



**Πανεπιστήμιο Κρήτης Τμήμα Χημείας  
Εργαστήριο Περιβαλλοντικών Χημικών Διεργασιών**

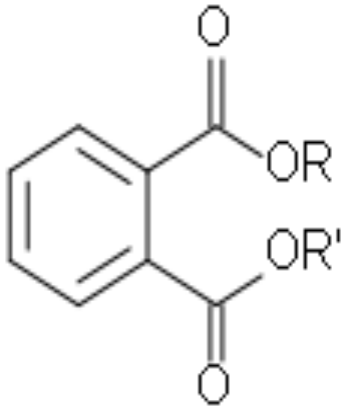
**Μελέτη ανθρώπινης έκθεσης σε φθαλικούς  
εστέρες με χρήση HPLC-ESI-MS<sup>2</sup> και GC-  
MS**

**A. Μυριδάκης & E. G. Στεφάνου**

**Ανάπτυξη μεθόδου προσδιορισμού των μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων στα ούρα με χρήση υγρής χρωματογραφίας - δίδυμης φασματομετρίας μάζας με ιονισμό ηλεκτροψεκασμού (HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>)**

# 1. Εισαγωγή

## Γενική Δομή Φθαλικών Εστέρων



## ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ:

- Πλαστικοποιητές
- Διαλύτες
- Καλλυντικά
- Φάρμακα
- Συσκευασίες τροφίμων
- Διάφορα άλλα είδη ευρείας κατανάλωσης

# 1.1 Χρήσεις φθαλικών εστέρων

Φθαλικός εστέρας	Μεταβολίτες	Κύριες χρήσεις
DEP	mEP	Βιομηχανία φθαλικών εστέρων, διαλύτες, κεριά, μελάνια, κόλλες, φάρμακα, καλλυντικά, ζιζανιοκτόνα
DnBP	mnBP	Βιομηχανία φθαλικών εστέρων, πλαστικά προϊόντα νιτροσελουλόζης, PVC, καλλυντικά, spray
DEHP	mEHP mEHHP mEOHP	PVC, συσκευασίες τροφίμων, ρούχα, προϊόντα για παιδιά, ιατρικές συσκευές, οικοδομικά υλικά, τμήματα αυτοκινήτων
DiNP	miNP	PVC, συσκευασίες τροφίμων, καλαμάκια, γάντια, σωλήνες ποτίσματος

## 1.2 Επιδράσεις Έκθεσης

Οι φθαλικοί διεστέρες μεταβολίζονται ταχύτατα σε μονοεστέρες στο ποντίκι (Rowland et al., 1977) και στον άνθρωπο (Anderson et al., 2001)

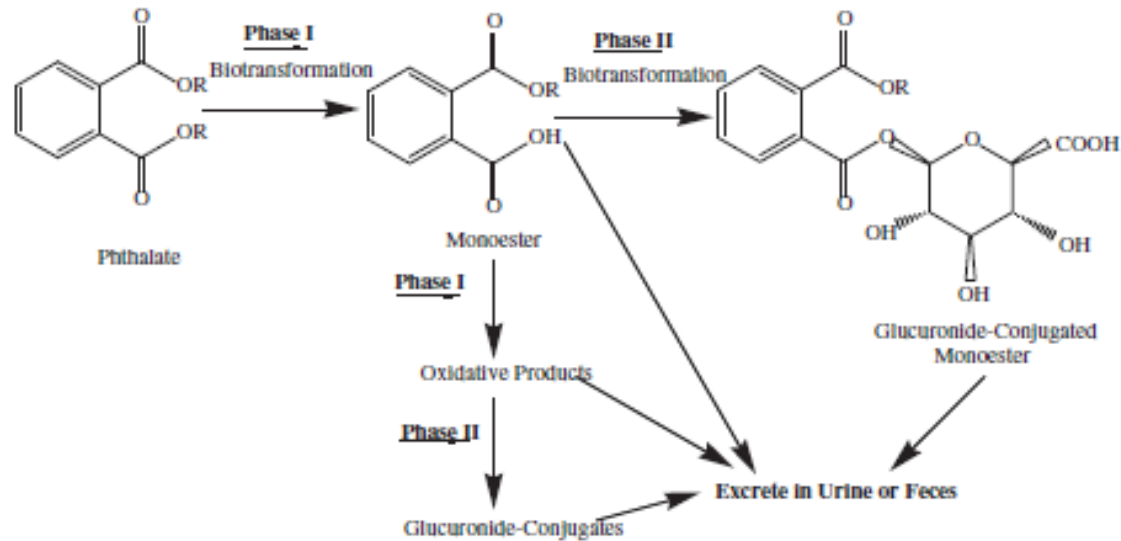
### Πειραματόζωα

- Καρκίνος στο ήπαρ
- Αναπτυξιακές διαταραχές
- Αναπαραγωγικές διαταραχές

### Άνθρωπος

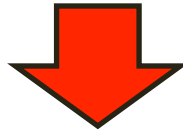
- Αδιευκρίνιστο αν η έκθεση προκαλεί δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία
- Φέρονται να δρουν ως ενδοκρινικοί διαταρράκτες
- Ανάγκη για εκτίμηση επιπέδων έκθεσης στο γενικό πληθυσμό – Επιδημιολογικές μελέτες

# Γενικό μεταβολικό μονοπάτι των φθαλικών εστέρων στον ανθρώπινο οργανισμό



(Calafat *et al.*, 2006.)

