

# DETECCIÓ DELS METABÒLITS DEL PLASTIFICANT DI(2-ETILHEXIL) FTALAT COM A MARCADORS DE L'ÚS DE TRANSFUSIONS EN L'ESPORT

Núria Monfort Mercader

---

TESI DOCTORAL UPF / 2012

DIRECTORA DE LA TESI

Dra. Rosa Ventura Alemany

Grup de Recerca en Bioanàlisi i Serveis Analítics, Programa de  
Recerca en Neurociències, IMIM, Institut Hospital del Mar  
d'Investigacions Mèdiques







## Agraïments

Són moltes les persones a qui cal agrair aquest treball. El meu agraïment més sincer a tothom qui m'ha acompanyat durant la realització d'aquesta tesi.

El meu primer agraïment és per la Dra. Rosa Ventura, Directora de la tesi, pel suport, l'ajuda i el coneixement científic que m'ha transmès durant aquests anys. Gràcies Rosa per donar-me l'oportunitat de treballar en aquest projecte d'investigació i de formar part de l'equip del Laboratori de Control Antidopatge.

Gràcies, molt especialment, al Dr. Jordi Segura, Director del Laboratori de Control Antidopatge, per la seva confiança i permetre'm participar en el projecte dels "ftalats". El seu ull crític i experiència científica han estat vitals per aquesta tesi i m'acompanyaran al llarg de la meva carrera professional.

Al Dr. Rafael de la Torre i a tot el Grup de Recerca en Neurociències de l'Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM) que dirigeix.

Gràcies, gràcies i gràcies a tots els companys del Grup de Bionàlisi per l'ajuda i suport rebut en tot moment que m'han fet més fàcil el camí per realitzar aquesta tesi. Gràcies per poder aprendre de tots i cadascun de vosaltres i pels bons moments que compartim al laboratori, al despatx, als esmorzars i dinars i també fora de l'IMIM.

A la Dra. Meritxell Roig, pels ànims, els bons consells i l'ajuda rebuda durant aquesta tesi i durant la feina del dia a dia. Gràcies Txell.

A la Georgina Balcells per l'optimisme transmès en tot moment a més de per la bona feina feta.

Gràcies a la Dra. Ana Latorre per la seva ajuda i col·laboració en el projecte.

Agrair la col·laboració del Grup d'Assaigs Clínics de l'IMIM, així com l'ajuda de la Dra. Mercè López i de la Sra. Montserrat Bosch per la col·lecció de les mostres d'orina. A més, agrair a la Dra. Viviana Belalcazar el treball realitzat durant aquesta etapa.

Al Center for Preventive Doping Research (Colònia, Alemanya), al Ruhr Plasma Center Bochum (Bochum, Alemanya) i a la Dra. Petra Platen pel disseny de l'estudi de transfusió autòloga d'eritròcits i per la col·lecció de les mostres.

A la Cristina, la Juliane, la Miriam i en Sergi per l'ajuda rebuda en diferents etapes del projecte.

Agrair el finançament rebut per part de la World Antidoping Agency (WADA).

Finalment, gràcies a la meua família pels valors i l'exemple que m'han donat al llarg de la meua vida i per tu, Jordi, que no tinc paraules per agrair-t'ho. Gràcies de tot cor!!!

## Índex

Resum i abstract.....	xi
Prefaci.....	xv
Acrònims i abreviatures.....	xvii
Estructura de la tesi.....	xxi

### **CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ.....1**

1.1 Control antidopatge i transfusions sanguínies.....	3
1.1.1 Dopatge.....	3
1.1.2 Dopatge sanguini.....	5
1.1.3 Transfusions i rendiment esportiu.....	6
1.1.4 Detecció de l'ús de transfusions.....	9
1.2 Di(2-etilhexil) ftalat (DEHP).....	13
1.2.1 Plàstics i clorur de polivinil (PVC).....	13
1.2.2 DEHP.....	14
1.2.3 Metabolisme del DEHP.....	17
1.2.4 Exposició al DEHP.....	19
1.2.5 Nivells poblacionals.....	20
1.2.6 Poblacions altament exposades.....	31
1.2.7 Toxicitat.....	38
1.2.8 Legislació i salut pública.....	39
1.2.9 Alternatives al PVC.....	40
1.2.10 Detecció dels metabòlits del DEHP en fluids biològics.....	42
1.3 Referències bibliogràfiques.....	51

### **CAPÍTOL 2. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS.....77**

### **CAPÍTOL 3. DESENVOLUPAMENT I VALIDACIÓ DEL MÈTODE D'ANÀLISI DE CINQ METABÒLITS DE DEHP EN ORINA PER CL-EM/EM.....81**

3.1 Introducció.....	83
3.2 Material i mètodes.....	85
3.2.1 Material i reactius.....	85
3.2.2 Substàncies de referència.....	85
3.2.3 Preparació de les solucions.....	86
3.2.4 Preparació de la mostra.....	86
3.2.5 Anàlisi instrumental.....	87
3.2.6 Validació del mètode.....	88
3.3 Resultats i discussió.....	90

3.4 Conclusions.....	100
3.5. Referències bibliogràfiques.....	101

**CAPITOL 4. METABÒLITS DE DEHP EN ORINA D'ATLETES COM A MÈTODE DE CRIBATGE DE L'ÚS IL·LÍCIT DE DOPATGE SANGUINI: ESTUDI COMPARATIU AMB PACIENTS SOTMESOS A TRANSFUSIONS SANGUÍNIES.....105**

Monfort, N., Ventura, R., Latorre, A., Belalcazar, V., López, M., Segura, J. (2009). Urinary di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in athletes as screening measure for illicit blood doping: a comparison study with patients receiving blood transfusion. *Transfusion*. 50(1), 145-149.....107

**CAPÍTOL 5. PLASTIFICANTS EXCRETATS EN ORINA: INDICI DE L'ÚS DE TRANSFUSIONS DE SANG AUTÒLOGA EN L'ESPORT.....113**

**5.1. ESTUDI DELS METABÒLITS MEHP, MEHHP I MEOHP.....115**

Monfort, N., Ventura, R., Platen, P., Hinrichs, T., Brixius, K., Schänzer, W., Thevis, M., Geyer, H., Segura, J. (2012). Plasticizers excreted in urine, indication of autologous blood transfusion in sports. *Transfusion* 52, 647-657.....117

**5.2. ESTUDI DELS METABÒLITS 5cx-MEPP I 2cx-MMHP.....129**

5.2.1 Introducció.....	131
5.2.2 Material i mètodes.....	131
5.2.3 Resultats i discussió.....	132
5.2.4 Conclusions.....	142
5.2.5 Referències bibliogràfiques.....	145

**CAPÍTOL 6. CONCENTRACIONS DE METABÒLITS DE DEHP EN ORINA DE DIFERENTS TIPUS DE POBLACIONS.....147**

6.1 Introducció.....	149
6.2 Material i mètodes.....	150
6.2.1 Material i reactius.....	150
6.2.2 Mostres analitzades.....	150



6.2.3 Preparació de la mostra.....	151
6.2.4 Anàlisi instrumental.....	151
6.2.5 Càlculs i anàlisi estadístic.....	151
6.3 Resultats i discussió.....	152
6.3.1 Concentracions en orina de diferents tipus de poblacions.....	152
6.3.2 Límits de referència per als metabòlits del DEHP.....	154
6.3.3 Metabòlits del DEHP com a marcadors de l'ús de transfusions; avantatges i inconvenients.....	157
6.4. Conclusions.....	158
6.5. Referències bibliogràfiques.....	159

**CAPÍTOL 7. CONCLUSIONS.....161**

**ANNEXES:.....167**

<b>ANNEX I:</b> Publicacions relacionades.....	169
<b>ANNEX II:</b> Llistat de substàncies prohibides de la WADA 2012.....	197
<b>ANNEX III:</b> XIII Premio Nacional de Investigación en Medicina del Deporte.....	207



## **Resum**

El di(2-etilhexil) ftalat (DEHP) és un plastificant que s'afegeix als productes de clorur de polivinil (PVC) per a dotar-los de més flexibilitat. El material mèdic fet de PVC, i en particular els dispositius i bosses que s'utilitzen en les transfusions de sang, conté el DEHP com additiu. Així, el receptor d'una transfusió està altament exposat a aquest compost. L'objectiu de la tesi va ser estudiar els metabòlits del DEHP en orina com a possibles marcadors de la pràctica d'una transfusió de sang en l'esport.

