



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA

Metodi analitici per la determinazione e caratterizzazione di interferenti endocrini nel sangue cordonale

Relatore: Prof. Marco Roverso

Laureanda: Matilde Salvadoretti
1199627

Anno Accademico 2021/2022

ABSTRACT

Gli interferenti endocrini (IE) sono un'ampia ed eterogenea categoria di sostanze chimiche di sintesi, presenti in bassa concentrazione in molti prodotti e oggetti di uso quotidiano.

Queste molecole, inoltre, sono note per causare effetti negativi per la salute umana, degli animali e dell'ambiente in generale.

Per questo motivo è importante identificarli e misurare accuratamente la loro distribuzione e i relativi livelli di concentrazione nelle matrici biologiche umane, come il sangue cordonale. Per fare ciò vengono usati metodi analitici specifici di pretrattamento e analisi del campione. Il pretrattamento del campione viene fatto principalmente mediante estrazione liquido-liquido e estrazione in fase solida, mentre la cromatografia e la spettrometria di massa sono le tecniche di analisi principalmente utilizzate, vista l'elevata selettività e sensibilità.

Endocrine disruptors (EDs) are a large and heterogeneous category of synthetic chemicals, found in low concentrations in many everyday products and objects.

Furthermore, these molecules are known to cause negative effects on human health, animals and the environment in general.

For this reason it is important to identify them and accurately measure their distribution and relative concentration levels in biological human matrices, such as umbilical cord blood. In order to do this, specific analytical methods of sample pretreatment and analysis are used. The sample pretreatment takes place mainly through liquid-liquid extraction and solid phase extraction, while chromatography and mass spectrometry are the most widely used analysis techniques, given the high selectivity and sensitivity.

INDICE

1. INTRODUZIONE	pag. 7
1.1. Definizione di interferenti endocrini	
1.2. Tipi di interferenti endocrini	
1.3. Meccanismo di azione e effetti sull'uomo	
2. GLI INTERFERENTI ENDOCRINI NEL SANGUE CORDONALE E SCOPO DELLA TESI.....	pag. 11
3. METODI ANALITICI	pag. 13
3.1. Metodi analitici per la determinazione dei composti fenolici	
3.2. Metodi analitici per la determinazione dei bisfenoli e dei loro metaboliti	
3.3. Metodi analitici per la determinazione dei perclorati	
3.4. Metodi analitici per la determinazione degli ftalati	
3.5. Metodi analitici per la determinazione degli inquinanti organici persistenti	
4. CONCLUSIONI	pag.34
5. BIBLIOGRAFIA	pag. 35

1. INTRODUZIONE

1.1. DEFINIZIONE DI INTERFERENTI ENDOCRINI

Gli interferenti endocrini (IE), conosciuti anche con il termine inglese *endocrine disrupting chemicals* (EDCs), sono un ampio ed eterogeneo gruppo di molecole potenzialmente dannose per la salute umana. Infatti interferiscono con il sistema endocrino e con la normale regolazione ormonale degli esseri viventi [1].

Nel dettaglio, gli IE sono stati definiti per la prima volta nel 1995 come “agenti esogeni che interferiscono con la produzione, il rilascio, il trasporto, il metabolismo, il legame, l'azione o l'eliminazione degli ormoni naturali dell'organismo responsabili del mantenimento dell'omeostasi e la regolazione dei processi di sviluppo ...” (EPA, 1995) [2].

Successivamente sono stati meglio descritti come “una vasta categoria di molecole e/o miscele di sostanze che alterano la normale funzionalità ormonale dell'apparato endocrino, causando effetti avversi sulla salute di un organismo, della sua progenie o di una popolazione o sottopopolazione dello stesso” (*European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife*, 2-4 Dicembre, 1996, Weybridge) [3].

1.2. TIPI DI INTERFERENTI ENDOCRINI

I principali interferenti endocrini sono xenoestrogeni, ovvero xenoormoni che imitano gli estrogeni naturalmente prodotti dall'organismo. Gli interferenti endocrini si possono categorizzare in base al loro utilizzo o in base alle loro proprietà strutturali e chimiche [4].

Generalmente sono presenti in formulati fitosanitari, in vari materiali di contatto alimentare e altri materiali di uso comune come prodotti per bambini, ritardanti di fiamma, plastiche, prodotti cosmetici, strumenti elettronici, prodotti per la cura personale, materiali per la

costruzione e prodotti di igiene. Gli IE, inoltre, non vengono spesso dichiarati nelle liste dei composti chimici di produzione diventando, quindi, fonte di grande preoccupazione per il possibile rilascio nell'ambiente di queste sostanze. Di conseguenza, la popolazione può facilmente venirvi a contatto attraverso l'aria per inalazione, mediante l'ingestione di acqua e cibo contaminati, o più raramente attraverso il contatto cutaneo.

È stimato che circa 800 sostanze abbiano azione di interferenti del sistema endocrino [5], anche se la lista rimane in continuo aggiornamento [6].

Le principali categorie di interferenti endocrini e i loro utilizzi sono descritti in Tabella 1.

Tabella 1: principali classi di IE con relativo utilizzo.

IE	Principali utilizzi
<p align="center">Composti fenolici</p>	<p>Usati come precursori di detergenti, come additivi per carburanti e lubrificanti, come polimeri e componenti nelle resine fenoliche. Sono anche sfruttati nella produzione di fragranze, elastomeri termoplastici, antiossidanti, prodotti chimici per giacimenti petroliferi, materiali ignifughi, pneumatici, adesivi, rivestimenti, carta autocopiante e prodotti in gomma ad alte prestazioni.</p>
<p align="center">Bisfenoli</p> <ul style="list-style-type: none"> - Bisfenolo A (BPA) - Bisfenolo F (BPF) - Bisfenolo S (BPS) 	<p>Usati nella produzione di plastiche, sono presenti in bottiglie, contenitori per alimenti, carta termica degli scontrini, rivestimenti di lattine e dispositivi medici.</p>
<p align="center">Perclorati</p>	<p>Usati principalmente come ossidanti e combustibili nella pirotecnica. I suoi sali sono usati nei dispositivi gonfianti degli airbag, nei tubi elettronici, negli oli lubrificanti, nella concia delle pelli, nella galvanica, nella raffinazione dell'alluminio, nella produzione di vernici e smalti, negli erbicidi, nei fertilizzanti e negli</p>