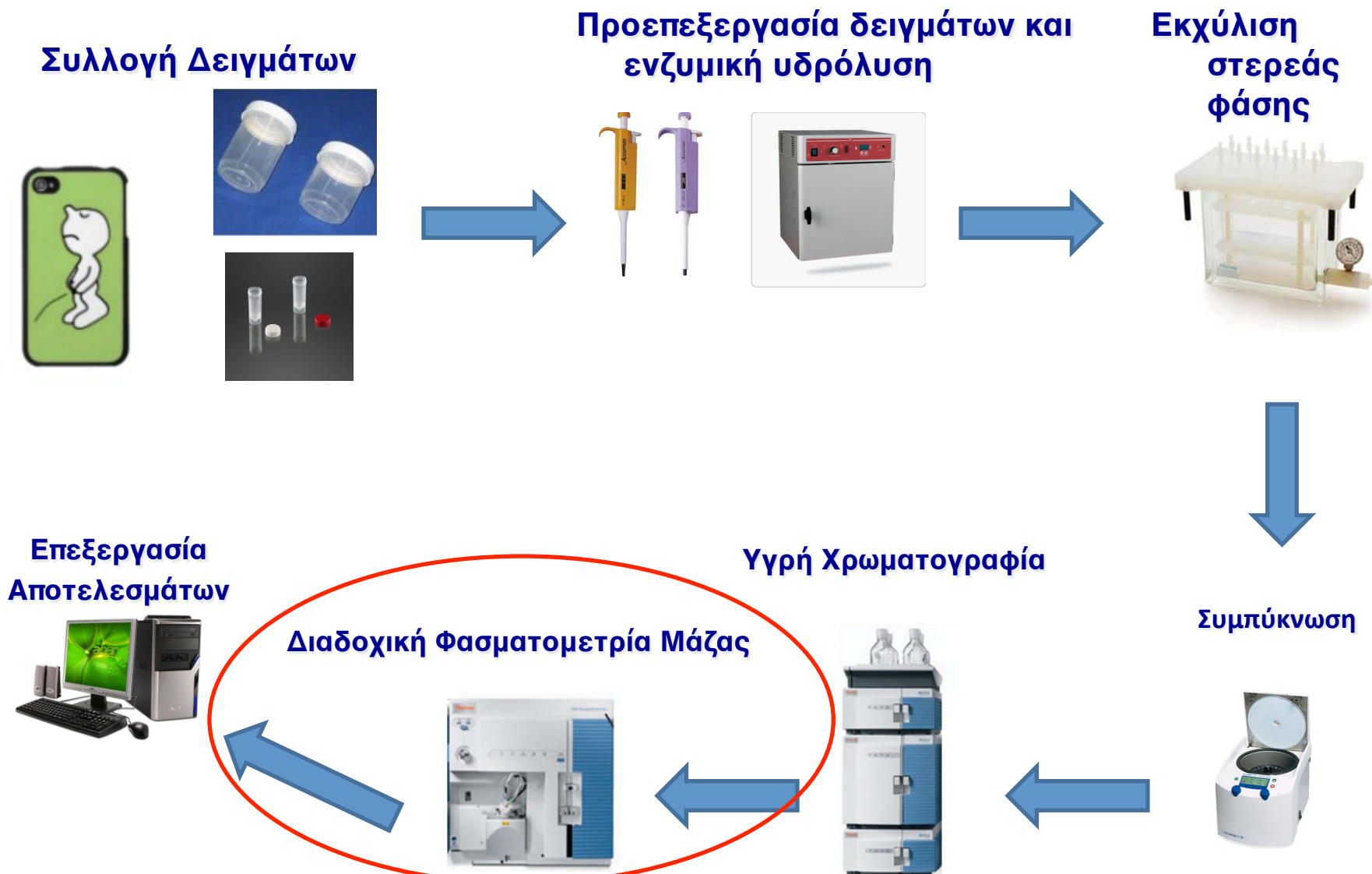
# Ολικές συγκεντρώσεις των μεταβολιτών (ελεύθερων και συζευγμένων)



## Βιοδείκτες (biomarkers) έκθεσης σε φθαλικούς διεστέρες στην περιβαλλοντική επιδημιολογία

- Ταχύτερη αποβολή συζευγμένων ενώσεων
- Μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα
- Μειωμένη βιολογική δραστικότητα

## 2. Ανάλυση μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε δείγματα ανθρώπινων ούρων

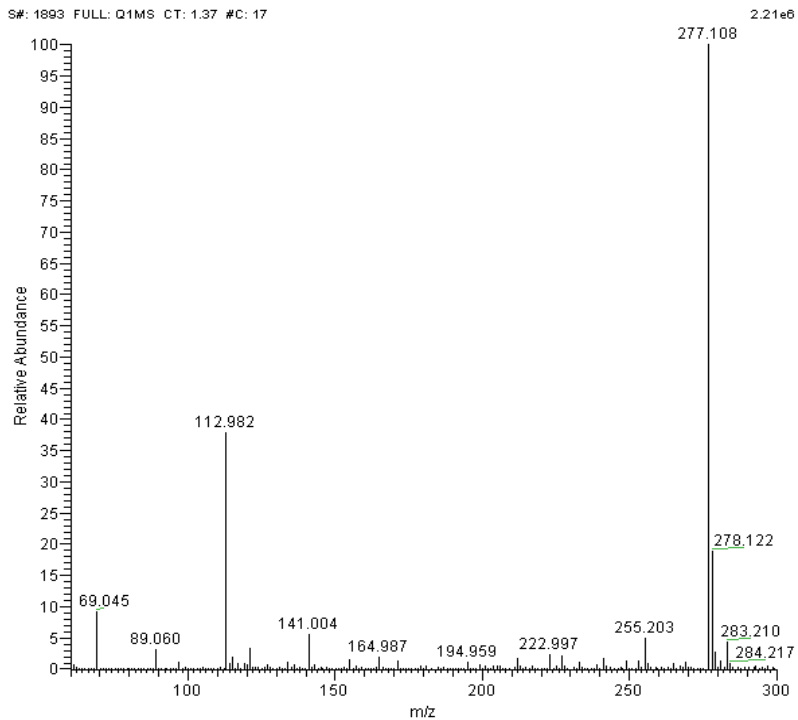




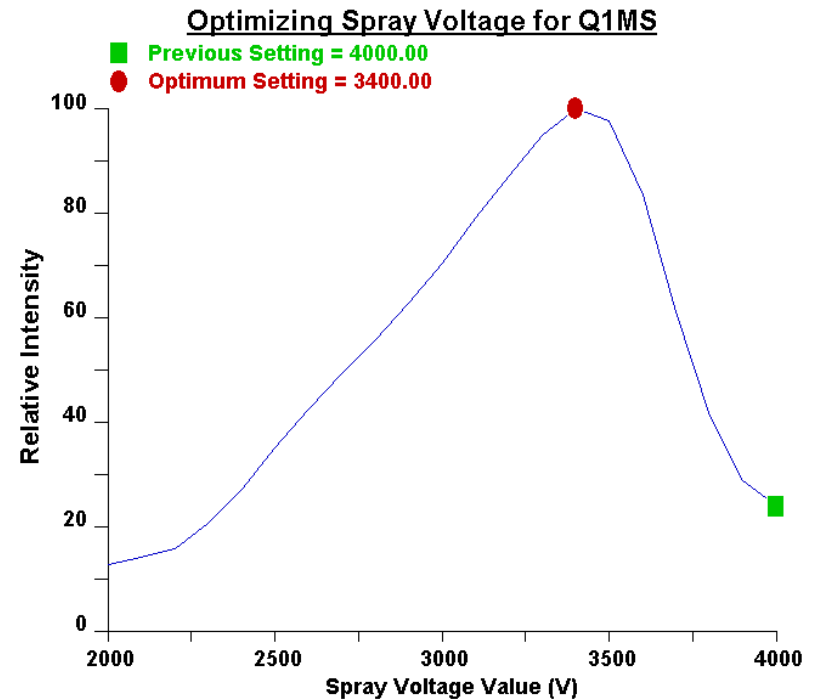
## 2.1. Φασματομετρία Μαζών

- Thermo Finnigan TSQ Quantum (τριπλό τετράπολο)
- Ηλεκτροψεκασμός με αρνητικό δυναμικό
- Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM)