Es va desenvolupar i validar un mètode d'anàlisi per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem per a la quantificació dels principals metabòlits del DEHP en orina humana: mono-(2-etilhexil) ftalat (MEHP), mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalat (MEOHP), mono-(2-carboximetilhexil) ftalat (2cx-MMHP) i mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalat (5cx-MEPP). El mètode es va aplicar a mostres procedents de voluntaris sans (grup control), de pacients hospitalitzats que havien rebut una transfusió de sang i de pacients hospitalitzats sotmesos a tractaments mèdics amb materials de PVC excloent transfusions. Es van obtenir diferències significatives en les concentracions dels tres metabòlits estudiats (MEHP, MEHHP, MEOHP) entre les mostres dels pacients transfosos respecte els altres dos grups de població. En canvi, no es van obtenir diferències significatives entre les mostres dels pacients sotmesos a tractaments mèdics diferents a les transfusions i les mostres del grup control. El mètode també es va aplicar a mostres d'orina de vint-i-cinc voluntaris sans que s'havien sotmès a un procediment d'autotransfusió. El protocol de transfusió seguit va permetre infondre'ls la sang després que estigués emmagatzemada 14 dies o 28 dies. Els nivells de cinc metabòlits del DEHP es van avaluar al llarg de diferents dies abans i després de la flebotomia i de la transfusió. Els resultats van indicar concentracions elevades dels metabòlits del DEHP en orina fins a les 48 hores després

d'haver rebut la sang. A més, les concentracions dels metabòlits tendien a ser més elevades quant més llarg era el temps d'emmagatzematge de la sang.

Finalment, es van determinar les concentracions dels cinc metabòlits de DEHP en una població d'esportistes i es van calcular límits de referència que permeten sospitar d'una transfusió. Els resultats indiquen que els metabòlits de DEHP en orina poden ser usats com a marcadors de l'ús de transfusions en l'esport.

## Abstract

The plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is used in polyvinyl chloride products (PVC) to increase its flexibility. Medical devices made of PVC, especially blood bags used in blood transfusions, contain DEHP as additive. Therefore, subjects submitted to blood transfusion are widely exposed to this compound. The aim of the project was to evaluate the DEHP metabolites in urine as possible markers of the use of a blood transfusion in sports.

An analytical method was developed and validated to quantify the main DEHP metabolites mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate (MEHHP), mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate (MEOHP), mono-(2-carboxymethylhexyl)phthalate (2cx-MMHP) and mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate (5cx-MEPP), in human urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The methodology was applied to samples belonging to healthy volunteers (control group), hospitalized patients subjected to blood transfusions and hospitalized patients subjected to medical treatments involving plastic material different to blood transfusions. Significant differences were obtained in the concentrations of the three metabolites studied (MEHP, MEHHP, MEOHP) between transfused patients samples' and samples from the other two population groups. However, no significant differences were obtained between hospitalized patients who didn't receive blood transfusions and the control group. The method was also applied to urine samples from twenty-five healthy volunteers who were subjected to an autologous blood transfusion protocol. The transfusion protocol allowed the blood reinfusion after 14 days and 28 days of storage. The levels of the five DEHP metabolites were evaluated along different days before and after the phlebotomy and the transfusion. The results indicated high concentrations of the DEHP metabolites in urine up to 48 hours after the blood transfusion.

Additionally, the metabolites concentrations tended to be higher after longer blood storage times.

Finally, the concentration of the five DEHP metabolites were evaluated in a sportsmen population, and reference limits to allow suspicion of blood transfusion have been calculated. The results indicate that the DEHP metabolites could be used as markers of blood transfusions in sports.

## **Prefaci**

La pràctica esportiva lliure de dopatge és un dels principals reptes del món de l'esport. Les diferents federacions esportives, els governs i l'Agència Mundial Antidopatge (AMA) fan un exhaustiu control per a perseguir l'ús de les substàncies dopants i així garantir un joc net i amb igualtat d'oportunitats.

Tot i la bona gestió i implicació de les diferents institucions i dels laboratoris antidopatge, la detecció de l'ús de certs mètodes i agents dopants és força complicada; és el cas, per exemple, del dopatge sanguini mitjançant l'ús de transfusions de sang. Es coneix que aquest tipus de dopatge s'utilitza en competicions d'alt nivell perquè després d'una transfusió el rendiment esportiu millora considerablement gràcies a què augmenta la quantitat d'oxigen transportat per la sang. A més, la pràctica de les transfusions de sang representa un risc per la salut del receptor, fet que afegeix un motiu més per a què el seu mal ús en l'àmbit esportiu estigui totalment prohibit.

Els laboratoris de control antidopatge disposen de metodologies, com la citometria de flux, per a detectar l'ús de les transfusions homòlogues. Pel que fa a la detecció de l'ús de les transfusions autòlogues, no hi ha actualment cap tècnica disponible.

L'objectiu principal d'aquesta tesi va ser desenvolupar un mètode analític fiable, senzill i eficaç que pugui ser aplicat en els laboratoris de manera rutinària per a la detecció de transfusions de sang.

Aquest treball avalua els metabòlits del di(2-etilhexil) ftalat (DEHP) com a possibles marcadors de l'ús de les transfusions en l'esport. El DEHP és un plastificant present a les bosses que s'usen per emmagatzemar la sang i, per tant, el receptor d'una transfusió hi està altament exposat.

Una dificultat important dels marcadors que es proposen és l'existència de nivells basals d'aquests metabòlits en l'orina de qualsevol subjecte degut a l'exposició ambiental.

Amb l'objectiu de quantificar les concentracions dels metabòlits de DEHP en l'orina, s'ha desenvolupat i validat un mètode per cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem.

Per poder avaluar l'existència de diferències en les concentracions dels metabòlits entre diferents tipus de poblacions, s'ha aplicat el mètode a orines procedents de persones sanes, pacients sotmesos a tractaments mèdics dins l'àmbit hospitalari i pacients que havien rebut transfusions de sang.

Amb la finalitat de corroborar les diferències en les concentracions obtingudes entre els subjectes transfosos i les persones sanes, el mètode s'ha aplicat a voluntaris sans que s'havien sotmès a una autotransfusió de sang de manera controlada. Amb aquest estudi s'ha dibuixat el perfil de concentracions dels metabòlits en orina durant dies abans i després del procés de la flebotomia i de la transfusió de la sang. A més a més, s'ha definit una finestra temporal després de la transfusió en la que durant unes hores les concentracions dels metabòlits de DEHP en orina pateixen un augment molt significatiu.

Per tal de determinar els nivells basals dels metabòlits en població sana que està sotmesa a una exposició ambiental comú a DEHP, també s'ha aplicat el mètode a orines procedents de les anàlisis de controls antidopatge esportius. Amb els resultats obtinguts s'han definit unes possibles concentracions de tall que permetrien sospitar de l'ús d'una transfusió.



## **Acrònims i abreviatures**

**ABP:** Athlete Biological Passport

**AMA:** Agència Mundial Antidopatge, World Antidoping Agency (WADA)

**APCI:** Ionització química a pressió atmosfèrica

**BTHC:** butiril-trihexil-citrat

**CE:** Comissió Europea

**CG:** Cromatografia de Gasos

**CI:** Control Inferior

**CL:** Cromatografia Líquida

**CL-EM/EM:** Cromatografia líquida acoblada a espectrometria de masses en tàndem

**COI:** Comitè Olímpic Internacional

**CPD:** Citrat-fosfat dextrosa

**CS:** Control Superior

**DEHA:** Dietilhexiladipat

**DEHP:** Di(2-etilhexil) ftalat

**DEP:** Dietil ftalat

**DiBP:** Di-isobutil ftalat

**DINCH:** Diisononil èster de l'àcid ciclohexanedicarboxílic

**EC:** European Commission

**ECMO:** Oxigenació per Membrana Extracorpòria

**EH:** 2-etilhexanol

**EM:** Espectrometria de Masses

**EM/EM:** Espectrometria de Masses en tàndem

**EPO:** Eritropoietina

**ESI:** Ionització en Electrospai

**EVA:** Etilvinilacetat

**Hb:** Concentració d'hemoglobina

**tHb:** Massa total d'hemoglobina

- Hct:** Hematòcrit
- IDT:** Ingesta Diària Tolerable
- ICC:** Intraclass Correlation Coefficient
- ISL:** Estàndards Internacionals
- ISTD:** Estàndard intern
- LD:** Límit de Detecció
- LQ:** Límit de Quantificació
- LR:** Límit Superior de Referència
- MCH:** Mean Corpuscular Haemoglobin (mitjana de la concentració d'Hb corpuscular)
- MCHC:** Mean Cell Haemoglobin Concentration (mitjana de la concentració d'Hb cel•lular)
- MCV:** Mean Cell Volume (mitjana del volum cel•lular)
- MEHP:** Mono-(2-etilhexil) ftalat
- MEHHP:** Mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalat
- MEOHP:** Mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalat
- 2cx-MMHP:** Mono-(2-carboximetilhexil) ftalat
- 5cx-MEPP:** Mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalat
- MRM:** Multiple Reaction Monitoring Mode
- NESP:** New Eritropoiesis-Stimulating Protein
- NOAEL:** Nivell sense efecte advers observat
- OFFhr:**  $([Hb]-60(\text{retic}\%))^{1/2}$
- PLT:** Recompte de plaquetes
- PU:** Poliuretans
- PVC:** Clorur de Polivinil
- RBC:** Red Blood Cells (eritròcits)
- Retic%:** Percentatge de reticulòcits
- Ret#:** Recompte de reticulòcits
- RBCHb / RetHb:** Contingut d'hemoglobina en la població d'eritròcits madurs dividit pel contingut d'hemoglobina en la població de reticulòcits

**rHuEPO:** Eritropoietina Recombinant Humana

**RP:** Fase Reversa

**RSD:** Desviació Estàndard Relativa

**SAGM:** Solució Salina-Adenina-Glucosa-Manitol

**SD:** Desviació Estàndard

**sEPO:** Eritropoietina del sèrum

**sTfR:** Transferrina del sèrum

**TEHTM:** Tri-(2etilhexil)trimelitat

**UE:** Unió Europea

**UPLC-EM/EM:** Cromatografia de líquids d'ultra precisió acoblada a espectrometria de masses en tàndem

**UCI:** Unitat de Cures Intensives

**UV:** Detector llum ultraviolada

**WBC:** White Blood Cell (recompte de leucòcits)



## **Estructura de la tesi**

Aquesta tesi està estructurada en diferents apartats: introducció, objectius, quatre capítols que contenen els resultats de la tesi, conclusions i annexes.