	sbiancanti.
Ftalati	Usati negli imballaggi e nella lavorazione degli alimenti, nei rivestimenti farmaceutici, plastica in PVC, materiali da costruzione, dispositivi medici e prodotti cosmetici.
Inquinanti organici persistenti (POPs) - Diossine - Dicloropentiltricloroetano (DDT) - Idrocarburi aromatici policiclici (PHAs) - Bifenili policlorurati (PCBs) - Difenileteri polibromurati (PBDE) - Composti perfluorinati (PFC) - Composti perfluorinalchilici (PFAS)	Usati nei pesticidi, insetticidi, combustibili e inceneritori. Sono prodotti dalla combustione dei rifiuti e dallo sbiancamento della carta. Prodotte principalmente nel primo stadio della combustione dei rifiuti. Usato come pesticida. Usati nei refrigeranti e nei lubrificanti industriali. Usati nei ritardanti di fiamma, nelle custodie di plastica di televisori e computer, nei prodotti di elettronica, nei tappeti, negli impianti di illuminazione, nella biancheria da letto, nell'abbigliamento, in componenti di automobili, cuscini in schiuma e altri tessuti. Si trovano nelle polveri, nell'aria, nelle acque e negli alimenti contaminati da sostanze contenenti perfluorocarburi. Recentemente sono stati individuati anche nelle acque superficiali, nel mare, nelle acque potabili. Usati nei prodotti per la cura personale, nelle vernici, nei lucidanti, nelle pentole antiaderenti e nelle schiume antincendio [7].

1.3. MECCANISMO DI AZIONE E EFFETTI SULL'UOMO

Il sistema endocrino è un insieme di tessuti interconnessi tra loro responsabile di moltissimi processi vitali in un organismo. Questo agisce mediante la produzione di ormoni, ovvero molecole con funzione di messaggeri che devono raggiungere attraverso il sistema circolatorio un determinato organo bersaglio o tessuto.

Gli interferenti endocrini agiscono a basse concentrazioni e sono in grado di interferire con le funzionalità degli ormoni, alterando l'omeostasi del sistema endocrino e generando problemi per la salute degli organismi esposti [8].

La *The Endocrine Society* individua come principali patologie derivanti dall'esposizione a IE l'obesità, il diabete, tumori ormono-sensibili, cancro alla prostata, patologie riguardanti la riproduzione maschile e femminile, patologie tiroidee, dello sviluppo neurologico e neuroendocrino [9].

Gli IE non sono generalmente responsabili di effetti di tossicità acuta, visto anche i bassi livelli a cui sono normalmente presenti. Tuttavia, essendo molecole per lo più idrofobiche tendono ad accumularsi nel tessuto adiposo o in organi strutturalmente ricchi nella componente lipidica (es. cervello). Questo può provocare tossicità cronica, con effetti a lungo termine osservabili anche dopo molto tempo dall'esposizione.

2. GLI INTERFERENTI ENDOCRINI NEL SANGUE CORDONALE E SCOPO DELLA TESI

Poiché gli interferenti endocrini sono ampiamente diffusi nell'ambiente e nei materiali di uso quotidiano, vari studi riportano livelli di IE rilevabili nel sangue e/o nelle urine umane. Quindi, considerando donne gravide, queste sostanze possono essere trasmesse dalla madre al feto attraverso la placenta o attraverso l'allattamento, facendo in modo che il bambino sia indirettamente esposto a queste sostanze tramite la madre [10]. Infatti gli IE, essendo sostanze altamente lipofile, si accumulano nelle riserve di grasso del corpo. Queste riserve vengono mobilitate per soddisfare la grande richiesta energetica dell'organismo durante la gravidanza, rilasciando nel flusso sanguigno le sostanze in esse contenute.

Il periodo prenatale è uno dei momenti più importanti nello sviluppo dei mammiferi e rappresenta uno dei "periodi finestra" in cui l'attività delle sostanze che agiscono da interferenti del sistema endocrino si esplica maggiormente. Infatti, il feto è molto più sensibile alle tossine ambientali rispetto agli adulti a causa del fatto che le sue vie metaboliche sono ancora immature. Gli IE agiscono interferendo con i processi di metilazione del DNA, lasciando un segno indelebile sul genoma umano trasmissibile alle generazioni avvenire [11].

La misura dei livelli di concentrazione degli IE nel sangue cordonale dei neonati è uno dei numerosi metodi per determinare l'esposizione intrauterina del feto a queste sostanze chimiche.

Lo scopo di questa tesi è, dunque, quello di individuare i metodi analitici più efficaci per la determinazione e l'analisi delle principali categorie di interferenti endocrini nei campioni di

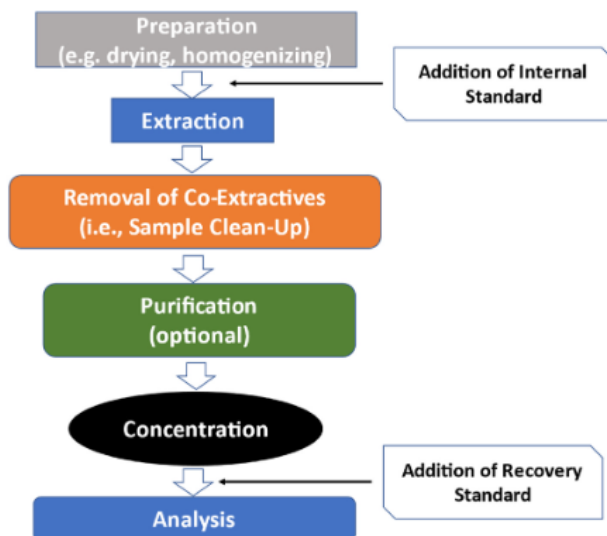
sangue, in particolare prelevati dal cordone ombelicale. La conoscenza di questi metodi è fondamentale per l'identificazione e la quantificazione di queste sostanze nelle matrici biologiche umane, con l'obiettivo della prevenzione e del trattamento dei possibili effetti dannosi che gli IE hanno sulla salute della madre e del feto.

3. METODI ANALITICI

A causa dell'impatto negativo che gli interferenti endocrini hanno sulla salute dell'uomo risulta importante sviluppare metodi analitici di preparazione, concentrazione e analisi del campione che siano in grado di determinare la presenza e di misurare accuratamente la concentrazione di queste sostanze nelle matrici biologiche umane. È noto, però, che questi contaminanti subiscono numerose bio-variazioni come risultato dell'attività metabolica e della loro naturale degradazione. Per questo motivo è necessario l'uso di metodi analitici in grado di determinare, non solo il composto chimico di partenza, ma anche i potenziali metaboliti e altri prodotti di degradazione.

Lo schema generale di procedure da seguire dalla preparazione del campione biologico fino all'analisi è quello riportato in Figura 1.