# Βελτιστοποίηση Φασματογράφου Μάζας

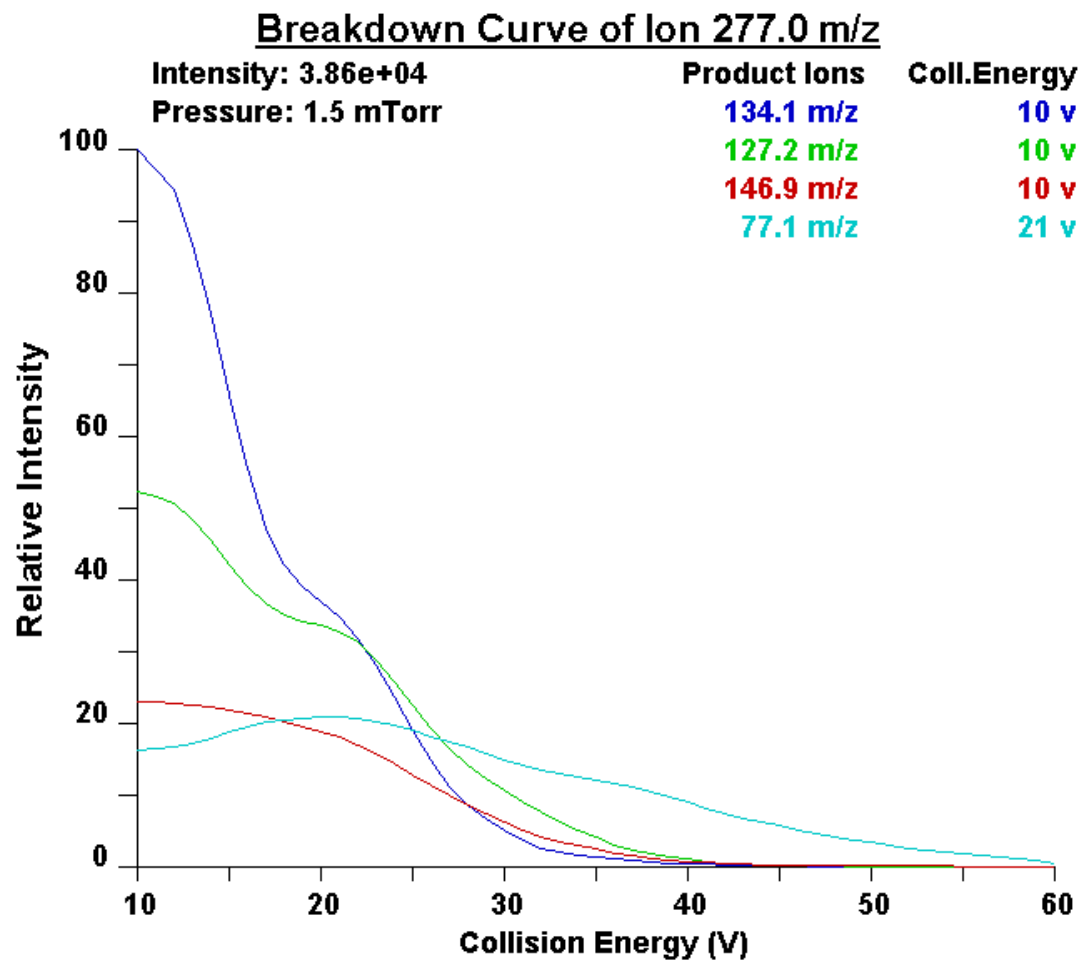


**Φάσμα μάζας πλήρους σάρωσης του μη επισημασμένου mEHP**



**Διάγραμμα βελτιστοποίησης δυναμικού ηλεκτροψεκασμού για το μη επισημασμένο mEHP**

# Βελτιστοποίηση MS<sup>2</sup>



Διάγραμμα έντασης θυγατρικών ιόντων mEHP-ενέργειας πρόσκρουσης

## Επιλεγμένες αντιδράσεις ιόντων

Ένωση	Μη ιχνηθετημένη μορφή	Ιχνηθετημένη μορφή
mEP	193→77	197 →79
mEHHP	293 →121	297 →124
mBP	221 →77	225 →79
mEOHP	291 →121	295 →124
mEHP	277 →134	281 →137
mNP	291→141	295→145
4-methylumbelliferrone	175 →133	179→135
4-methylumbelliferryl glucoronide	350→175	Μη διαθέσιμο αντιδραστήριο

## 2. Ανάλυση μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε δείγματα ανθρώπινων ούρων



## 2.2. Συνθήκες HPLC

- **Αντλία:** Surveyor LC Pump, Thermo Finnigan
- **Αυτόματος δειγματολήπτης:** Surveyor Autosampler, Thermo Finnigan
- **Στήλη:** Phenyl Betasil 3 $\mu$ m, 100mm x 2mm, Thermo Scientific

