43) Ballard, O.; Morrow, A. L. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr. Clin. North Am.* **2013**, *60* (1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.
- (44) Hotham, N.; Hotham, E. Drugs in Breastfeeding. *Aust. Prescr.* **2015**, *38* (5), 156–159. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2015.056>.
- (45) Li, S.-W.; Watanabe, K.; Hsu, C.-C.; Chao, S.-H.; Yang, Z.-H.; Lin, Y.-J.; Chen, C.-C.; Cao, Y.-M.; Huang, H.-C.; Chang, C.-H.; Tsai, Y.-C. Bacterial Composition and Diversity in Breast Milk Samples from Mothers Living in Taiwan and Mainland China. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 965. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00965>.
- (46) Ballard, O.; Morrow, A. L. Human Milk Composition. *Pediatr. Clin. North Am.* **2013**, *60* (1), 49–74. <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>.
- (47) Grecco, C. F.; Souza, I. D.; Queiroz, M. E. C. Recent Development of Chromatographic Methods to Determine Parabens in Breast Milk Samples: A Review. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1093–1094*, 82–90. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.059>.
- (48) Azzouz, A.; Rascón, A. J.; Ballesteros, E. Determination of Free and Conjugated Forms of Endocrine-Disrupting Chemicals in Human Biological Fluids by GC–MS. *Bioanalysis* **2016**, *8* (11), 1145–1158. <https://doi.org/10.4155/bio-2015-0008>.

- (49) Ito, S.; Lee, A. Drug Excretion into Breast Milk—Overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, *55* (5), 617–627. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(03\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(03)00034-6).
- (50) Teckchandani, S.; McKay, G. Prescribing in Pregnancy, 4th Edition. *Obstet. Med.* **2010**, *3* (3), 125–125. <https://doi.org/10.1258/om.2010.100020>.
- (51) Moldoveanu, Șerban; David, V. *Sample Preparation in Chromatography*; Elsevier: Amsterdam; Boston, 2002.
- (52) Englard, S.; Seifter, S. [22] Precipitation Techniques. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 1990; Vol. 182, pp 285–300. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82024-V](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82024-V).
- (53) Fisher, M.; MacPherson, S.; Braun, J. M.; Hauser, R.; Walker, M.; Feeley, M.; Mallick, R.; Bérubé, R.; Arbuckle, T. E. Paraben Concentrations in Maternal Urine and Breast Milk and Its Association with Personal Care Product Use. *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51* (7), 4009–4017. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04302>.
- (54) *Analytical Chemistry: Developments, Applications and Challenges in Food Analysis*; Locatelli, M., Celia, C., Eds.; Analytical chemistry and microchemistry; Nova Science Publishers: New York, 2017.
- (55) Kabir, A.; Locatelli, M.; Ulusoy, H. Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation. *Separations* **2017**, *4* (4), 36. <https://doi.org/10.3390/separations4040036>.
- (56) Pawliszyn, J. *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*; Wiley-VCH: New York, 1997.
- (57) Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.-R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of Organic Compounds in Water Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116* (1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>.
- (58) Picó, Y. Ultrasound-Assisted Extraction for Food and Environmental Samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *43*, 84–99. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.12.005>.
- (59) Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. The 12 Principles of Green Analytical Chemistry and the SIGNIFICANCE Mnemonic of Green Analytical Practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *50*, 78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.
- (60) Abuzar Kabir; Rodolfo Mesa; Jessica Jurmain; Kenneth Furton. Fabric Phase Sorptive Extraction Explained. *Separations* **2017**, *4* (2), 21. <https://doi.org/10.3390/separations4020021>.
- (61) Gülle, S.; Ulusoy, H. I.; Kabir, A.; Tartaglia, A.; Furton, K. G.; Locatelli, M.; Samanidou, V. F. Application of a Fabric Phase Sorptive Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Photodiode Array Detection Method for the Trace Determination of Methyl Paraben, Propyl Paraben and Butyl Paraben in Cosmetic and Environmental Samples. *Anal. Methods* **2019**, *11* (48), 6136–6145. <https://doi.org/10.1039/C9AY02260K>.