Figura 1: schema generale di procedure da seguire dalla preparazione del campione biologico fino all'analisi



Il passaggio fondamentale del processo analitico è la preparazione del campione, che ha lo scopo di separare gli analiti dalla matrice; in questo primo passaggio è solitamente

opportuno aggiungere lo standard interno (IS) per la successiva valutazione delle performance del metodo e correzione di eventuali errori procedurali, effetto matrice, recupero e riproducibilità del metodo stesso. Questo espediente, infatti, permette di compensare gli errori derivanti dalla perdita di analita durante le fasi di trattamento e di analisi del campione, assumendo che lo standard interno si comporti in modo analogo all'analita e che, quindi, subisca una perdita analoga. Permette inoltre di tenere conto dell'effetto matrice causato dalla possibile interferenza di sostanze coestratte con l'analita. Successivamente, seguono le ulteriori, sebbene non sempre necessarie, fasi di purificazione del campione, preconcentrazione e analisi. Queste permettono di rimuovere sostanze interferenti con la rivelazione dell'analita, di arricchire il campione fino ad ottenere concentrazioni rilevabili e di avere un solvente adatto per l'analisi strumentale. Le tecniche di preconcentrazione maggiormente usate sono l'estrazione in fase solida (SPE) e l'estrazione liquido-liquido (LLE).

Per l'analisi degli IE nelle matrici biologiche umane i metodi analitici più comuni sono la gascromatografia (GC) e la cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa. In questo modo gli analiti di interesse sono identificati in base al loro tempo di ritenzione caratteristico e allo spettro di massa. I cromatografi sono accoppiati con diversi tipi di sorgenti di ionizzazione e gli ioni che si vengono a formare sono determinati e quantificati in modalità full scan (MS), tandem (MS/MS), *single ion monitoring* (SIM) o *multiple reaction monitoring* (MRM).

Nella scelta della tecnica analitica bisogna tenere in considerazione il tipo di analita da determinare, della matrice disponibile e della sua complessità e della bassissima concentrazione di queste sostanze nei campioni biologici [12].

Prima di iniziare con la procedura di preparazione del campione e con la sua analisi è, però, necessario verificare che nei solventi, nell'acqua e nelle apparecchiature usate non

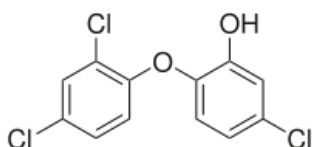
siano già presenti contaminazioni degli analiti stessi, eseguendo un'analisi preliminare del bianco.

3.1. METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEGLI INTERFERENTI ENDOCRINI FENOLICI

Gli interferenti endocrini fenolici sono una famiglia di composti organici ottenuti dall'alchilazione del fenolo con alcheni.

Esistono vari tipi di alchilfenoli che differiscono tra loro per la diversa catena alchilica che li compone e per la sua posizione. Un noto interferente endocrino fenolico è il Triclosano (5-cloro-2-(2,4-diclorofenossi)fenolo) che è un derivato triclorurato del fenolo. Viene usato in molti saponi, dentifrici e prodotti per l'igiene orale con azione di antibatterico, antisettico e battericida. La sua struttura è quella riportata in Figura 2.

Figura 2: formula di struttura del Triclosano



In Tabella 2 sono riportati i principali metodi analitici per la determinazione degli IE fenolici nel sangue.

Tabella 2: principali metodi analitici per la determinazione degli IE fenolici nel sangue

Campione	Analita cercato	Metodo di preparazione del campione	Tecnica di analisi usata	LOD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Refs.
Sangue	4-n-Butilfenolo	Centrifugazione + SPE	GC-MS	0.05	65-120	<15	[10]

	4-n-Pentilfenolo 4-n-Esilfenolo 4-t-Ottilfenolo 4-n-Eptilfenolo Nonilfenolo 4-n-Ottilfenolo Bisfenolo A	(cartucce IST ISOLUTE C18) + derivatizzazione + IS	colonna DB- 1 (lunghezza 30 m, diametro interno 0.32 mm e spessore film interno 0.25 µm)				
--	---	--	--	--	--	--	--

Uno studio della *University Malaya Medical Centre* (UMMC) in Malesia ha permesso di determinare la presenza di otto interferenti endocrini fenolici in 180 campioni di sangue cordonale.

In questo studio il sangue è stato centrifugato in modo tale da separarne il plasma. Il metodo di estrazione usato è stato l'estrazione in fase solida usando come eluente diclorometano e acetato di etile (1:1). Sono state, quindi, effettuate numerose misure del bianco con le stesse modalità utilizzate per il campione ed i risultati ottenuti mostrano l'assenza di analita nel bianco. La derivatizzazione è stata fatta usando BSTFA. Per eliminare l'errore di iniezione è stato aggiunto uno standard interno costituito da una miscela di fenantrene-d10, naftalene-d8 e pirene-d10. L'analisi quantitativa è stata fatta mediante gascromatografia accoppiata con spettrometria di massa in modalità *single ion monitoring* (SIM) con rivelatore a quadrupolo.

Il metodo analitico è stato validato mediante la valutazione del recupero, ricavato per comparazione dei risultati ottenuti con quelli dello standard. Tramite la valutazione del recupero è possibile stimare l'errore sistematico che affligge il metodo analitico e determinarne l'accuratezza. Infatti l'accuratezza (o *recovery*) di un metodo determina quanto è vicino il valore ottenuto nell'analisi alla concentrazione nominale dell'analita in

considerazione. Perché il metodo usato sia considerato accurato la concentrazione ottenuta non deve differire per più del 15% dal valore nominale dell'analita [13].

Gli elevati valori di *recovery* (65-120%) ottenuti dimostrano la validità della tecnica usata.

Risulta importante notare che il noliifenolo ha avuto un recupero superiore al 200%.

Questo è attribuibile alla presenza nel siero di sostanze interferenti con tempi di ritenzione simili a quello del nonilfenolo.

Il coefficiente di correlazione (RSD), valutato mediante estrazioni effettuate nella stessa giornata e in giornate diverse, è stato minore del 15%, dimostrando l'alta precisione del metodo di estrazione usato. Mediante la valutazione del coefficiente di correlazione è possibile determinare la precisione del metodo analitico usato. Perché un metodo analitico sia considerato preciso il valore di RSD ottenuto deve essere minore del 15%.

Gli alchilfenoli determinati in questo studio e le rispettive concentrazioni sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3: concentrazioni ottenute per ciascun analita

Analita	Concentrazione
Noliifenolo	Non determinabile-15.17 ng/mL
Bisfenolo A	Non determinabile-4.05 ng/mL
a-n-ottilfenolo	Non determinabile-4.17 ng/mL
2-t-ottilfenolo	Non determinabile-1.15 ng/mL
4-n-butilfenolo	Non determinabile-0.80 ng/mL
4-n-esilfenolo	Non determinabile-0.54 ng/mL

Dai risultati ottenuti si nota anche che il bisfenolo A e il noliifenolo sono stati determinati in più dell'80% dei campioni, mentre il 4-n-ottilfenolo nel 53%. Gli altri IE analizzati sono stati determinati in meno del 20% dei campioni.