La introducció descriu el marc general i la situació actual dels diferents aspectes que es plantegen a la tesi. Així doncs, en una primera part de la introducció es descriu el dopatge sanguini utilitzat fraudulentament en l'esport. Per últim, es descriuen el di(2-etilhexil) ftalat (DEHP) i els seus metabòlits com a possibles marcadors de l'ús de transfusions.

Els capítols de la tesi que descriuen els resultats mantenen l'estructura d'una publicació científica. Alguns capítols contenen directament els articles publicats, altres es presenten en forma de memòria.

En el capítol 3 es descriu el desenvolupament, l'optimització i la validació d'una metodologia analítica per a la quantificació de cinc metabòlits de DEHP en orina per CL-EM/EM.

En el capítol 4 es presenten les concentracions d'alguns metabòlits del DEHP en orina de diferents poblacions: un grup control, un grup de pacients hospitalitzats subjectes a transfusions i un grup de pacients hospitalitzats sotmesos a tractaments mèdics que impliquen l'ús de materials plàstics.

En el capítol 5 es descriuen les concentracions dels cinc metabòlits de DEHP en mostres de 25 voluntaris sotmesos a una autotransfusió de sang.

En el capítol 6 es presenten les concentracions dels metabòlits de DEHP en mostres d'orina d'un grup control i d'un grup d'esportistes. A més, es proposen uns límits de referència que permetrien sospitar de l'ús de transfusions.

Les conclusions finals de la tesi es presenten en el setè capítol.

En l'apartat dels annexes queden recollides algunes informacions que complementen altres aspectes no descrits durant els diferents capítols de la tesi. En l'annex I es presenten tres publicacions científiques que contenen part del treball d'aquesta tesi; la primera correspon a un article científic acceptat per a la publicació després d'estar finalitzada aquesta memòria, que inclou els resultats corresponents als capítols tres i sis de la tesi; la segona és una còpia dels procedings de la comunicació oral presentada en un congrés internacional i la tercera correspon a un article de revisió dels diferents mètodes per a la detecció de transfusions autòlogues. L'annex II conté la llista, vigent durant el 2012, de les substàncies i mètodes prohibits per la WADA. L'annex III conté la menció al Premio Nacional de Investigación en Medicina del Deporte 2010 rebut per parts d'aquest treball.

## CAPÍTOL 1

---

### INTRODUCCIÓ





## **1.1 Control antidopatge i transfusions sanguínies**

### **1.1.1 Dopatge**

Es coneix com a dopatge el consum de substàncies o l'ús de mètodes prohibits en l'esport que milloren el rendiment de l'esportista de manera fraudulenta. Per tal de garantir les bones pràctiques a l'esport va ser necessari la creació de mecanismes de control que permetessin assegurar el desenvolupament d'un joc net i la igualtat d'oportunitats per tots els atletes.

Els primers controls antidopatge els va gestionar la Comissió Mèdica del Comitè Olímpic Internacional (COI) l'any 1967, però la tecnologia i els mètodes emprats per a la detecció de les substàncies prohibides van ser un factor força limitant en aquella època. El COI va liderar la lluita antidopatge durant molts anys fins que al 1999 va néixer l'Agència Mundial Antidopatge (AMA) coneguda internacionalment com World Antidoping Agency (WADA). L'AMA coordina el programa de control antidopatge i és l'organisme encarregat de regular i gestionar el Codi Mundial Antidopatge, els estàndards internacionals i els principis de bones pràctiques als laboratoris d'anàlisi.

El Codi Mundial Antidopatge defineix el dopatge com la violació d'una o més regles descrites als articles 2.1 al 2.8 del Codi. En resum, aquests articles defineixen el dopatge com la presència de substàncies prohibides, els seus metabòlits o marcadors en la mostra d'un esportista; l'ús o l'intent d'ús de substàncies o mètodes prohibits per part de l'esportista; la negativa a sotmetre's a un control antidopatge; la violació dels requisits aplicables en relació a la disponibilitat de l'atleta en els controls fora de competició; la manipulació o l'alteració de qualsevol part del control antidopatge; la possessió o el tràfic de substàncies i mètodes prohibits; l'administració o la incitació a ella de qualsevol substància o mètode prohibit a tercers i la de qualsevol violació del codi (WADA, 2009).

L'AMA actualitza anualment la llista de substàncies i mètodes prohibits (veure Annex II) en funció de les noves substàncies o mètodes usats i la seva disponibilitat al mercat. L'AMA distingeix entre aquelles substàncies que estan prohibides en competició, fora d'ella o en ambdós casos.

La llista conté les substàncies prohibides classificades per grups segons la seva funció farmacològica: agents anabolitzants, hormones peptídiques, factors de creixement i substàncies relacionades,  $\beta_2$  agonistes, hormones i moduladors metabòlics, diurètics i agents emmascarants, estimulants, narcòtics, cannabinoides, glucocorticosteroides, alcohol i  $\beta$ -blocadors.


Respecte als mètodes, estan prohibits aquells que augmenten el transport d'oxigen en la sang, la manipulació química o física de la mostra i el dopatge genètic.

**M1. ENHANCEMENT OF OXYGEN TRANSFER**  
The following are prohibited:

1. Blood doping, including the use of autologous, homologous or heterologous blood or red blood cell products of any origin.
2. Artificially enhancing the uptake, transport or delivery of oxygen, including, but not limited to, perfluorochemicals, efaproxiral (RSR13) and modified haemoglobin products (e.g. haemoglobin-based blood substitutes, microencapsulated haemoglobin products), excluding supplemental oxygen.

**M2. CHEMICAL AND PHYSICAL MANIPULATION**

**M3. GENE DOPING**



WORLD  
ANTI-DOPING  
AGENCY  
play true

**Figura 1.1** Mètodes prohibits en l'esport segons el Codi Mundial Antidopatge. The 2012 prohibited list (WADA, 2012a).

A més de les substàncies i mètodes prohibits citats anteriorment cal destacar que estimulants, narcòtics, cannabinoides i glucocorticosteroides també estan prohibits en competició; altres substàncies, com els  $\beta$ -blocadors o l'alcohol, només ho estan en determinats esports.

### 1.1.2 Dopatge sanguini

El dopatge sanguini, mitjançant l'ús de transfusions de sang, eleva la quantitat d'oxigen transportat per la sang, incrementa la disponibilitat d'oxigen dels músculs, el consum màxim d'oxigen i com a conseqüència millora el rendiment esportiu. L'AMA inclou el dopatge sanguini dins dels mètodes prohibits que milloren la transferència d'oxigen (veure Annex II).

El metabolisme aeròbic és el que intervé majoritàriament en la producció d'energia en els exercicis esportius superiors a 2 minuts. En la millora de l'eficiència d'aquest metabolisme és on el dopatge sanguini juga un paper important. Un increment del transport d'oxigen augmenta la quantitat d'energia per unitat de temps (Medbo et al, 1989; Astrand et al, 1987), de manera que mètodes o substàncies que permetin un bon transport d'oxigen són susceptibles a ser utilitzades per augmentar el rendiment esportiu de manera il·lícita.

Existeixen tres maneres d'augmentar la quantitat d'oxigen transportat per la sang (Buick et al, 1980):

- a) Augment de la pressió parcial d'oxigen de l'aire respirat pel subjecte: mitjançant la respiració en condicions d'hiperoxia (respiració d'una mescla que conté una concentració d'oxigen superior a la de l'aire ambient) o en condicions d'hiperbaria (respiració en un ambient on la pressió parcial d'oxigen és més elevat que en l'aire ambient).
- b) Augment de la quantitat d'hemoglobina que circula per la sang: per ús d'una transfusió de sang o d'eritròcits d'un mateix subjecte (transfusió autòloga) o d'un donant (transfusió homòloga); accelerant la formació d'eritròcits (eritropoesis) amb entrenaments a altitud o mitjançant l'administració d'eritropoietina (EPO) i/o els seus anàlegs com l'eritropoietina recombinant humana (rHuEPO),

l'eritropoietina de llarga duració (NESP, darbepoietina), l' rHuEPO encapsulada o els pèptids mimètics de l' EPO (Gaudard et al, 2003; Elliot et al, 2008).

- c) Administració de transportadors d'oxigen no naturals: les hemoglobines modificades químicament, els prefluorocarburs (PFC) (Gaudard et al, 2003) o les substàncies químiques com l'efaproxiral que produeixen canvis en la corba de dissociació de l'hemoglobina (Jimenez et al, 2004).