### Κινητή Φάση

**Διαλύτης A:** 0,1% οξικό οξύ σε ακετονιτρίλιο

**Διαλύτης B:** 0,1% οξικό οξύ σε νερό

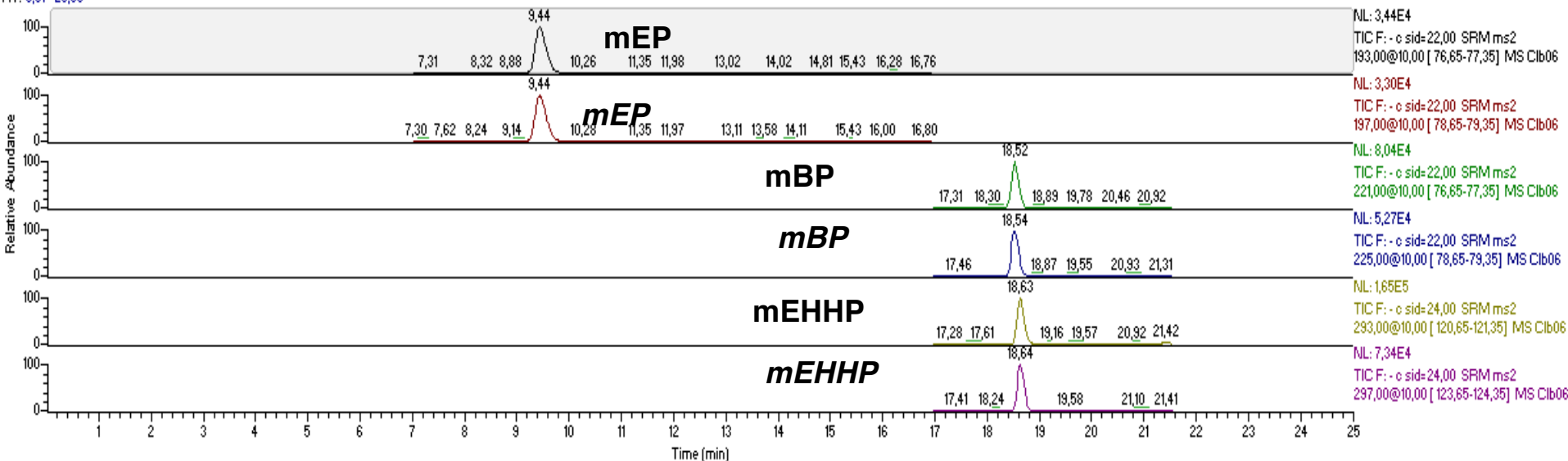
**Ροή:** 0,350 mL/min

### Βαθμιδωτό πρόγραμμα έκλουσης

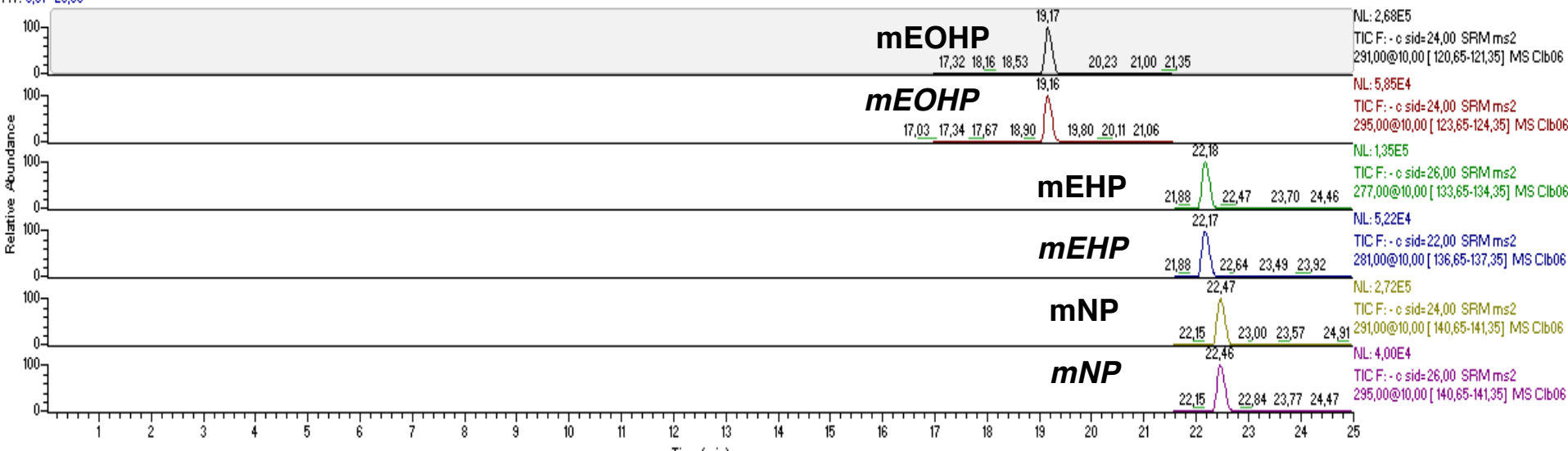
Χρόνος (min)	0	0.1	1.0	14.0	21.0	22.0	22.5	23.0	25
Διαλύτης A %	4	4	15	25	65	100	100	4	4
Διαλύτης B %	96	96	85	75	35	0	0	96	96

# Τυπικό Χρωματογράφημα Πρότυπου Διαλύματος

RT: 0,01 - 25,00



RT: 0,01 - 25,00



## **2.3. Τελικές Συνθήκες Φασματογράφου Μάζας**

- **Δυναμικό Ηλεκτροψεκασμού: -4000V**
- **Θερμοκρασία Τριχοειδούς Μεταφοράς Ιόντων: 330°C**
- **Πίεση Αερίου Ξήρανσης 20 mTorr**
- **Πίεση Αερίου Εκνέφωσης 45mTorr (1<sup>ο</sup>-3<sup>ο</sup> segment) και 49mTorr (4<sup>ο</sup> segment)**
- **Διάσπαση από επαγόμενη σύγκρουση στην πηγή (Source CID) και δυναμικό φακών εστίασης (tube lens offset): βέλτιστο ανά SRM**



## 2.4. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου

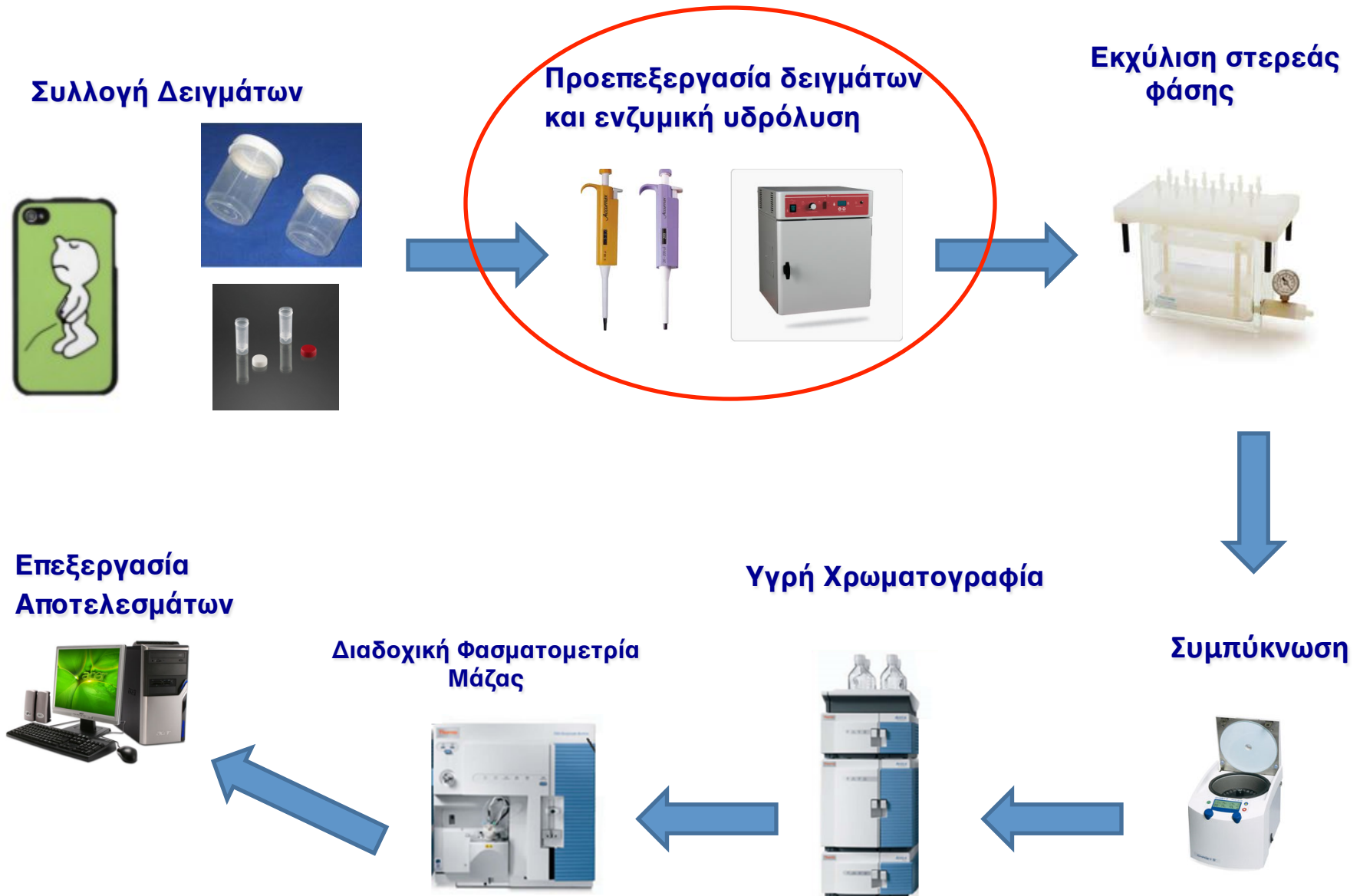
Ένωση	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
mEP	0.9	2.8
mEHHP	2.8	9.0
mBP	4.8	15.2
mEOHP	1.9	6.2
mEHP	0.2	0.6
mNP	2.0	6.0