- (62) Lioupi, A.; Kabir, A.; Furton, K. G.; Samanidou, V. Fabric Phase Sorptive Extraction for the Isolation of Five Common Antidepressants from Human Urine Prior to HPLC-DAD Analysis. *J. Chromatogr. B* **2019**, *1118–1119*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.045>.
- (63) Locatelli, M.; Tinari, N.; Grassadonia, A.; Tartaglia, A.; Macerola, D.; Piccolantonio, S.; Sperandio, E.; D’Ovidio, C.; Carradori, S.; Ulusoy, H. I.; Furton, K. G.; Kabir, A. FPSE-HPLC-DAD Method for the Quantification of Anticancer Drugs in Human Whole Blood, Plasma, and Urine. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1095*, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.042>.
- (64) Kabir, A.; Furton, K. G.; Tinari, N.; Grossi, L.; Innosa, D.; Macerola, D.; Tartaglia, A.; Di Donato, V.; D’Ovidio, C.; Locatelli, M. Fabric Phase Sorptive Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array Detection Method for Simultaneous Monitoring of Three Inflammatory Bowel Disease Treatment Drugs in Whole Blood, Plasma and Urine. *J. Chromatogr. B* **2018**, *1084*, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.028>.
- (65) Locatelli, M.; Kabir, A.; Innosa, D.; Lopatriello, T.; Furton, K. G. A Fabric Phase Sorptive Extraction-High Performance Liquid Chromatography-Photo Diode Array Detection Method for the Determination of Twelve Azole Antimicrobial Drug Residues in Human Plasma and Urine. *J. Chromatogr. B* **2017**, *1040*, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.10.045>.
- (66) Samanidou, V.; Kaltzi, I.; Kabir, A.; Furton, K. G. Simplifying Sample Preparation Using Fabric Phase Sorptive Extraction Technique for the Determination of Benzodiazepines in Blood Serum by High-Performance Liquid Chromatography: FPSE Extraction of Benzodiazepines from Blood Serum. *Biomed. Chromatogr.* **2016**, *30* (6), 829–836. <https://doi.org/10.1002/bmc.3615>.
- (67) Fotouhi, M.; Seidi, S.; Shanehsaz, M.; Naseri, M. T. Magnetically Assisted Matrix Solid Phase Dispersion for Extraction of Parabens from Breast Milks. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1504*, 17–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.009>.
- (68) Vela-Soria, F.; Jiménez-Díaz, I.; Díaz, C.; Pérez, J.; Iribarne-Durán, L. M.; Serrano-López, L.; Arrebola, J. P.; Fernández, M. F.; Olea, N. Determination of Endocrine-Disrupting Chemicals in Human Milk by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Bioanalysis* **2016**, *8* (17), 1777–1791. <https://doi.org/10.4155/bio-2016-0073>.
- (69) Azzouz, A.; Rascón, A. J.; Ballesteros, E. Simultaneous Determination of Parabens, Alkylphenols, Phenylphenols, Bisphenol A and Triclosan in Human Urine, Blood and Breast Milk by Continuous Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2016**, *119*, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.11.024>.
- (70) Rodríguez-Gómez, R.; Dorival-García, N.; Zafra-Gómez, A.; Camino-Sánchez, F. J.; Ballesteros, O.; Navalón, A. New Method for the Determination of Parabens and Bisphenol A in Human Milk Samples Using Ultrasound-Assisted Extraction and Clean-up with Dispersive Sorbents Prior to UHPLC–MS/MS Analysis. *J. Chromatogr. B* **2015**, *992*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.04.022>.

- (71) Asiabi, H.; Yamini, Y.; Seidi, S.; Esrafil, A.; Rezaei, F. Electroplating of Nanostructured Polyaniline–Polypyrrole Composite Coating in a Stainless-Steel Tube for on-Line in-Tube Solid Phase Microextraction. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1397*, 19–26. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.015>.
- (72) Schlumpf, M.; Kypke, K.; Wittassek, M.; Angerer, J.; Mascher, H.; Mascher, D.; Vökt, C.; Birchler, M.; Lichtensteiger, W. Exposure Patterns of UV Filters, Fragrances, Parabens, Phthalates, Organochlor Pesticides, PBDEs, and PCBs in Human Milk: Correlation of UV Filters with Use of Cosmetics. *Chemosphere* **2010**, *81* (10), 1171–1183. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.079>.
- (73) Ye, X.; Bishop, A. M.; Needham, L. L.; Calafat, A. M. 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* **2008**, *622* (1–2), 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.068>.
- (74) Cashman, A. L.; Warshaw, E. M. Parabens: A Review of Epidemiology, Structure, Allergenicity, and Hormonal Properties. *Dermat. Contact Atopic Occup. Drug* **2005**, *16* (2), 57–66; quiz 55–56.
- (75) Sasseville, D. Hypersensitivity to Preservatives. *Dermatol. Ther.* **2004**, *17* (3), 251–263. <https://doi.org/10.1111/j.1396-0296.2004.04028.x>.
- (76) Grzanka, A.; Misiólek, H.; Filipowska, A.; Miśkiewicz-Orczyk, K.; Jarząb, J. Adverse Effects of Local Anaesthetics - Allergy, Toxic Reactions or Hypersensitivity. *Anestezjol. Intensywna Ter.* **2010**, *42* (4), 175–178.
- (77) Kajimoto, Y.; Rosenberg, M. E.; Kytä, J.; Randell, T.; Tuominen, M.; Reunala, T.; Rosenberg, P. H. Anaphylactoid Skin Reactions after Intravenous Regional Anaesthesia Using 0.5% Prilocaine with or without Preservative - a Double-Blind Study. *Acta Anaesthesiol. Scand.* **1995**, *39* (6), 782–784. <https://doi.org/10.1111/j.1399-6576.1995.tb04170.x>.
- (78) Prusakiewicz, J. J.; Harville, H. M.; Zhang, Y.; Ackermann, C.; Voorman, R. L. Parabens Inhibit Human Skin Estrogen Sulfotransferase Activity: Possible Link to Paraben Estrogenic Effects. *Toxicology* **2007**, *232* (3), 248–256. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.01.010>.
- (79) Musatov, S.; Chen, W.; Pfaff, D. W.; Mobbs, C. V.; Yang, X.-J.; Clegg, D. J.; Kaplitt, M. G.; Ogawa, S. Silencing of Estrogen Receptor in the Ventromedial Nucleus of Hypothalamus Leads to Metabolic Syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (7), 2501–2506. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610787104>.
- (80) Xu, Y.; Nedungadi, T. P.; Zhu, L.; Sobhani, N.; Irani, B. G.; Davis, K. E.; Zhang, X.; Zou, F.; Gent, L. M.; Hahner, L. D.; Khan, S. A.; Elias, C. F.; Elmquist, J. K.; Clegg, D. J. Distinct Hypothalamic Neurons Mediate Estrogenic Effects on Energy Homeostasis and Reproduction. *Cell Metab.* **2011**, *14* (4), 453–465. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.009>.
- (81) Kim, J.; Chevrier, J. Exposure to Parabens and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome: An Analysis of the Canadian Health Measures Survey. *Sci. Total Environ.* **2020**, *713*, 135116. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135116>.