Approssimativamente il 90% dei campioni analizzati ha presentato una concentrazione complessiva di IE fenolici bassa, inferiore a 4 ng/mL.

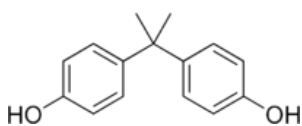
Rimangono sconosciuti gli effetti a lungo termine che possono generare queste sostanze a concentrazioni così basse, poiché gli studi tossicologici effettuati hanno analizzato gli effetti prodotti nell'organismo da concentrazioni 100 volte maggiori rispetto a quelle riscontrate in questo studio .

3.2. METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEI BISFENOLI E DEI LORO METABOLITI

I bisfenoli (BPs) sono un gruppo di molecole che possiedono due sostituenti fenolici.

Il bisfenolo A (BPA), noto anche come 2,2-bis(4-idrossifenil) propano, è un solido incolore, solubile nella maggior parte dei solventi organici e insolubile in acqua. La sua struttura molecolare è rappresentata in Figura 3.

Figura 3: formula di struttura del bisfenolo A



A causa del rischio sulla salute che provoca l'esposizione ai bisfenoli, quale il BPA, recenti normative ne hanno limitato l'utilizzo, mentre la regolamentazione riguardo l'uso di altri bisfenoli sostituitivi è ancora in fase di valutazione [14].

Il bisfenolo S (BPS) e il bisfenolo F (BPF) sono attualmente più diffusi perché vengono utilizzati al posto del BPA negli articoli "senza BPA", successivamente alle normative sviluppate contro l'utilizzo del BPA. Nonostante ciò queste sostanze condividono effetti

tossici simili, avendo attività simil-estrogenica. Le strutture del BPF e del BPS sono quelle rappresentate rispettivamente in Figura 4 e in Figura 5.

Figura 4: formula di struttura del bisfenolo S

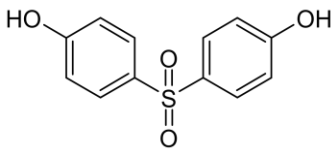
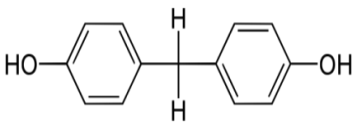


Figura 5: formula di struttura del bisfenolo F



Dopo l'ingresso nell'organismo, i bisfenoli sono metabolizzati come glucuronidi (BP-Gs) o come solfati (BP-Ss). L'analisi dei BP-Gs nelle matrici biologiche può, talvolta, essere preferita rispetto all'analisi dei BPs. Questo perché, al contrario dei BPs, i BP-Gs non sono presenti negli oggetti di uso quotidiano, di conseguenza i risultati ottenuti non vengono alterati dalla presenza di analita nelle attrezzature da laboratorio o nei reagenti.

I bisfenoli, al contrario di altri IE, non sono trattenuti dal tessuto adiposo, ma vengono eliminati dall'apparato escretore. Nonostante ciò la quantità di bisfenoli assunta supera la quantità eliminabile dall'organismo, e per ciò queste sostanze risultano comunque rilevabili nel sangue.

In Tabella 4 sono riportati i principali metodi analitici per la determinazione dei bisfenoli nel sangue.

Tabella 4: principali metodi analitici per la determinazione dei bisfenoli nel sangue

Campione	Analita cercato	Metodo di preparazione del campione	Tecnica di analisi usata	LOD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Refs.
Sangue	BPA	Centrifugazione	GC-MS/MS	0.026	Variabile	6.2-17.6	[15]

		+ deconiugazione enzimatica+ IS + LLE + due estrazioni SPE su cartucce in vetro (Envi- Florisol e Oasis HLB) precondizionate + derivatizzazione	con colonna capillare Zebron ZB- 5HT (30 m x 0.25 mm x 0.1 µm)		tra 65 e 88		
Sangue	BPA e BPA-G	Centrifugazione + deconiugazione enzimatica + IS + LLE + due estrazioni SPE su cartucce in vetro (Envi- Florisol e Oasis HLB) precondizionate + derivatizzazione	GC-MS/MS con colonna capillare Zebron ZB- 5HT (30 m x 0.25 mm x 0.1 µm)	0.026	-	-	[16]
Sangue	BPA e BPA-G BPF e BPF-G BPS e BPS-G	Centrifugazione + IS + estrazione SPE con cartuccia C8 + derivatizzazione	UHPLC- MS/MS con colonna Phenyl-Hexyl (2.1 m x100 mm x 1.7 µm),	0.025 0.023 0.038	106-115 93-105 103-111	3-18/4-18 2-17/5-20 3-13/4-13	[17]

In uno studio effettuato tra il 2004 e il 2005 dalla *McMaster University* in Ontario sono stati raccolti e analizzati 12 campioni di sangue cordonale per individuare e quantificare la presenza di BPA [15].

Il primo step di preparazione del campione è stata la centrifugazione del sangue per separarne il siero. Dopo la deconiugazione del BPA-G con β -glucuronidasi, è stato

aggiunto al campione $^{13}\text{C}_{12}$ BPA come standard interno. La deconiugazione enzimatica ha permesso di determinare, non solo la concentrazione di BPA libero, ma anche quella del BPA-glucuronide. Il BPA è stato estratto dalla matrice mediante estrazione liquido-liquido con diclorometano. Successivamente il campione è stato preconcentrato tramite estrazione in fase solida e derivatizzato con MSTFA. Il prodotto è stato, quindi, analizzato quantitativamente mediante gascromatografia accoppiata con spettrometria di massa in modalità MRM. L'iniezione del campione nel gascromatografo è avvenuta in modalità *splitless*, la ionizzazione è avvenuta per impatto elettronico e il rivelatore è stato un triplo quadrupolo.

I risultati ottenuti dalle analisi del bianco hanno mostrato livelli di analita compresi tra <0.026 e 0.083 ng/mL e tutti i risultati sono stati corretti per i rispettivi valori del bianco. La curva di calibrazione risulta lineare in un intervallo di concentrazioni compreso tra 1 ng/mL e 100 ng/mL, con un coefficiente di correlazione maggiore di 0.998. I valori del recupero (variabili tra 65% e 88%) sono stati stimati aggiungendo una quantità nota di BPA marcato con ^{13}C in campioni di siero. I coefficienti di variazione sono stati ricavati tramite otto diverse repliche delle analisi effettuate lo stesso giorno (RSD 6.2%) e in giorni diversi (RSD 17.6%) su campioni di siero. I valori di *recovery* ottenuti sono accettabili, così come la riproducibilità del metodo.