**LOD:** τυπική απόκλιση 7 μετρήσεων ίδιου διαλύματος χαμηλής συγκέντρωσης επί 3.14

**LOQ:** τυπική απόκλιση 7 μετρήσεων ίδιου διαλύματος χαμηλής συγκέντρωσης επί 10

Διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης: συγκέντρωση μεταξύ LOD-LOQ

## 2. Ανάλυση μεταβολιτών των φθαλικών εστέρων σε δείγματα ανθρώπινων ούρων



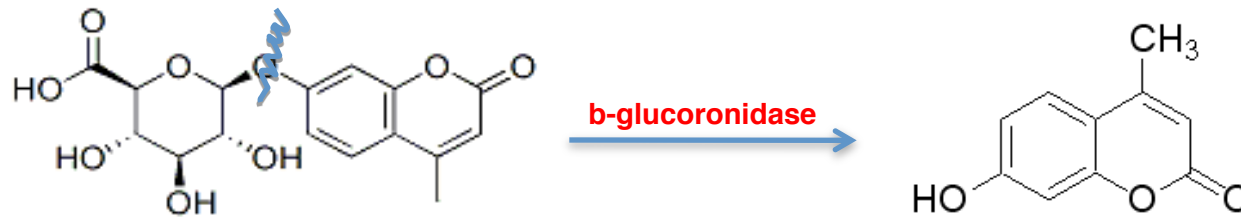
## 2.6. Προεπεξεργασία δειγμάτων

- Το δείγμα τήκεται (αποθήκευση στους  $-20^{\circ}\text{C}$ ), αναδεύεται και 1mL μεταφέρεται σε κωνικό σωλήνα φυγοκέντρισης πολυπροπυλενίου.

### Προστίθενται :

- Ιχνηθετημένα με  $\text{C}_{13}$  εσωτερικά πρότυπα (100-400ng),
- Ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONa}-\text{CH}_3\text{COOH}$  (pH:6.5, 250 $\mu\text{L}$ ), E.Coli  $\beta$ -glucoronidase (10  $\mu\text{L}$ , 140 units/mL),
- 4-methylumbelliferyl glucoronide (200ng), 4-methylumbelliferrone ιχνηθετημένα με  $\text{C}_{13}$  (100ng)
- Επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$ , 90min

## 2.7. Ενζυμική Υδρόλυση



- **$\beta$ -4-methylumbelliferyl glucuronide: περιεκτικότητα σε νερό <15%**
- **Απόδοση  $83 \pm 1\%$**
- **Βιβλιογραφία: 100% σε ακριβώς ίδιες συνθήκες και αντιδραστήρια**
- **Εναλλακτικός τρόπος παρακολούθησης της υδρόλυσης: Έλεγχος κατανάλωσης  $\beta$ -4-methylumbelliferyl glucuronide αντί παραγωγής 4-methylumbelliferone**
- **100% απόδοση**

## 3. Χαρακτηριστικά μεθόδου

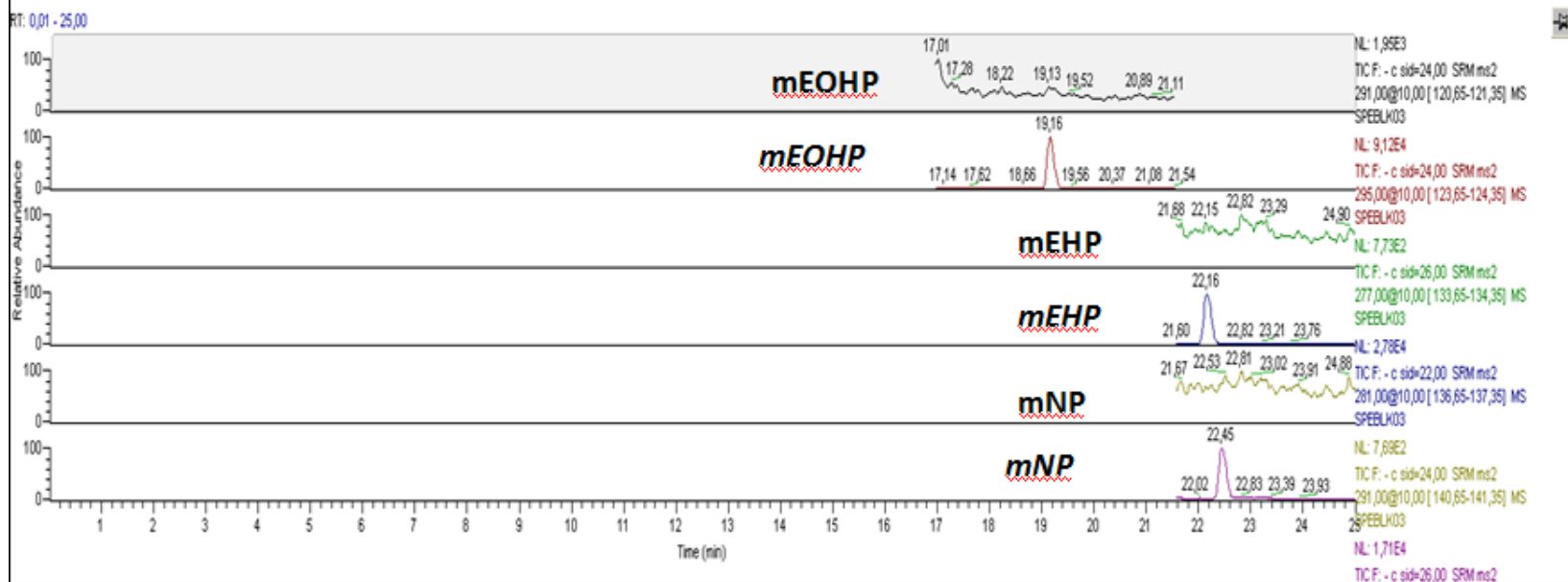
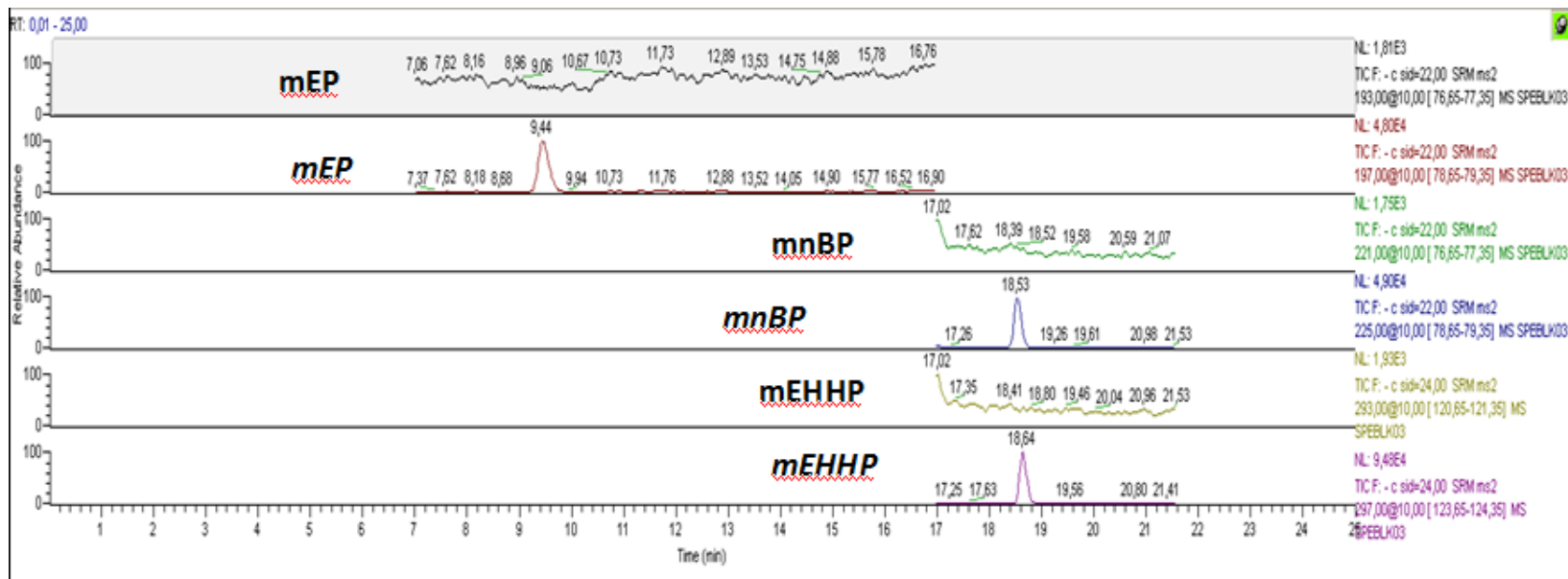
- Επίπεδα ανακτήσεων και τυφλών δειγμάτων
- Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου
- Φαινόμενο μήτρας
- Επαναληψιμότητα
- Έλεγχος αξιοπιστίας κύκλων αναλύσεων
- Διεργαστηριακά Πειράματα