Als anys 70 i 80 els atletes ja usaven transfusions de sang abans de competicions esportives importants malgrat ser una pràctica no exempta de perills per la salut (Berglund et al, 1987a). Cap a finals dels anys 80 el dopatge sanguini per mitjà de transfusions de sang va començar a substituir-se per la utilització de l'eritropoietina (EPO). L'EPO és una hormona produïda pel ronyó que estimula la producció d'eritròcits en la medul·la òssea. Tot i estar indicada en l'àmbit clínic pel tractament de pacients amb anèmia és extensament conegut que ha estat i és utilitzada per esportistes (Spriet et al, 1991; Rigoulet et al, 1998). Darrerament les transfusions de sang tornen a ser utilitzades perquè els laboratoris de control antidopatge disposen de mètodes per a la detecció de l'EPO i els seus anàlegs (Lasne et al, 2000; Mallorquí et al, 2008; Reichel, 2011a).

### **1.1.3 Transfusions i rendiment esportiu**

Les transfusions de sang o dopatge sanguini són utilitzades en gran mesura en les disciplines esportives de resistència. Les transfusions poden ser de dos tipus: les rebudes d'un donant de sang o transfusions homòlogues, i les autotransfusions o transfusions autòlogues, en les que donant i receptor són el mateix individu (Berglund et al, 1988).

Les transfusions homòlogues presenten més risc pel receptor perquè poden transmetre malalties infeccioses. En el cas de les transfusions autòlogues l'esportista se sotmet a una flebotomia, la sang o el concentrat d'eritròcits s'emmagatzema i un cop recuperats els nivells d'hemoglobina que tenia abans de l'extracció se li infon.

Al final del procés de qualsevol dels dos tipus de transfusions en resulta un augment significatiu dels eritròcits i de l'hemoglobina en sang (Ekblom et al, 2000; Calbet et al, 2006). En ambdós casos el volum de sang acostuma a ser una unitat o bossa transfosa, o sigui uns 450 ml (Leigh-Smit, 2004), però pot ser superior.

L'emmagatzematge de la sang és un punt important a l'hora que limitant en aquest tipus de pràctiques. Existeixen bàsicament dos tipus de protocols d'emmagatzematge:

- a) De sang total: emmagatzematge de sang total a 4°C durant un màxim de 3 ó 4 setmanes. La sang no manté les seves propietats més enllà de 4 setmanes a causa de la degeneració d'un 10 a un 20% dels eritròcits.
- b) D'eritròcits congelats: la sang total emmagatzemada es mescla amb una solució de citrat-fosfat dextrosa (CPD), es centrifuga i se'n separen els components. Els eritròcits obtinguts es mesclen amb una solució salina-adenina-glucosa-manitol (SAGM) i es congelen en glicerol i nitrogen líquid. Els eritròcits així congelats es poden mantenir anys sense que perdin les seves propietats (Bakker, 1977; Horowitz, 1985).

L'efecte de les transfusions sobre el rendiment esportiu ha estat estudiat àmpliament. Al 1947, Pace i els seus col·laboradors van avaluar per primer

cop l'efecte de les transfusions homòlogues sobre l'exercici físic i van descriure un augment de l'hematòcrit del 26% de mitjana (Pace et al, 1947). A mitjans dels anys 70 es van publicar diferents estudis en els que avaluaven la incidència de les transfusions autòlogues sobre el consum màxim d'oxigen i la resistència aeròbica. Com que la reinfusió de la sang es va fer sense esperar a que els subjectes es recuperessin de l'estat d'anèmia, els resultats no van indicar millores en els paràmetres avaluats (Williams et al, 1973; Bell et al, 1976; Frye et al, 1977; Videman et al, 1977; Pate et al, 1979).

D'altra banda, diferents publicacions indicaven una lleugera millora de la concentració d'hemoglobina, de la d'hematòcrit i un augment del consum màxim d'oxigen després de la transfusió d'una o de dues unitats de sang. Els resultats diferien en funció de l'estudi; així, Robinson i els seus col·laboradors no van observar canvis en el consum màxim d'oxigen però sí un lleuger augment de la concentració de l'hematòcrit entre el 1.9% i el 4.7% (Robinson et al, 1966). Altres autors assenyalaven millores de la concentració d'hematòcrit del 2.7% i 2.9%, del consum màxim d'oxigen del 9% i 7.9%, a més d'obtenir bones respostes cardiorespiratòries i metabòliques (Eklom et al, 1972, Eklom et al, 1976). Tots aquests estudis presentaven errors de disseny i problemes metodològics; com per exemple les dificultats per a la conservació de la sang o el maneig dels tests per a la determinació del consum màxim d'oxigen.

Uns anys més tard els estudis es duien a terme amb concentrats d'eritròcits. La transfusió autòloga d'eritròcits corresponents a una unitat de sang total produïa un augment inferior al 4% en la concentració d'hemoglobina, malgrat que no afavoria positivament sobre el consum màxim d'oxigen ni la resistència aeròbica (Williams et al, 1978; Cottrell et al, 1979; Spriet et al, 1986).

En el cas equivalent a dues o més unitats d'eritròcits, Celsing i els seus col·laboradors van elaborar un dels estudis més complets amb esportistes

altament entrenats. Els resultats mostraven l'evolució a l'alça dels paràmetres anteriorment citats amb independència dels valors que presentessin cadascun dels esportistes en situació de normalitat (Celsing et al, 1987). Aquests resultats van quedar confirmats per altres grups (Thomson et al, 1982; Robertson et al, 1984). S'ha reportat en diverses publicacions que dins la primera setmana després de la transfusió la marca esportiva millorava considerablement en esportistes d'elit (Buick et al, 1980; Williams et al, 1981; Goforth et al, 1982; Berglund et al, 1987b; Brien et al 1989).

### **1.1.4 Detecció de l'ús de transfusions**

En el món del control antidopatge s'han desenvolupat al llarg dels anys tècniques per perseguir l'ús de transfusions en l'esport. Un dels principals objectius actuals dels laboratoris de control antidopatge i de l'AMA és treballar en la millora d'aquests mètodes així com en el desenvolupament de tests més sensibles i eficaços.

#### **1.1.4.1 Detecció de l'ús de transfusions homòlogues**

La citometria de flux és la tècnica utilitzada pel cribatge de les transfusions homòlogues de sang o d'eritròcits en les mostres dels controls antidopatge. El fonament de la tècnica recau en les diferències d'antigens que hi ha en les membranes dels eritròcits del receptor i del donant (Nelson et al, 2002; Nelson et al, 2003; Voss et al, 2007; Arndt et al, 2008; Giraud et al, 2008). Després d'una transfusió homòloga un cert percentatge de la població dels eritròcits provenen del donant. El perfil antigènic dels eritròcits es determina quantitativament amb l'ús d'anticossos específics per a cadascun dels antigens a mesurar i anticossos secundaris marcats amb un grup fluorocrom. En aquesta tècnica no es mesuren tots els antigens existents possibles ja que només aquells que es troben en una freqüència moderada entre la població

són més específics i per tant, més informatius. Nelson i els seus col·laboradors van ser els primers en descriure la mesura de 12 antigens (antigens C, c, E, e, K, k, Fy<sup>a</sup>, Fy<sup>b</sup>, Jk<sup>a</sup>, Jk<sup>b</sup>, S i s) (Nelson et al, 2002; Nelson et al, 2003). En publicacions posteriors el número d'antigens mesurats es va reduir a 8 (Voss et al, 2007; Giraud et al, 2008).

Tan l'absència d'anticossos específics com les dificultats en els anticossos secundaris per originar bons nivells de fluorescència i així obtenir límits de detecció baixos són les principals limitacions de la citometria de flux. Altres desavantatges són, per exemple, la possible existència de diferents poblacions d'eritròcits en un mateix individu com a resultat d'un quimerisme hematopoietic i no d'una transfusió homòloga. Aquest últim faria necessari l'aplicació addicional d'una anàlisi d'ADN (Milde et al, 1999).

Per bé que la citometria de flux només permet detectar l'ús de transfusions homòlogues, la finestra temporal de detecció podria anar més enllà de les 3 ó 4 setmanes després de la transfusió d'una o més unitats de sang (Nelson et al, 2003).

#### **1.1.4.2 Detecció de l'ús de transfusions autòlogues**

Actualment no existeix cap mètode aprovat per l'AMA capaç de perseguir l'ús de transfusions autòlogues; s'està estudiant però, una via de detecció centrada en la mesura de diferents marcadors indirectes presents a la sang.

El procés d'extracció de la sang o feblotomia implica canvis en els marcadors de l'eritropoiesis ja que el subjecte entra en una situació d'anèmia. Alguns dels paràmetres es recuperen ràpidament (concentració d'hemoglobina, Hb; eritropoietina del sèrum, sEPO), altres ho fan més lentament (percentatge de reticulòcits, Retic%; transferrina del sèrum, sTfR) (Damsgaard et al, 2006).