I risultati di questo studio mostrano valori di concentrazioni di BPA nei campioni di sangue cordonale analizzati variabili, da non rilevato a 2.57 ng/mL. I valori ottenuti dalle stesse analisi effettuate sul siero materno a metà gravidanza mostrano valori variabili, da non rilevato a 10.4 ng/mL e nel siero materno al momento del parto compresi tra non rilevato e 3.05 ng/mL.

A conferma della validità di questo metodo, la stessa tecnica analitica è stata applicata ad una coorte di 199 donne gravide canadesi tra il 2010 e il 2012 [16].

Dai risultati di questo studio si ricavano livelli di BPA e BPA-G nel sangue prelevato durante il primo trimestre di gravidanza quantificabili nel 33.9% e nel 43.4% dei casi rispettivamente, mentre nel sangue prelevato al momento del parto rispettivamente nel 20.5% e nel 69.9% dei campioni. La media della concentrazione del BPA nei 112 campioni di sangue cordonale che sono effettivamente stati analizzati è stata di 0.05 ng/mL, mentre per il BPA-G è stata di 0.08 ng/mL.

È possibile anche notare che il BPA libero è presente solo in una piccola frazione dei campioni di sangue analizzati e le concentrazioni ottenute nei campioni in cui esso è presente sono state solo di poco superiori al LOD. Questo conferma il fatto che il BPA sia metabolizzato dall'organismo come BPA-G.

Da questo studio è stato, inoltre, possibile ricavare che l'esposizione al BPA è stata limitata per questa coorte.

Non sono stati riportati i valori di RSD e *recovery* ottenuti, ma comunque il metodo analitico rimane verificato nello studio precedente.

In uno studio condotto tra il 2014 e il 2015 nel *Centre Hospitalier Universitaire* (CHU) a Toulouse in Francia sono stati raccolti e analizzati campioni di sangue cordonale di 44 donne per determinare la presenza di BPs (in particolare BPA, BPF e BPS) attraverso la determinazione dei loro metaboliti glucuronidi (BPA-G, BPF-G e BPS-G) [17]. Questo è stato reso possibile dal fatto che i BPs sono metabolizzati dall'organismo come BP-Gs. Questi ultimi, anche se sono ritenuti privi di attività estrogenica, possono attraversare la placenta e riattivarsi alla loro forma originale e causando effetti avversi per il feto [18]. Dopo la centrifugazione dei campioni e l'aggiunta di uno standard interno (BPS-Gd₈ e BPA-G ¹³C₁₂), i BP-Gs sono stati estratti dalla matrice mediante estrazione in fase solida. Successivamente al preconditionamento delle cartucce HR-XAW, l'eluizione è avvenuta con metanolo (1% NH₃). Il campione è stato, quindi, derivatizzato con l'aggiunta di cloruro

di dansile, in modo tale da ottenere una migliore ionizzazione dell'analita. È stato scelto il dansilcloruro come agente derivatizzante perché permette di ottenere buoni segnali analitici, facilitando la rivelazione dell'analita. La tecnica di analisi usata è stata la UHPLC con rivelazione a spettrometria di massa. Lo spettrometro di massa ha operato in modalità MRM. Il metodo di ionizzazione usato è stato la ionizzazione per *electrospray* e il rivelatore degli ioni è stato un triplo quadrupolo.

La curva di calibrazione è stata ottenuta mediante l'analisi del BPA-G, BPF-G e del BPS-G a concentrazioni variabili da 0.05 ng/mL a 5.0 ng/mL con BPS-Gd₈ e BPA-G ¹³C₁₂ come standard interno.

Per quanto riguarda le performance del metodo, sono stati ottenuti valori di *recovery* alti, variabili da 106% a 115% per il BPA-G, da 103% a 111% per il BPS-G e da 93% a 105% per il BPF-G. Il recupero e l'effetto matrice sono stati valutati comparando i fattori di risposta ottenuti per una soluzione composta dal bianco del plasma iniettato con BP-Gs (5 ng/mL) e standard interno dopo l'estrazione con quelli ottenuti per una soluzione composta dal solvente iniettato con BP-Gs (5 ng/mL) e IS e con quelli del plasma iniettato con BP-Gs (5ng/mL) prima dell'estrazione. Anche la riproducibilità delle misure è stata ottimale, visti i valori di RSD ottenuti inferiori al 20%. In particolare i valori ottenuti per il BPA-G sono stati variabili da 3% a 18% *intra-day* e da 4% a 18% *inter-day*, per il BPF-G sono stati variabili da 2% a 17% *intra-day* e da 5% a 20% *inter-day* e per il BPS-G sono stati variabili da 3% a 13% *intra-day* e da 4% a 13% *inter-day*. Questi valori sono stati calcolati in tre giorni diversi con cinque diverse ripetute a tre diverse concentrazioni dei campioni di controllo qualità, comprese nell'intervallo coperto dalla curva di calibrazione. I valori riportati sono riferiti alla concentrazione minore (0.05 ng/mL).

Dai risultati di questo studio si ricava che il BPF-G non è stato rilevato in nessuno dei campioni. Tuttavia il BPA-G e il BPS-G sono stati rivelati rispettivamente nel 41% nel 45%

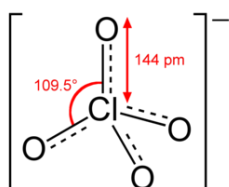
dei campioni analizzati, con valori di concentrazione che vanno rispettivamente da non determinabile a 0.089 ng/mL e da non determinabile a 0.586 ng/mL.

I bassi limiti di rilevabilità raggiunti con questo metodo hanno permesso di individuare BPA-G e BPS-G in quasi la metà dei campioni analizzati, indicando una diffusa esposizione in periodo gestazionale al BPA e al BPS.

3.3. METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEI PERCLORATI

Il perclorato (ClO_4^-) è un anione inorganico del cloro in stato di ossidazione +VII. La sua formula di struttura è quella riportata in Figura 6.

Figura 6: formula di struttura del perclorato



In Tabella 5 sono riportati i principali metodi analitici per la determinazione dei perclorati nel sangue.