### 3.1. Επίπεδα ανακτήσεων και τυφλών δειγμάτων

Ένωση	Ανάκτηση % n=3 (100ng)	Ανάκτηση % n=3 (500ng)	Τυφλά δείγματα ng/mL (n=3)
mEP	62±6	84±3	Δ.Α.
mEHHP	67±2	85±4	Δ.Α.
mBP	76±4	80±3	Δ.Α.
mEOHP	72±2	80±3	Δ.Α.
mEHP	37±7	82±6	Δ.Α.
mNP	32±8	31±6	Δ.Α.
4-methylumbelliferrone	68±2	83±2	Δ.Α.

Δ.Α.: Δεν Ανιχνεύθηκε

# Τυπικό χρωματογράφημα τυφλού δείγματος



## 3.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου

Ένωση	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
mEP	1.4	4.6
mEHHP	4.2	13.4
mBP	6.3	20.0
mEOHP	2.7	8.6
mEHP	0.5	1.6
mNP	5.8	18.5

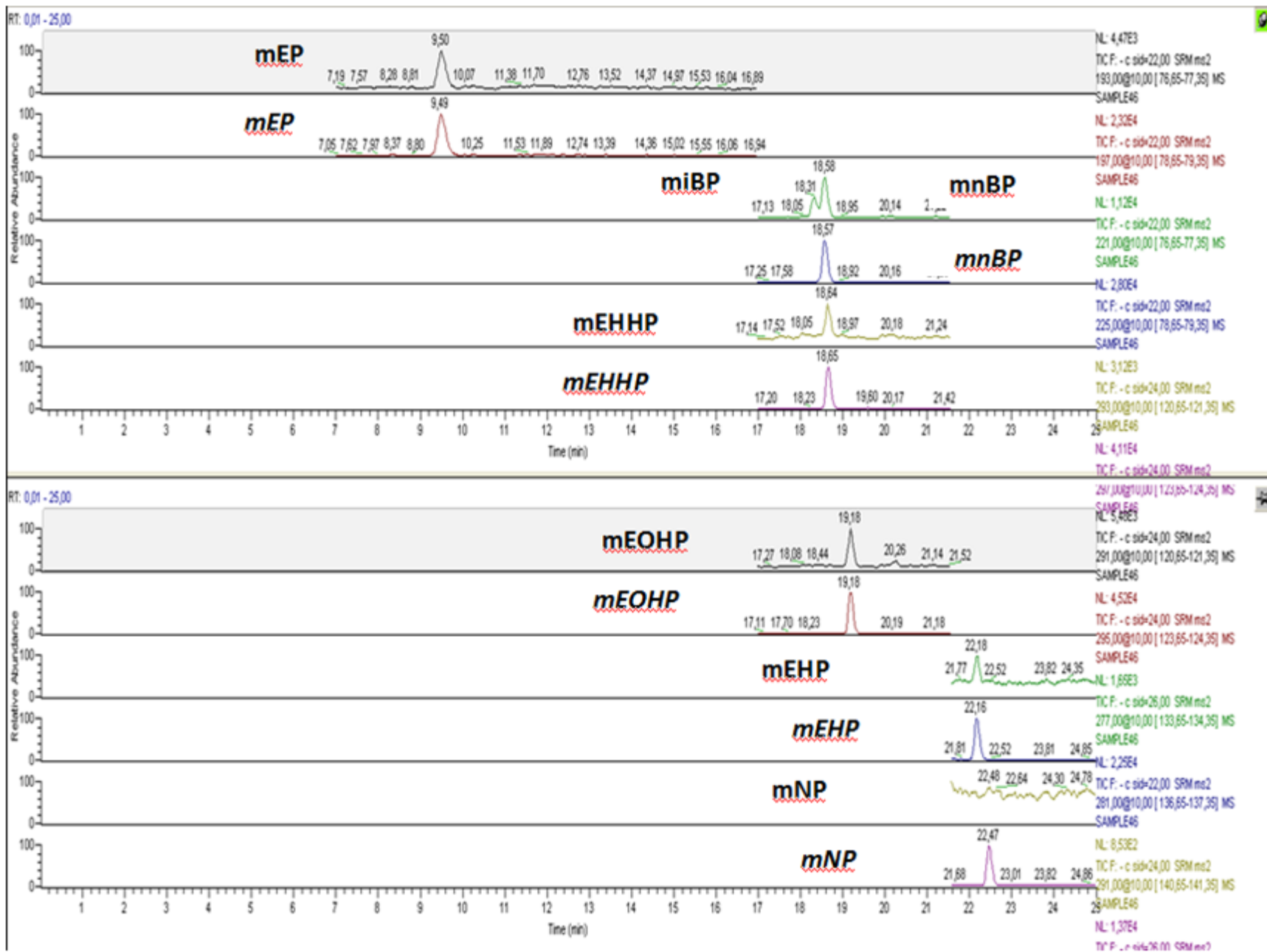
**LOD και LOQ μεθόδου:** LOD και LOQ οργάνου επί την ανάκτηση της διαδικασίας (από τη στιγμή που αρχικός και τελικός όγκος είναι ίσοι)

### Επαναληψιμότητα

- Δυο δείγματα αναλύθηκαν από τρεις φορές
- Σφάλμα <7% για όλους τους μεταβολίτες που ανιχνεύθηκαν



# Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα δείγματος

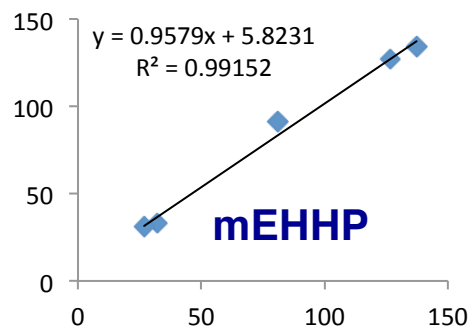
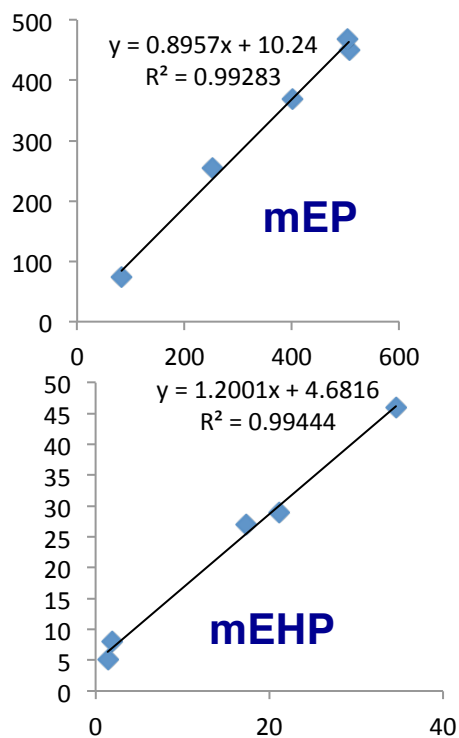


# Διεργαστηριακά πειράματα

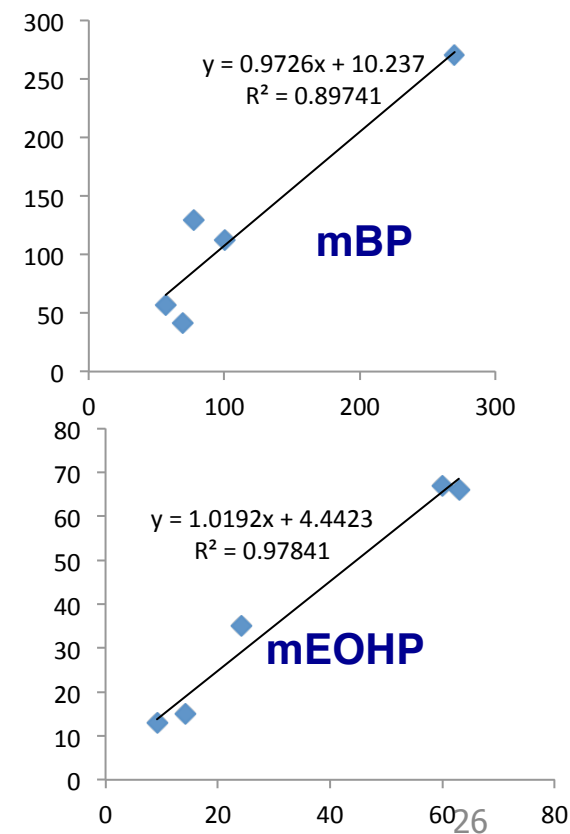
- G-EQUAS 46 (Πανεπιστήμιο Erlangen, Γερμανία): mBP

ng/mL	Δείγμα A	Δείγμα B
ECPL	48.1	204.9
G-EQUAS 46	44.4	203.0

- Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Lund, Σουηδία: 5 μεταβολίτες