Els primers paràmetres proposats com a marcadors de l'ús de transfusions van ser l'hematòcrit (Hct), l'Hb i el resultat OFFhr (algoritme basat en la concentració d'hemoglobina i el percentatge de reticulòcits,  $[Hb]-60(\%retic)^{1/2}$ ) (Gore et al, 2003; Pottgiesser et al, 2007; Prommer et al, 2008; Sallet et al, 2008). El OFFhr és un bon marcador varies setmanes després de la transfusió però la seva sensibilitat és molt baixa hores o pocs dies després de la transfusió, fet que limita la seva utilització com a marcador diana (Morkeberg et al, 2011). A més, tots ells es poden veure alterats per la deshidratació o els entrenaments en altitud (Pialoux et al, 2009). Per tal de millorar la sensibilitat d'aquest mètode de detecció s'han suggerit altres marcadors com la relació entre el contingut d'hemoglobina en la població d'eritròcits madurs i el contingut d'hemoglobina en la població de reticulòcits (RCHb/RetHb) (Morkeberg et al, 2008).

De tots els estudis, el marcador massa total d'hemoglobina (tHb) és el més sensible, però com tots els anteriors també presenta l'inconvenient que és necessari el coneixement previ dels nivells basals de l'atleta. Pel que fa el model OFFhr aquest està actualment aprovat per la AMA i presenta una bona relació sensibilitat/especificitat (Morkeberg et al, 2012).

### **1.1.4.3 Passaport biològic**

Una de les majors limitacions que presenten els marcadors sanguinis descrits anteriorment és la necessitat del coneixement previ dels nivells dels paràmetres hematològics de l'esportista. En els últims anys s'ha creat el Passaport Biològic de l'Atleta, en anglès, "Athlete Biological Passport" (ABP) (Malcovati et al, 2003) que consisteix en fer un seguiment individual dels paràmetres hematològics dels atletes per poder posar en alerta en el cas que hi hagi qualsevol desviació respecte dels nivells basals, fet que indicaria una possible transfusió.

Amb l'ajut de models estadístics, diferents grups van suggerir els marcadors més indicatius d'una eritopoiesis alterada com a conseqüència de la pràctica del dopatge sanguini que podrien ser monitoritzats en l'ABP (Parissoto et al, 2000; Magnani et al, 2001; Parissoto et al, 2001; Gore et al, 2003; Sharpe et al, 2006; Morkeberg et al, 2009; Morkeberg et al, 2011).

Finalment, els paràmetres hematològics seleccionats per l'AMA i inclosos en l'ABP són: Red Blood Cell (erythrocyte) Count (RBC), Mean Corpuscular Volume (MCV), HcT, [Hb], Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration (MCHC), retic%, reticulocytes count (ret#), Mean Corpuscular Haemoglobin (MCH), Platelet Count (PLT), White Blood Cell (Leukocyte) Count (WBC) i OFFhr (WADA, 2010; WADA, 2012b). L'ABP ja és un mètode consolidat en els laboratoris de control antidopatge acreditats. Des del 2009 l'AMA regula la seva correcta aplicació i s'encarrega d'elaborar els documents tècnics i els estàndards internacionals (ISL) relacionats per seguir adequadament, per exemple, els protocols de presa i transport de la mostra o la gestió dels resultats (WADA 2012c).

#### **1.1.4.4 Alternatives**

Seguint amb la idea de cercar marcadors òptims que indiquin l'ús de transfusions de sang, algunes publicacions recents centren els esforços en identificar les possibles alteracions que presenten els eritròcits degudes a l'emmagatzematge de la sang. Aquestes alteracions poden ser canvis en la membrana o en les proteïnes del citoesquelet dels eritròcits (D'Amici et al, 2007; Kannan et al, 2010; Reichel, 2011b; Nikolovski et al, 2012). Així doncs, si es detecta en la sang de l'atleta modificacions en els eritròcits ocasionades per un procés previ d'emmagatzematge, aquestes podrien indicar la pràctica d'una transfusió. En aquest àmbit són necessaris més estudis que clarifiquin el potencial d'aquestes cines.

Altres tipus de marcadors indirectes suggerits són els que analitzen les diferències en el perfil d'expressió dels limfòcits T abans i després de la transfusió (Pottgiesser et al, 2009).

## **1.2 Di(2-etilhexil) ftalat (DEHP)**

### **1.2.1 Plàstics i clorur de polivinil (PVC)**

Els plàstics són polímers constituïts per cadenes de monòmers. Les diferents combinacions de monòmers originen plàstics amb diferents característiques, fet que els permetrà ser destinats a múltiples aplicacions.

Els plàstics estan presents des de fa molts anys a la nostra societat. Al 1839 l'aprofitament i l'explotació dels plàstics es va iniciar amb el descobriment del cautxú volcanitzat i del poliestirè (Andrady et al, 2009). Més endavant, al 1907, es va sintetitzar el primer polímer sintètic, la bacalita. La producció de plàstics a gran escala no va començar fins la dècada dels 40 (Thompson et al, 2009). La producció mundial de plàstics al 2011 va ser de 280 milions de tones i la tendència en el creixement de la producció de les darreres dècades és d'un 5% anual (APME, 2011). Aquestes dades indiquen la gran dependència mundial dels plàstics com a conseqüència de la seva versatilitat i baix cost. El clorur de polivinil (PVC) és el material plàstic per excel·lència que s'utilitza en més aplicacions.

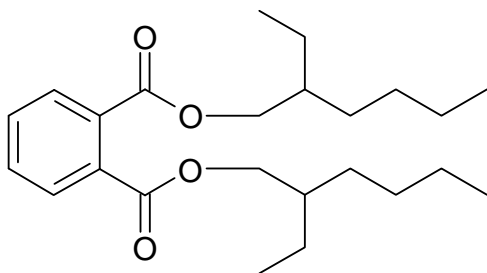
El PVC està constituït per molècules de clorur de vinil polimeritzades (-CH<sub>2</sub>CHCl-) i per additius que no estan covalentment units a elles. Aquests últims s'encarreguen de modificar les característiques del polímer per tal d'optimitzar-lo per a un ús determinat. Els additius es coneixen com a plastificants i els més utilitzats són els ftalats, que doten al PVC de flexibilitat i elasticitat (Rahman et al, 2004).

Els ftalats són èsters de l'àcid ftàlic que s'introdueixen en l'estructura del polímer i que actuen com a lubricant, separant físicament les cadenes de molècules i augmentant així la flexibilitat del conjunt. En funció de la llargada de les cadenes i dels grups radicals que contenen les propietats dels ftalats varien. Els principals ftalats utilitzats entre els més de 25 tipus existents són: el di-isononil ftalat (DINP), el di-isodecil ftalat (DIDP), el di-isobutil ftalat (DiBP), dietil ftalat (DEP) i el di(2-etilhexil) ftalat (DEHP), però pel seu baix cost el DEHP és el que té el percentatge de mercat més elevat.

### 1.2.2 DEHP

El DEHP és el di(2-etilhexil) ftalat (veure figura 1.2). Altres sinònims acceptats pel DEHP són: dioctil ftalat (DOP), bis(2-etilhexil) ftalat (BEHP), bis(2-etilhexil) orto-ftalat, di-sec octil ftalat, entre d'altres.

El DEHP té fórmula molecular  $C_{24}H_{38}O_4$ , n° CAS 117-81-7, n° EINECS 204-211-0 i pes molecular 390.6 g/mol.



**Figura 1.2** Estructura del di(2-etilhexil) ftalat (DEHP).

Les principals propietats físico-químiques del DEHP es presenten a la taula 1.1.

**Taula 1.1** Propietats físico-químiques del di(2-etilhexil) ftalat (DEHP).

Propietat	Valor
Estat físic	Líquid incolor
Punt de fusió	-55°C o -50°C
Punt d'ebullició	230°C a 5mmHg o 385°C a 1013hPa
Densitat	0,98 g/cc a 20°C
Pressió de vapor	0,000034 Pa a 20°C
Solubilitat en aigua	3mg/l a 20°C

El DEHP forma part de molts productes quotidians, com per exemple: materials per a la construcció, material mèdic, cables, materials segelladors, envasos flexibles, revestiments... (Chou et al, 2006). El contingut de DEHP en els materials de PVC és normalment d'un 30% en pes, però pot arribar fins a un 80% en pes segons el tipus de producte.

Respecte a les aplicacions del DEHP, una de les més importants és que forma part de materials de PVC que s'utilitzen en l'àrea mèdica. Els principals dispositius o procediments mèdics que poden contenir DEHP es presenten a la taula 1.2.

**Taula 1.2** Materials o procediments mèdics que contenen DEHP.

Material o procediment mèdic
Bosses de sang
Cànules nasals
Catèters d'infusió intravenosa
Catèters (urinaris, vasculars)
Diàlisi (hemodiàlisi, peritoneal)
Equips d'administració de sang
Equips de respiració
Equips d'infusió intravenosa
Guants d'examen
Nutrició (enteral, parenteral)
Oxigenació amb membrana extracorpòria (ECMO)
Tubs (nasogàstrics, endotraqueals)
Tubs per a bypass cardiopulmonar
Xeringues

L'exemple més important són les bosses utilitzades per a emmagatzemar sang per a futures transfusions, on el DEHP pot representar un 40% en pes de la bossa o fins a un 80% de les cànules.

A l'any 1949 es va començar a introduir la utilització de les bosses de sang de PVC per substituir els recipients de vidre i a la dècada dels 60 es va estendre el seu ús fins a l'actualitat. A poc a poc, es va començar a estudiar la possible migració del DEHP present a les bosses cap al pacient i els efectes adversos que aquesta exposició podia ocasionar (Jaeger et al, 1970; Jaeger et al, 1972).