Tabella 5: principali metodi analitici per la determinazione dei perclorati nel sangue

Campione	Analita cercato	Metodo di preparazione del campione	Tecnica di analisi usata	LOD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Refs.
Sangue	ClO_4^-	IS + centrifugazione	LC-MS/MS colonna IonPac AS-21 (2 mm x 250 mm)	0.004	99	10	[19]
Sangue	ClO_4^-	IS +	LC-MS/MS	0.15	100	-	[19]

		centrifugazione	colonna IonPac AS- 21 (2 mm x 250 mm)				
Sangue	ClO ₄ ⁻	Centrifugazione + IS + filtrazione e centrifugazione	HPLC- MS/MS colonna Athena C18-WP (4.6 mm x 150 mm x 3 µm)	0.06	91-104	9-12	[20]

Il primo metodo analitico per la determinazione del perclorato prevede l'aggiunta di uno standard interno (solitamente ¹⁸O₄-perclorato) al campione. Il pretrattamento del campione è stato fatto mediante centrifugazione, in modo tale da separare il siero. Il metodo di analisi usato è la cromatografia liquida accoppiata con spettrometria di massa in modalità *multiple reaction monitoring* (MRM) e ionizzazione per *electrospray* [19].

Lo stesso metodo analitico è stato applicato in uno studio approvato dalla *Institutional Review Board of Sun Yat-sen University* in Cina per determinare la presenza di perclorati nel sangue [20].

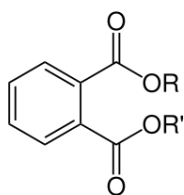
Come nel caso precedente, è stato possibile tenere conto dell'effetto matrice mediante l'aggiunta di una soluzione standard di ¹⁸O₄-perclorato e valutando successivamente l'area del picco cromatografico del perclorato marcato in matrice rispetto al picco ottenuto contaminando con il perclorato marcato alla stessa concentrazione un bianco procedurale. L'effetto matrice è stato considerato trascurabile in questo studio. L'analisi quantitativa del perclorato è stata fatta mediante un apparato di HPLC con rivelazione a spettrometria di massa in modalità *multiple reaction monitoring* (MRM) e dotato di analizzatore a triplo quadrupolo. La ionizzazione è avvenuta per *electrospray*.

Il coefficiente di linearità ottenuto dalla retta di calibrazione è stato maggiore di 0.99 in un intervallo di concentrazioni compreso tra 0.1 e 100 ng/mL. Il recupero è stato valutato usando il bianco del sangue fortificato con soluzioni a concentrazioni di 1, 5 e 10 ng/mL di perclorato e IS (5 ng/mL). La riproducibilità è stata valutata *intra-day* (3 misurazioni) e *inter-day* (9 misurazioni) mediante analisi condotte alle stesse condizioni operative e dallo stesso operatore su miscele a diverse concentrazioni di perclorato (1, 5 e 10 ng/mL). I valori di *recovery* (91-104%) e di RSD (9-12%) ottenuti sono soddisfacenti per la validazione di questo metodo.

3.4. METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEGLI FTALATI

Gli ftalati sono esteri dell'acido ftalico e si ottengono generalmente per reazione dell'anidride ftalica con un eccesso di etanolo in ambiente acido. La loro struttura generale è rappresentata in Figura 7.

Figura 7: formula di struttura generale degli ftalati



In Tabella 6 sono riportati i principali metodi analitici per la determinazione degli ftalati nel sangue.

Tabella 6: principali metodi analitici per la determinazione degli ftalati nel sangue

Campione	Analita cercato	Metodo di preparazione del	Tecnica di analisi	LOD (ng/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Refs.

		campione	usata				
Sangue	MiNP MHiNP MOiNP MCiOP	Centrifugazione + pH corretto a 6.5 + deconiugazione enzimatica + Off- line SPE (Strata XL, 200 mg, 3 mL, eluizione con aceto nitrile e acetato di etile)	HPLC- MS/MS	0.1-0.38	88-102	4-14	[19] [21]
Sangue	DMP DEP DMEP DBP DEEP DIBP DPP BMPP DBEP DCHP DNHP BBP DEHP DNOP DNP	Centrifugazione + IS + LLE	GC-MS	0.06 0.09 0.11 0.06 0.04 0.04 0.05 0.25 0.31 0.05 0.05 0.15 0.06 0.08 0.13	74.70 85.35 90.01 76.74 81.66 87.32 93.85 92.13 88.84 91.86 80.56 87.75 79.32 92.07 92.59	-	[22]

Per l'analisi e la determinazione del mono-isononil ftalato (MiNP), mono-idrossiisononil ftalato (MHiNP), mono-ossoisononil ftalato (MOiNP) e del mono-carbossiisononil ftalato (MCiOP) nel sangue il pH è stato tamponato a 6.5 usando una soluzione tampone di acetato di ammonio [21]. Successivamente alla centrifugazione, la deconiugazione enzimatica è avvenuta con β -glucuronidasi. Questi ftalati sono stati estratti dalle matrici biologiche mediante estrazione in fase solida e sono stati determinati tramite HPLC accoppiata con rivelatore a spettrometria di massa. La tecnica di ionizzazione usata è

stata la ionizzazione per *electrospray* e lo spettrometro di massa ha operato in modalità MRM.

La valutazione del grado di recupero è stata fatta mediante cinque misure ripetute del bianco del solvente, del bianco campione e del bianco campione arricchito con soluzioni degli ftalati nativi (in concentrazioni di 5, 10 e 50 ng/mL). Per la valutazione del coefficiente di variazione sono stati analizzati due bianchi del solvente, due bianchi campione e due bianchi campione arricchiti con soluzioni degli ftalati in concentrazioni di 5 ng/mL e 50 ng/mL rispettivamente. Dai valori di *recovery* (88-102%) e dal coefficiente di variazione ottenuti (4-14%) è stato possibile confermare la validità di questa tecnica.

In uno studio cinese effettuato tra il 2011 e il 2012, approvato dalla *Ethics Committee of the Third Military Medical University*, sono stati prelevati campioni di sangue cordonale da 207 donne ricoverate all'ospedale *Southwest Hospital* a Chongqing in Cina [22].

Dopo la centrifugazione dei campioni di sangue, è stato aggiunto al siero ricavato uno standard interno costituito da una miscela di 15 ftalati. Gli analiti sono stati estratti dalla matrice mediante estrazione liquido-liquido. In particolare sono state fatte due estrazioni con esano:MTBE (1:1) e una solo con esano. Per monitorare l'effetto matrice, assieme ad ogni campione di sangue, sono state eseguite anche due misure del bianco (acqua ultrapura) e due misure del bianco contenente lo standard di calibrazione. Infine, l'estratto è stato analizzato mediante gascromatografia con rivelazione a spettrometria di massa.

I risultati di questo studio hanno evidenziato la presenza di 15 diversi ftalati nei campioni di sangue cordonale analizzati. Inoltre, in ogni campione sono stati rilevati livelli di DBP, DIBP e DEHP.

Le concentrazioni medie ottenute per ogni ftalato sono quelle riportate in Tabella 7.