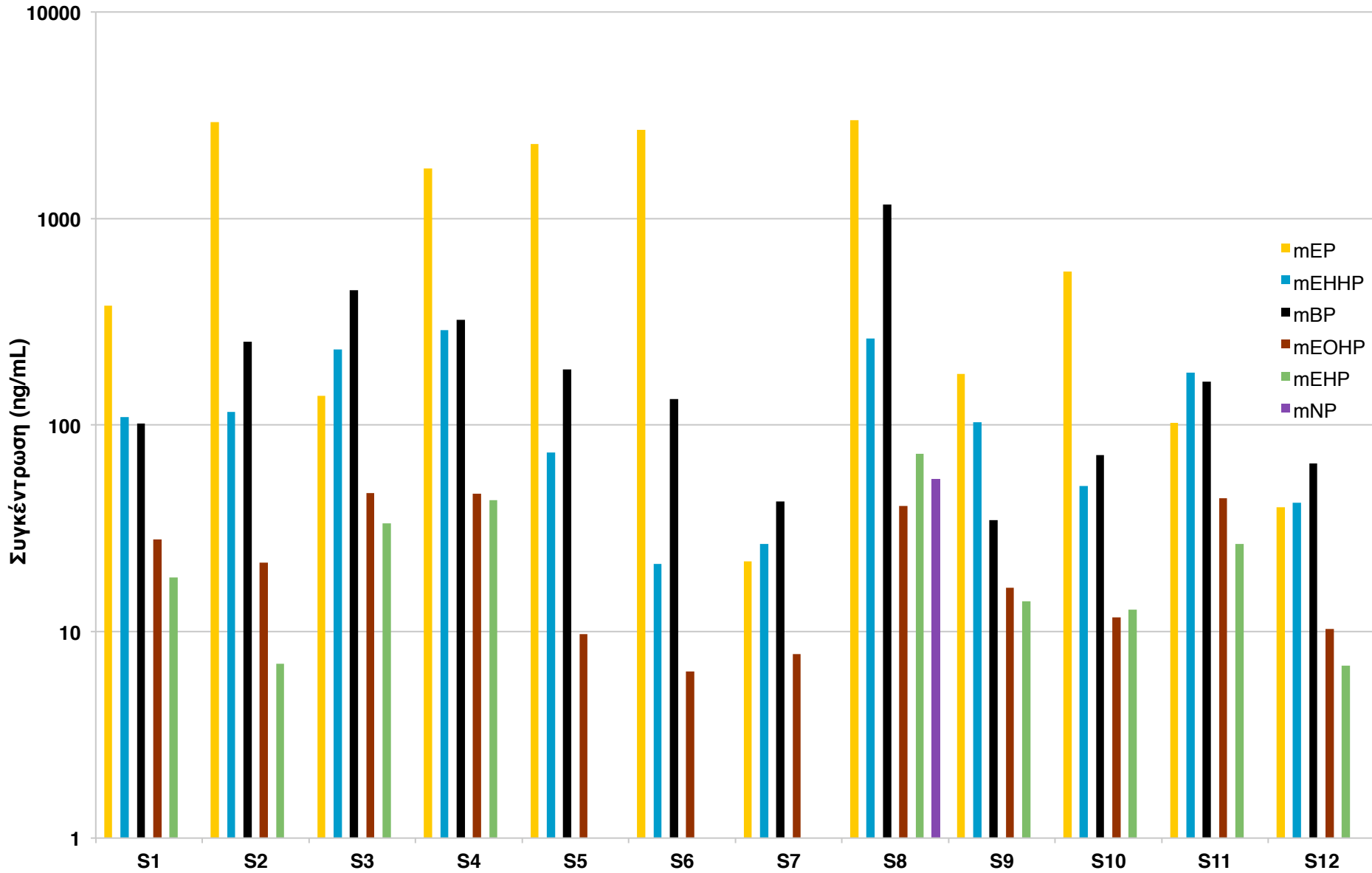
γ άξονας: Ε.ΠΕ.ΧΗ.ΔΙ.  
x άξονας: Lund



# Συγκεντρώσεις ολικών μεταβολιτών σε 24 δείγματα από έγκυες (ng/mL)

Μεταβολίτης	Μέσος Όρος	Διάμεσος	Γεωμετρικός μέσος	Νορβηγία Μ.Ο.	Ολλανδία Γ.Μ.	Η.Π.Α. Μ.Ο.	Γερμανία Δ.
mEP	709	196	227	310.0	112.0	968.45	90.2
mEHP	155	64	76	21.88	14.3	33.56	46.8
mBP	184	74	102	41.12	43.2	39.72	181
mEOHP	48	24	28	21.55	15.0	26.9	36.5
mEHP	32	16	19	22.32	6.9	14.32	10.3
mNP	Ανιχνεύθηκε σε 2 δείγματα (55 και 23 ng/mL)			-	-	-	-

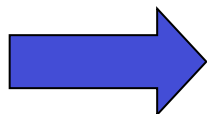
# Κατανομή ολικών μεταβολιτών σε 12 δείγματα



**Μελέτη της παρουσίας φθαλικών εστέρων  
σε εσωτερικούς χώρους με τη χρήση αέριας  
χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας  
(GC-MS)**

# Ανάλυση των φθαλικών εστέρων σε περιβαλλοντικά δείγματα

Καθαρισμός, ξήρανση  
και φύλαξη των αφρών  
πολυουρεθάνης



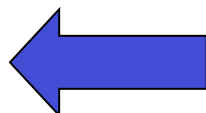
Δειγματοληψίες



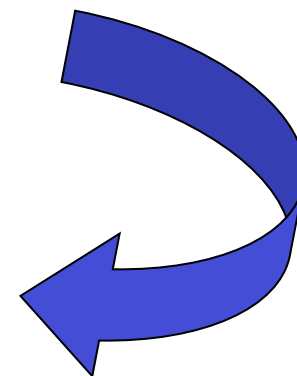
Επεξεργασία  
Δειγμάτων



Επεξεργασία  
αποτελεσμάτων



Ανάλυση σε σύστημα αέριας  
χρωματογραφίας –  
φασματομετρίας μάζας



# Χημική επεξεργασία δειγμάτων

Απομάκρυνση των PUF από την κατάψυξη – θερμοκρασία δωματίου

Προσθήκη του προτύπου ανάκτησης DEHP-d4 (30μl)

1 εκχύλιση



1mL



Rotavapor R-200, BUCHI



ASE300, Dionex



Ήπια ροή N<sub>2</sub>

500μl

Προσθήκη του εσωτερικού προτύπου benzyl benzoate (15ul)



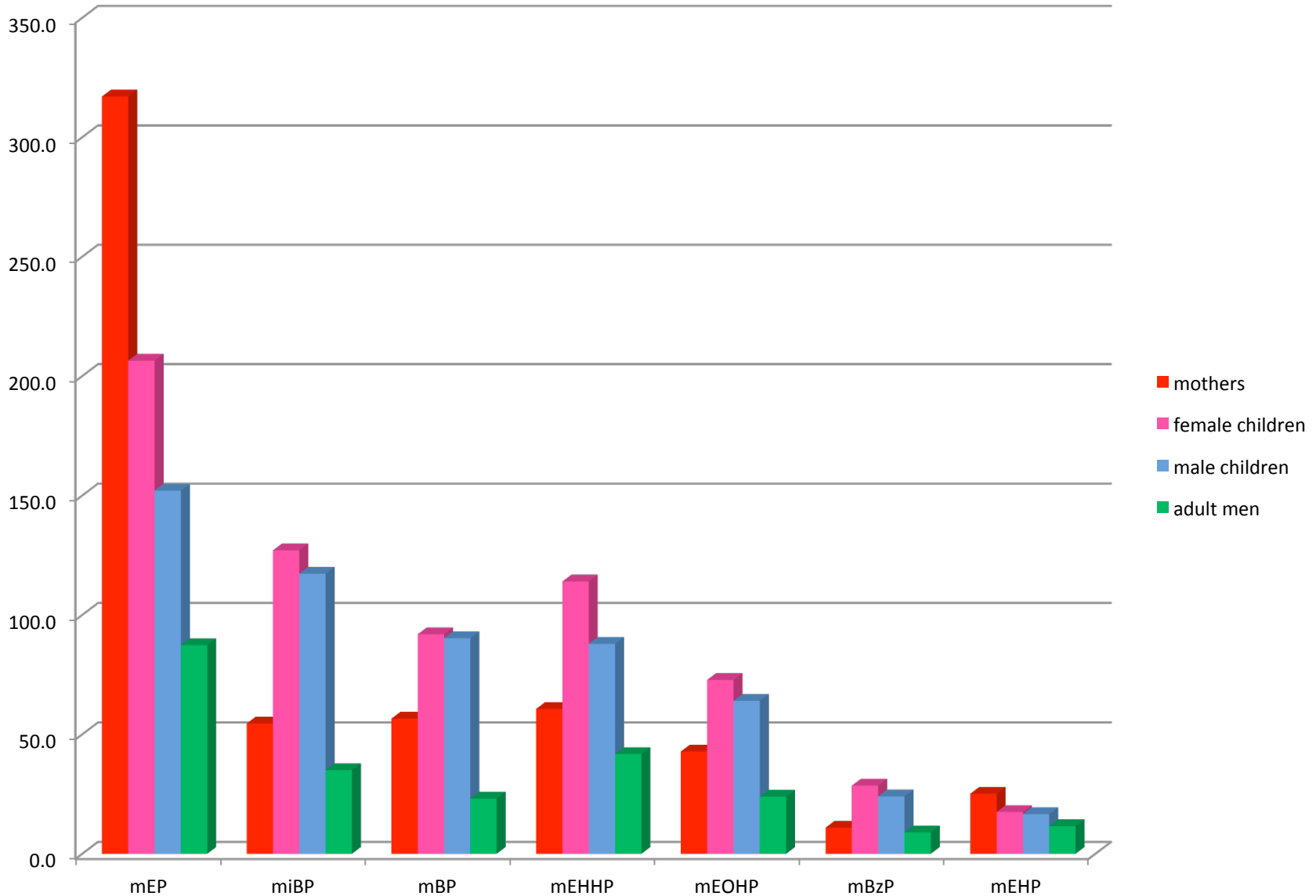
GC-MS (6890N/MSD 5973)

**Δείγματα σκόνης:** 0,2g δείγμα, φίλτρα κυτταρίνης, μικροστήλη με εκχυλισμένο βαμβάκι και καθαρό Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

# Τελικά αποτελέσματα



# Σύγκριση επιπέδων έκθεσης Μητέρες-Κορίτσια-Αγόρια-Άνδρες (κανονικοποιημένες τιμές με creatinine, $\mu\text{g/g}$ )



# Μονοπάτι έκθεσης