Els beneficis d'emmagatzemar la sang en materials o bosses que contenen DEHP han estat estudiats per diferents grups (Horowitz et al, 1985; Labow et al; 1987). A més de donar la flexibilitat adequada a la bossa, el DEHP ajuda a preservar els diferents components de la sang, eritròcits, leucòcits, plasma, plaquetes, en condicions òptimes per a la seva posterior reinfusió.

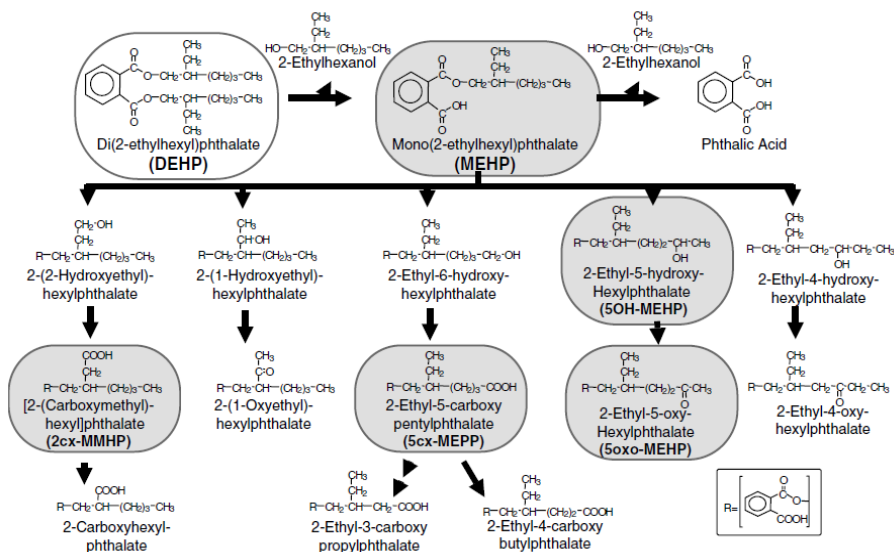
### 1.2.3 Metabolisme del DEHP

El metabolisme del DEHP així com el d'altres tipus de ftalats ha estat estudiat àmpliament com a conseqüència de la implicació de la seva toxicitat en la salut humana (Frederiksen et al, 2007). Els primers estudis metabòlics en animals es van fer l'any 1973 per Albro et al (Albro et al, 1973; Albro et al, 1975; Peck et al, 1982; Schmid et al, 1985), però el metabolisme del DEHP està descrit en moltes altres publicacions.

El DEHP es metabolitza en el cos humà en varies fases. En la primera fase s'origina mono-(2-etilhexil) ftalat (MEHP) i 2-etilhexanol (2EH) després d'un procés d'hidròlisi del DEHP. Aquesta etapa és la més ràpida de totes i està catalitzada per enzims del tipus lipasses i estereasses, principalment de la boca i l'intestí (Albro et al, 1973; Albro et al, 1982; Niino et al, 2003). La segona fase, que té lloc en el fetge, implica múltiples reaccions d'oxidació i d'hidroxilació del MEHP, del 2EH i d'altres metabòlits originats a partir d'ells. Les primeres hidroxilacions comencen per la cadena alquílica del MEHP en diferents posicions. A posteriori, les cadenes segueixen patint processos oxidatius fins a generar cetones i àcids carboxílics de diferent llargada. Després comença el metabolisme de fase II en què l'enzim uridina-5'-difosfoglucuronil transferasa produeix els glucuronoconjugats. Els metabòlits conjugats amb l'àcid glucurònic, són excretats en orina (Silva et al, 2003a; Koch et al, 2005a, Silva et al, 2006a). Aquesta conjugació facilita l'eliminació i disminueix així el potencial tòxic dels metabòlits oxidats perquè es redueix la seva biodisponibilitat.

Els estudis de metabolisme mostren que els principals metabòlits que s'excreten en orina en forma glucuronoconjugada són: mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalat (MEOHP), mono-(2-carboximetilhexil) ftalat (2cx-MMHP) i mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalat (5cx-MEPP) (Silva et al; 2003a; Koch et al, 2004a, Koch

et al, 2006; Silva et al, 2006a). Entre aquests cinc, el MEHP i el 2cx-MMHP són els que representen un percentatge menor, però encara n'hi ha d'altres que són força més minoritaris. A la figura 1.3 es presenta l'esquema metabòlic de fase I del DEHP extret de la publicació de Koch et al, 2005a.



**Figura 1.3** Ruta metabòlica del di(2-etilhexil) ftalat (DEHP). Es destaquen en cercles els metabòlits principals. Els acrònims 5OH-MEHP i 5oxo-MEHP corresponen a MEHHP i MEOHP, respectivament (Koch et al, 2005a).

Les fases del metabolisme i els patrons d'excreció dels metabòlits s'han estimat a partir d'estudis d'eliminació després d'una administració prèvia de DEHP deuterat (DEHP D<sub>4</sub>) (Koch et al, 2004a; Koch et al, 2005a; Anderson et al, 2011). A les 24 hores de l'administració el 67% de la dosi de DEHP s'ha excretat en orina en forma dels cinc metabòlits principals. El percentatge de cada metabòlit en orina les primeres 24 hores és de 23% de MEHHP, 19% de 5cx-MEPP, 15% de MEOHP, 6% de MEHP, i 4% de 2cx-MMHP.



El MEHHP i el 5cx-MEPP són els metabòlits que s'excreten a concentracions més elevades en orina i tenen els nivells màxims d'excreció a les 4 hores després de l'administració. Pel que fa el MEHP el seu màxim d'excreció s'observa a les 2 hores i en canvi, pel 2cx-MMHP el pic màxim d'excreció se situa després de les 8 hores. Així el 5cx-MEPP, el MEHHP i el MEOHP són els principals metabòlits si tenim en compte la vida mitjana i la concentració i esdevenen els marcadors més útils de l'exposició a DEHP; però el 2cx-MMHP és el que té la vida mitjana més llarga i pot ser detectat en orina més enllà de les 24 hores després de l'administració (Koch et al, 2005a; Koch et al, 2006; Fredriksen et al, 2007).

#### **1.2.4 Exposició al DEHP**

La presència de ftalats i de DEHP en múltiples tipus de productes origina una contínua alliberació d'aquests al medi ambient. La unió no covalent del DEHP als polímers en facilita el desprendiment en qualsevol de les etapes de formulació, producció, transport, emmagatzematge...etc. Les principals fonts d'emissió de DEHP es detallen a continuació:

- Producció del DEHP en plantes químiques
- Formulació i processament de polímers
- Producció i ús d'adhesius, pintures, tintes, segelladors...
- Eliminació de productes que contenen DEHP (materials PVC)
- Gestió de residus (reciclatge paper, trituració, incineració de productes...)

Com que el DEHP està present constantment en l'ambient, la població general hi està sempre exposada (Blount et al, 2000a; Koch et al, 2003a,b; Silva et al, 2004a; Wittassek et al, 2007; Koch et al, 2009; Romero et al, 2011).

L'exposició de la població general i la toxicitat han estat les claus per a què s'hagin realitzat i es continuïn realitzant molts estudis de nivells poblacionals d'aquest compost. Existeixen diferents possibilitats per avaluar l'exposició humana al DEHP (Clark et al, 2003; Angerer et al, 2006; Wittassek et al, 2011):

- Mesura del DEHP en el medi ambient, en productes o en aliments.
- Mesura del DEHP, dels seus metabòlits o altres productes de reacció en espècimens humans (orina, sang...).

En el primer cas, les tècniques analítiques per a la quantificació del DEHP es poden veure més interferides per la possible contaminació externa (Koch et al, 2009).

## **1.2.5 Nivells poblacionals**

### **1.2.5.1 Població general**

Les rutes d'entrada principals del DEHP al cos són la via oral i la intravenosa. La naturalesa lipofílica del DEHP permet que aquest plastificant pugui també travessar fàcilment la pell o els teixits pulmonars (Kluwe et al, 1982).

La font majoritària d'exposició en humans és la dieta. Les principals etapes de contaminació del menjar poden ser algunes de les que ja s'han descrit en el punt anterior. No obstant això, el nivell de contaminació també pot variar en funció del tipus d'empaquetament o del contingut lipídic de l'aliment (Meek et al, 1994; Peterson et al, 2000; Muller et al, 2003; Wormuth et al, 2006). Al llarg dels anys s'han publicat diferents estudis que correlacionen la dieta i els nivells de DEHP en orina; tots ells corroboren que la dieta és la

principal font d'exposició de la població (Itoh et al, 2005; Schettler et al, 2006; Fromme et al, 2007a).