Tabella 7: concentrazioni medie ottenute per ciascun analita

Analita	Concentrazione media
Dimetil ftalato (DMP)	6.69 ng/mL
Dietil ftalato (DET)	8.99 ng/mL
Bis(2-metossietil) ftalato (DMEP)	8.11 ng/mL
Dibutil ftalato (DBP)	68.14 ng/mL
Bis(2-etossietil) ftalato (DEEP)	32.96 ng/mL
Diisobutil ftalato (DIBP)	31.34 ng/mL
Dipropil ftalato (DPP)	26.64 ng/mL
Bis(4-metil-2-pentil) ftalato (BMPP)	11.81 ng/mL
Bis(2-n-butossietil) ftalato (DBEP)	53.51 ng/mL
Dicloroesil ftalato (DCHP)	125.02 ng/mL
Diesil ftalato (DNHP)	8.08 ng/mL
Benzilbutil ftalato (BBP)	22.55 ng/mL
Bis(2-etilesil) ftalato (DHEP)	187.16 ng/mL
Di-n-ottil ftalato (DNOP)	27.66 ng/mL
Dinolil ftalato (DNP)	13.42 ng/mL

Dai valori di *recovery* ottenuti (74.70-93.85%) è stato possibile confermare la validità e l'accuratezza del metodo usato per determinare gli ftalati nel sangue .

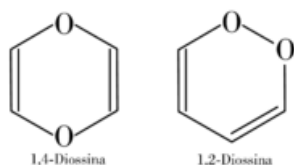
Da questo studio, inoltre, è stato possibile ricavare che tutti gli ftalati tranne DCHP sono positivamente associati alla diminuzione del periodo gestazionale e ad un parto pre-termine. Inoltre, l'esposizione agli ftalati in gravidanza è associata alla diminuzione dei parametri di crescita del feto, potenzialmente dovuta alla diminuzione del periodo gestazionale.

3.5. METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DEGLI INQUINANTI ORGANICI PERSISTENTI (POPs)

Gli inquinanti organici persistenti (POPs) sono prodotti chimici di origine sintetica che persistono nell'ambiente e che si accumulano negli organismi viventi. Questa vasta categoria di sostanze include:

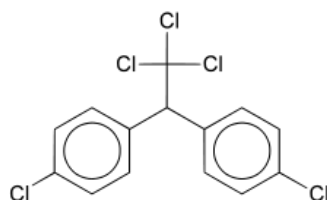
- **Diossine:** classe di composti aromatici eterociclici con formula bruta $C_4H_4O_2$. Esistono due possibili isomeri di posizione: la 1,2-diossina e la 1,4-diossina. La loro formula di struttura è riportata in Figura 8.

Figura 8: formula di struttura della 1,4-diossina e della 1,2-diossina



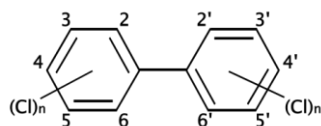
- **DDT:** il diclorodifeniltricloroetano (DDT) è un noto pesticida conosciuto storicamente per il suo negativo impatto ambientale. La sua struttura è quella riportata in Figura 9.

Figura 9: formula di struttura del DDT



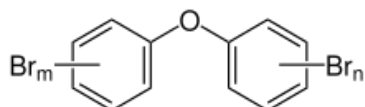
- **Bifenili policlorurati (PCB):** sono una classe di composti clorurati derivati dal bifenile ($C_{12}H_{10}$). La struttura generale è quella riportata in Figura 10.

Figura 10: formula di struttura generale dei difenili policlorurati



- Difenileteri polibromurati (PBDE): sono una classe di composti strutturalmente molto simili ai PCB. La struttura generale è quella riportata in Figura 11.

Figura 11: formula di struttura generale dei difenileteri polibromurati



- Composti perfluorinati (PFC): sono una vasta categoria di sostanze in cui tutti i legami carbonio-idrogeno sono sostituiti da legami carbonio-fluoro [23]. Tra questi troviamo le sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) che sono fluoruri alchilici dotati di proprietà tensioattive. Due esempi di PFAS sono l'acido perfluorooottanosolfonico (PFOS) e acido perfluorooottanoico (PFOA o noto anche come C8).

In Tabella 8 sono riportati i principali metodi analitici per la determinazione dei POPs nel sangue.

Tabella 8: principali metodi analitici per la determinazione dei POPs nel sangue

Campione usato	Analita cercato	Metodo di preparazione del campione	Tecnica di analisi usata	LOD (pg/mL)	Recovery (%)	RSD (%)	Refs.
Sangue	POPs	Centrifugazione + IS + denaturazione	GC-MS con colonna DB-XLB (lunghezza 60	0.05-0.3	68-90	1.2-8.3/2.8-13	[24]

		delle proteine + LLE + SPE	m, diametro interno di 0.25 mm e spessore del film di 0.25 µm)				
--	--	-------------------------------	---	--	--	--	--

In questo studio canadese sono state misurate le concentrazioni di vari inquinanti organici persistenti (POPs) in campioni di sangue cordonale e di plasma materno prelevato durante il primo trimestre di gravidanza, appartenenti a 1983 donne coinvolte nel progetto *Maternal-Infant Research on Environmental Chemicals* (MIREC) [24].

In questo studio sono stati determinati 24 bifenili policlorurati, 14 pesticidi organoclorurati, 9 difenileteri polibromurati e vari PFAS come il perfluorotanno sulfonato (PFOS), l'acido perfluorotannoico (PFOA) e il perfluoroesano sulfonato (PFHxS).

Il metodo analitico usato prevede la centrifugazione dei campioni di sangue, l'arricchimento di ciascun campione con uno standard interno e la denaturazione delle proteine presenti. L'estrazione dei POPs dalla matrice organica è stata fatta sfruttando la tecnica dell'estrazione liquido-liquido con esano. Successivamente l'estratto è stato ulteriormente purificato mediante estrazione in fase solida. Le varie sostanze sono state determinate e quantificate con la tecnica della gascromatografia accoppiata con spettrometria di massa. La modalità di iniezione usata è stata la modalità *splitless*. Lo spettrometro ha operato in modalità *selected ion monitoring* (SIM), sfruttando come metodo di ionizzazione la ionizzazione chimica (NCI) e utilizzando metano come gas di reazione.

Questo metodo ha permesso di ottenere buoni valori di *recovery* (68-90%) e di RSD (1.2-8.3% *intra-day* e 2.8-13% *inter-day*) che confermano l'efficacia della tecnica usata.

In questo studio sono state individuate concentrazioni significative di POPs in più del 90% dei campioni di plasma materno analizzati, mentre le concentrazioni nei campioni di sangue cordonale sono state di gran lunga inferiori. I PFAS sono stati la categoria di POP

maggiormente presente nei campioni di sangue cordonale (individuati nel 23-64% dei campioni).