Els primers estudis sobre nivells de DEHP en la població general es van publicar per Blount et al, l'any 2000 (Blount et al, 2000a). En un primer moment, les dades poblacionals només feien referència al monoèster MEHP com a biomarcador de l'exposició, però gràcies a altres contribucions científiques, sobretot aquelles que implicaven l'administració oral de dosis de DEHP D<sub>4</sub>, es van començar a utilitzar com a marcadors els metabòlits oxidats de DEHP en orina (Koch et al, 2004a; Koch et al, 2005a). El MEHP no es va considerar ni es considera un bon biomarcador en orina, però tampoc en altres matrius biològiques degut a diferents raons: la contaminació externa generada a partir del DEHP, que està present arreu; la contaminació originada per l'activitat d'alguns enzims (lipasses, estereases) en les mostres biològiques (sang, llet materna, fluïd amniòtic) (Kato et al, 2003) o la ràpida eliminació del mateix MEHP pel propi metabolisme. Així doncs, l'estimació de l'exposició a DEHP es realitza mitjançant la mesura dels diferents metabòlits oxidats en orina, principalment, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP i 2cx-MMHP (Barr et al, 2003; Kato et al, 2003; Koch et al, 2003c; Fromme et al, 2007b; Koch et al, 2009).

En la taula 1.3 es presenten els nivells poblacionals, classificats en tres àrees geogràfiques: Estats Units, Europa i Àsia, dels metabòlits del DEHP en orina descrits en els principals estudis realitzats l'última dècada. Per a cada estudi s'indica la mediana, el percentil 95 i el valor màxim per cada metabòlit estudiat. La major part d'estudis realitzats a Europa són fets amb població alemanya. D'altra banda, molts dels estudis s'han realitzat en dones embarassades per tal d'avaluar l'exposició a DEHP i els potencials efectes en el desenvolupament reproductiu del fetus.

**Taula 1.3** Mediane sense ajustar (percentil 95, valor màxim) de les concentracions dels metabòlits de DEHP en estudis de població general.

Referència	Població	n	Concentració de metabòlits de DEHP en orina (mediana, ng/ml)				
			MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP
<b>Estats Units</b>							
Blount et al, 2000a	adults	289	2.7 (21.5, 66.6)	n.a	n.a	n.a	n.a
Barr et al, 2003	adults/infants	62	4.5 (n.a, 537.0)	35.9 (n.a, 2417.0)	28.3 (n.a, 1860.0)	n.a	n.a
Hauser et al, 2004	homes (edat reproductiva)	369	5.2 (110.0, n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a
Kato et al, 2004	adults/infants (>6 anys)	127	<LD (20.4, n.a)	17.4 (220.0, n.a)	15.6 (243.0, n.a)	n.a	n.a
Silva et al, 2004a	adults/infants (>6 anys)	2540	3.0 (22.4, n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a
Duty et al, 2005a	homes (18-54 anys)	295	5.0 (131.0, n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a
Duty et al, 2005b	homes (20-54 anys)	338	5.2 (134.6, n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a
NCEH, 2005	adults	1647	4.1 (39.5, n.a)	17.7 (175.0, n.a)	12.2 (115.0, n.a)	n.a	n.a
Kato et al, 2005a	adults	43	<LD (n.a, 11.8)	8.0 (n.a, 134.9)	5.7 (n.a, 116.4)	8.9 (n.a, 130.1)	n.a
Swan et al, 2005	embarassades	85	3.3 (9.0 <sup>a</sup> , n.a)	11.4 (21.1 <sup>a</sup> , n.a)	11.1 (19.0 <sup>a</sup> , n.a)	n.a	n.a

**Taula 1.3 (continuació)** Mediane sense ajustar (percentil 95, valor màxim) de les concentracions dels metabòlits de DEHP en estudis de població general.

Referència	Població	n	Concentració de metabòlits de DEHP en orina (mediana, ng/ml)				
			MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP
<b>Estat Units (continuació)</b>							
Marsee et al, 2006	embarassades	214	4.3 (38.6, 206.8)	10.8 (76.4, 2108.0)	9.8 (65.0, 1677.0)	n.a	n.a
Silva et al, 2006a,b	adults	129	3.1 (17.0, 85.2)	15.3 (120.8, 367.5)	7.1 (62.4, 175.5)	15.6 (159.3, 298.5)	5.9 (20.7, 93.5)
Adibi et al, 2008	embarassades	246	4.8 (46.8, n.a)	19.9 (149.6, n.a)	17.5 (107.6, n.a)	37.1 (232.2, n.a)	n.a
Wolff et al, 2008	embarassades (3r trimestre)	382	6.0 (14.0 <sup>a</sup> , 526.0)	20.0 (39.0 <sup>a</sup> , 2051.0)	17.0 (36.0 <sup>a</sup> , 1335.0)	35.0 (70.0 <sup>a</sup> , 2054.0)	n.a
Adibi et al, 2009	embarassades	283	3.5 (40.2, n.a)	11.2 (99.4, n.a)	9.9 (68.4, n.a)	n.a	n.a
Meeker et al, 2009	embarassades pre-part	242	4.0 (21.0 <sup>b</sup> , 1560.0)	11.3 (44.9 <sup>b</sup> , 4440.0)	10.2 (42.6 <sup>b</sup> , 2833.0)	n.a	n.a
	embarassades post-part	242	7.2 (23.6 <sup>b</sup> , 173.0)	20.4 (83.1 <sup>b</sup> , 867.0)	16.0 (61.7 <sup>b</sup> , 728.0)	n.a	n.a
NCEH, 2009	adults	1534	1.7 (29.5, n.a)	18.4 (225.0, n.a)	12.4 (139.0, n.a)	29.2 (312.0, n.a)	n.a
Colacino et al, 2010	adults/infants (>6 anys)	2350	2.1 (n.a, 718.0)	23.1 (n.a, 3141.0)	15.9 (n.a, 1953.0)	35.3 (n.a, 2886.0)	n.a
Peck et al, 2010	dones (18-46 anys)	45	4.5 (22.2, 30.8)	21.4 (156.6, 268.2)	13.5 (84.1, 164.3)	36.0 (192.7, 226.5)	n.a
Braun et al, 2011	pre-embaraç (18-45 anys)	636	8.1 (12.4 <sup>a</sup> , n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a
	embarassades (18-45 anys)	365	9.5 (20.0 <sup>a</sup> , n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a

**Taula 1.3 (continuació)** Mediane sense ajustar (percentil 95, valor màxim) de les concentracions dels metabòlits de DEHP en estudis de població general.

Referència	Població	n	Concentració de metabòlits de DEHP en orina (mediana, ng/ml)				
			MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP
<b>Europa</b>							
Koch et al, 2003a,b	adults/infants(>7 anys)	85	10.3 (37.9, 177.0)	46.8 (224.0, 818.0)	36.5 (156.0, 544.0)	n.a	n.a
Koch et al, 2004b	adults	19	9.0 (29.0, 43.1)	32.1 (64.0, 103.0)	19.6 (36.7, 55.1)	n.a	n.a
Jönsson et al, 2005	adults	234	<LD (54.0, 150.0)	n.a	n.a	n.a	n.a
Koch et al, 2005a	adults	5	9.7 (n.a, 44.5)	24.3 (n.a, 125.8)	16.9 (n.a, 100.8)	n.a	n.a
Preuss et al, 2005	adults/infants	19	9.8 (n.a, 49.9)	47.5 (n.a, 96.1)	39.7 (n.a, 72.5)	85.5 (n.a, 164.0)	36.6 (n.a, 87.7)
Fromme et al, 2007b	adults	399	4.9 (21.7, 207.3)	19.2 (81.8, 681.8)	14.7 (56.0, 447.1)	26.2 (93.6, 946.7)	8.3 (41.3, 300.8)
Wittassek et al, 2007	adults	634	7.6 (33.6, 129.0)	21.0 (77.2, 275.0)	16.7 (57.5, 251.0)	26.9 (98.8, 340.0)	8.7 (35.3, 178.0)
Högberg et al, 2008	embarassades post-part (23-39 anys)	42	9.0 (17.0 <sup>a</sup> , 57.0)	15.0 (29.0 <sup>a</sup> , 126.0)	11.0 (24.0 <sup>a</sup> , 83.0)	n.a	n.a
Ye et al, 2008	embarassades (18-41 anys)	100	6.9 (82.8, 392.0)	14.0 (86.2, 494.0)	14.5 (104.0, 514.0)	18.4 (141.0, 421.0)	6.2 (33.4, 67.3)
Koch et al, 2009	adults	45	1.8 (8.5, n.a)	13.9 (42.9, n.a)	8.2 (21.5, n.a)	11.5 (35.0, n.a)	n.a
Wittassek et al, 2009	embarassades (24-37 anys)	11	n.a	10.5 (n.a, 38.1)	12.0 (n.a, 35.3)	27.0 (n.a, 84.5)	4.2 (n.a, 13.0)
Frederiksen et al, 2010	homes (18-26 anys)	60	4.9 (40.8, 59.1)	26.1 (207.4, 423.9)	20.0 (159.3, 264.9)	17.0 (102.0, 126.4)	n.a
Göen et al, 2011	adults	240	4.7 (16.6, n.a)	14.4 (42.2, n.a)	9.6 (36.0, n.a)	14.5 (49.7, n.a)	5.8 (18.2, n.a)
Kasper et al, 2012	adults	104	4.6 (15.3, 808.0)	17.3 (45.5, 416.0)	12.9 (35.0, 279.0)	20.5 (69.4, 379.0)	n.a

**Taula 1.3 (continuació)** Mediane sense ajustar (percentil 95, valor màxim) de les concentracions dels metabòlits de DEHP en estudis de població general.