4. CONCLUSIONI

L'essere umano è esposto agli interferenti endocrini sin dai momenti che precedono la nascita. Infatti queste sostanze sono estremamente presenti nell'ambiente e negli oggetti di uso quotidiano e sono facilmente trasmesse dalla madre al feto attraverso il cordone ombelicale e la placenta.

Dalla scoperta del rischio dovuto all'esposizione agli interferenti endocrini è stato necessario individuare metodi analitici che permettano la determinazione qualitativa e quantitativa di queste sostanze nei campioni biologici. Data la complessità delle matrici biologiche da analizzare è stato necessario sfruttare anche metodi di pretrattamento e preconcentrazione del campione, utili a portare l'analita nella forma più opportuna per la successiva analisi. La cromatografia e la spettrometria di massa rimangono le tecniche analitiche più usate per la loro elevata precisione e selettività, poiché permettono di raggiungere limiti di quantificazione dell'ordine dei ng/mL, buoni livelli di *recovery* e di ripetibilità.

5. BIBLIOGRAFIA

1. <https://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/endocrine-active-substances>; accesso in rete 04/08/2022
2. RahmanKabir, E; SharfinRahman, M; Rahman, I; *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2015**, 40, 241-258
3. http://www.iehconsulting.co.uk/IEH_Consulting/IEHCPubs/EndocrineDisrupters/WEYBRIDGE.pdf accesso in rete 04/08/2022, *European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, 2-4 Dicembre 1996*, Weybridge
4. Casals-Casas, C; Desvergne, B; *Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption* **2015**, 73, 135-162
5. Rolfo, A; Nuzzo, A.M; De Amicis, R; Moretti, L; Bertoli, S; Leone, A; *Fetal–Maternal Exposure to Endocrine Disruptors: Correlation with Diet Intake and Pregnancy Outcomes* **2020**, 12
6. <https://edlists.org/>; ultimo accesso in rete 04/09/2022
7. Metcalfe, C.D; Bayen, S; Desrosiers, M; Muñoz, G; Sauvé, S; Yargeau, V; *Methods for the analysis of endocrine disrupting chemicals in selected environmental matrixes*, *Environmental Research* **2022**, 206
8. Street, ME; Angelini, S; Bernasconi, S; Burgio, E; Cassio, A; Catellani, C; Cirillo, F; Deodati, A; Fabbrizi, E; Fanos, V; Gargano, G; Grossi, E; Iughetti, L; Lazzeroni, P; Mantovani, A; Migliore, L; Palanza, P; Panzica, G; Papini, AM; Parmigiani, S; Predieri, B; Sartori, C; Tridenti, G; Amarri, S; *Current Knowledge on Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs) from Animal Biology to Humans*,

- from Pregnancy to Adulthood: Highlights from a National Italian Meeting*, Int J Mol Sci, **2018**, 19(6), 1647
9. Diamanti-Kandarakis, E; Bourguignon, J.P; Giudice, L.C; Hauser, R; Prins, G.S; Soto, A.M; Zoeller, R.T; Gore, A.C; *Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement*, Endocrine Reviews, **2009**, 30, 293–342,
 10. Tan, B; Ali Mohd, M; *Analysis of selected pesticides and alkylphenols in human cord blood by gas chromatograph-mass spectrometer* **2003**, 61, 385-391
 11. Lughetti, L; Lucaccioni, L; Bernasconi, S; Predieri, B; *Endocrinologia pediatrica Effetti degli interferenti endocrini su crescita e sviluppo puberale* **2019**, 49, 245-254
 12. Sosa-Ferrera, Z; Mahugo-Santana, C; Santana-Rodríguez, J; *Analytical Methodologies for the Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Biological and Environmental Samples* **2013**, volume 2013
 13. Moosavi, S.M; Ghassabian, S; *Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: a Review of Criteria for Assessment of Method Reliability*, **2018**, 6, 109-127
 14. <https://echa.europa.eu/it/hot-topics/bisphenols>; ultimo accesso in rete 04/09/2022
 15. Kosarac, I; Kubwabo, C; Lalonde, K; Foster, W; *A novel method for the quantitative determination of free and conjugated bisphenol A in human maternal and umbilical cord blood serum using a two-step solid phase extraction and gas chromatography/tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography **2012**, 898, 90-94
 16. Foster, W; Kubwabo, C; Kosarac, I; Gregorovich, S; Aryal, G; Coleman, K; *Free bisphenol A (BPA), BPA-Glucuronide (BPA-G), and total BPA concentrations in*

maternal serum and urine during pregnancy and umbelicar cord blood at delivery **2019**, 5, 279-287

17. Gély, C.A; Huesca, A; Picard-Hagen, N; Toutain, P.L; Berrebi, A; Gauderat, G; Gayrard, V; Lacroix, M.Z; *A new LC/MS method for specific determination of human systemic exposure to bisphenol A, F and S through their metabolites: Application to cord blood samples*, *Environment International* **2021**, 151
18. Balakrishnan, B; Henare, K; Thorstensen, E.B; Ponnampalam, A.P; Mitchell, M.D; *Transfer of bisphenol A across the human placenta*, **2010**, 202, 393.e1-393.e7
19. Dirtu, A.C; Van den Eede, N; Malarvannan, G; Ionas, A.C; Covaci, A; *Analytical methods for selected emerging contaminants in human matrices - a review* **2012**, 404, 2555-2581
20. Song, S; Ruan, J; Bai, X; Xie, L; Zhang, B; He, Y; Zhang, T; *One-step sample processing method for the determination of perchlorate in human urine, whole blood and breast milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry*, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, 174, 175-180
21. Frederiksen, H; Jørgensen, N; Andersson, A.M; *Correlations Between Phthalate Metabolites in Urine, Serum, and Seminal Plasma from Young Danish Men Determined by Isotope Dilution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*, *Journal of Analytical Toxicology*, **2010**, 34, 400–410
22. Huang, Y; Li, J; Garcia, J; Lin, H; Wang, Y; Yan, P; Wang, L; Tan, Y; Luo, J; Qiu, Z; Chen, J; Shu, J; *Phtalate Levels in Cord Blood Are Associated with Preterm Delivery and fetal Growth Parameters in Chinese Women* **2014**
23. Lei, M; Zhang, L; Lei, J; Zong, L; Wu, J; Wang, Z; *Overview of Emerging Contaminants and Associated Human Health Effects* **2015**, Volume 2015

24. Fisher, M; Arbuckle, T.E; Liang, C.L. *et al.*; *Concentrations of persistent organic pollutants in maternal and cord blood from the maternal-infant research on environmental chemicals (MIREC) cohort study* **2016**, 15, 59