Referència	Població	n	Concentració de metabòlits de DEHP en orina (mediana, ng/ml)				
			MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP
<b>Àsia</b>							
Itoh et al, 2005	adults/infants (4-70 anys)	36	5.1 (n.a, 25.0)	n.a	n.a	n.a	n.a
Koo et al, 2005	adults	150	41.3 <sup>c</sup> (n.a, n.a)	n.a	n.a	n.a	n.a
Huang et al, 2007	embarassades (2n trimestre)	76	20.6 (273.0, 381.0)	n.a	n.a	n.a	n.a
Huang et al, 2009	embarassades (1r trimestre)	64	25.5 (94.5 <sup>b</sup> , 1140.0)	n.a	n.a	n.a	n.a
Itoh et al, 2009	dones infèrtils (20-45 anys)	80	8.3 (11.2, n.a)	32.2 (44.1, n.a)	32.1 (46.1, n.a)	n.a	n.a
Suzuki et al, 2009	embarassades	50	4.0 (n.a, 70.6)	10.6 (n.a, 89.7)	11.0 (n.a, 132.0)	n.a	n.a
Ji et al, 2010	adults	25	21.3 (39.2, n.a)	45.6 (89.0, n.a)	36.4 (79.7, n.a)	n.a	n.a
		25	27.4 (57.2, n.a)	50.1 (143.9, n.a)	48.3 (94.1, n.a)	n.a	n.a
Guo et al, 2011 <sup>c</sup>	adults/infants	183	2.1 (n.a, 131.9)	11.3 (n.a, 709.5)	7.0 (n.a, 337.5)	30.0 (n.a, 865.5)	18.5 (n.a, 748.5)
Lin et al, 2011a	embarassades (3r trimestre)	100	10.5 (n.a, 218.0)	21.7 (n.a, 617.0)	20.8 (n.a, 645.0)	27.9 (n.a, 859.0)	7.0 (n.a, 183.0)
Lin et al, 2011b	embarassades	155	11.7 (34.6, 84.7)	11.8 (66.1, 186.0)	17.2 (127.0, 271.0)	n.a	n.a

<sup>a</sup> percentil 75

<sup>b</sup> percentil 90

<sup>c</sup> mitjana geomètrica

n.a: no avaluat en el treball

LD: límit de detecció

El rang de la mediana de les concentracions dels diferents metabòlits en població nord-americana és de 8.0 a 35.9 ng/ml per al MEHHP, 5.7 a 28.3 ng/ml per al MEOHP, 8.9 a 37.1 ng/ml per al 5cx-MEPP i l'única dada de mediana disponible per al 2cx-MMHP és de 5.9 ng/ml. El rang de les medianes en població europea és de 10.5 a 47.5 ng/ml per al MEHHP, 8.2 a 39.7 ng/ml per al MEOHP, 11.5 a 85.5 ng/ml per al 5cx-MEPP i 4.2 a 36.6 ng/ml per al 2cx-MMHP. Finalment, en el cas de la població asiàtica, el rang de les medianes és de 10.6 a 50.1 ng/ml per al MEHHP, 7.0 a 48.3 ng/ml per al MEOHP, 27.9 a 30.0 ng/ml per al 5cx-MEPP i 7.0 a 18.5 ng/ml per al 2cx-MMHP. En general, les concentracions de 5cx-MEPP són superiors a les de MEHHP i encara més a les de MEOHP.

Les diferències que s'observen en les concentracions dels metabòlits en els estudis poblacionals presentats en les taules poden estar relacionades amb els diferents patrons d'exposició al DEHP segons l'àrea geogràfica, o amb una possible diferència segons l'àrea, en el metabolisme dels monoèsters (Ji et al, 2010). Tenint en compte els valors de les medianes i del percentil 95 sembla que les concentracions dels metabòlits en orina són superiors en la població asiàtica respecte l'europea i la nord-americana. Inclús, dins la població asiàtica els nivells de la població coreana (Ji et al, 2010) són superiors als de la xinesa (Guo et al, 2011). Pel que fa als màxims de concentració, els valors més elevats corresponen a població nord-americana, tot i que aquesta població presenta un grau d'exposició menor que les altres dues (valors de percentils inferiors); així, pot ser que certs estils de vida d'alguns subjectes impliquen elevada exposició a DEHP.

Respecte a les dades de dones embarassades no hi ha una tendència evident en la que les concentracions puguin ser superiors o inferiors a les de la població general, si bé, en els estudis de dones embarassades de població asiàtica, sí s'observen certes diferències en funció de la regió. A tall d'exemple, els valors dels metabòlits obtinguts en estudis d'embarassades



taiwaneses (Huang et al, 2007; Huang et al, 2009; Lin et al, 2011a,b) són superiors als nivells detectats en embarassades japoneses (Suzuki et al, 2009).

D'altra banda, en cap dels estudis s'han observat diferències en les concentracions en la població adulta a causa de l'edat, ni tampoc en funció del sexe.

Algunes publicacions destaquen, de manera general, que els nivells dels metabòlits de DEHP observats en orina s'han reduït a la meitat els últims 20 anys, possiblement per les restriccions d'ús d'aquest plastificant (Wittassek et al, 2007; Göen et al, 2011).

### **1.2.5.2 Població infantil**

Les dades en la població infantil indiquen unes concentracions força més elevades que en el cas dels adults, fet que indica que el metabolisme del DEHP pot ser dependent de l'edat (Becker et al, 2004; Koch et al, 2004b). En infants s'han observat diferències en funció de l'edat entre nens de dos mesos, sis mesos i més grans de tres anys (Sathyanarayana et al, 2008a; Becker et al, 2009; Carlstedt et al, 2012). Aquestes diferències poden estar originades per la dieta, el metabolisme, el pes o la diferent exposició per contacte amb materials de PVC.

En el cas dels nadons, diferents investigacions remarquen que l'exposició està altament lligada amb la de la mare, per exemple amb els nivells trobats en la llet materna. Altres estudis també vinculen la contaminació materna i la fetal gràcies a les dades obtingudes a partir dels fluids amniòtics o de la sang de cordó (Latini et al, 2003; Silva et al, 2004b; Högberg et al, 2008; Sathyanarayana et al, 2008b).

En altres treballs es descriu l'existència de correlació en les concentracions dels metabòlits del DEHP entre mares i fills, aquesta la relacionen amb el fet que mares i fills comparteixen una mateixa exposició ambiental (Kasper et al, 2012).

La importància de la contaminació a DEHP en la població infantil recau en tres fets principals: els estudis indiquen que els animals joves i immadurs són més susceptibles a patir toxicitat testicular; diferències en la farmacocinètica entre nens i adults ja que, en el cas dels nens, l'aparició dels metabòlits tòxics és més ràpida i l'excreció via glucuronització pel fetge és menor; els nens i nounats reben dosis més altes de DEHP per kg de pes si es compara amb els adults.

En conclusió, la població infantil està més exposada al DEHP que els adults, fet que els fa més susceptibles als possibles efectes tòxics a nivell reproductiu i de desenvolupament del DEHP.

### **1.2.5.3 Variabilitat intraindividual**

En quant a les correlacions entre els diferents metabòlits moltes publicacions hi fan referència (Barr, et al 2003; Koch et al, 2003b; Becker et al, 2004; Frederiksen et al, 2010). Tots els autors descriuen una correlació baixa entre cadascun dels metabòlits oxidats i el MEHP, possiblement per la cinètica d'eliminació diferent del MEHP (Lorber et al, 2010). En canvi, tots ells mantenen que la correlació entre el MEOHP i el MEHHP roman constant i no es veu alterada per les diferències metabòliques interindividuais o intra (Koch et al, 2006).

L'avaluació de la variabilitat temporal i individual dels nivells dels metabòlits s'ha dut a terme per diferents grups; la majoria usen els ICC (Intraclass Correlation Coefficient) per avaluar la reproduïbilitat en les

mesures de les concentracions al llarg del temps (Hoppin et al, 2002; Hauser et al, 2004; Fromme et al, 2007b; Adibi et al, 2008; Peck et al, 2010; Preau et al, 2010). En tots els estudis els ICC obtinguts són molt baixos com a resultat de l'elevada variabilitat intraindividual de les concentracions en orina dels metabòlits de DEHP.

Fromme i col·laboradors indiquen que les variacions en les concentracions individuals dels metabòlits observades en diferents dies consecutius estan relacionades amb la vida mitjana curta dels compostos, el rang de ICC que van obtenir va ser de 0.23 a 0.29 en funció de cadascun dels quatre metabòlits oxidats (Fromme et al, 2007b).

El grup de Preau et al va ser el primer en valorar les fluctuacions intradia de les concentracions de MEHHP en una mateix subjecte, recollint orines de 8 voluntaris al llarg d'una setmana. Tot i que la variabilitat era més moderada per alguns dels subjectes, les variacions individuals més importants que es van observar van ser les corresponents a un mateix dia, amb una variació individual del 58%; la variació va ser del 24% quan es tractava de diferències interdia. Els ICC obtinguts per Preau i col·laboradors van ser de 0.25, 0.17 i 0.31 per orines de primera hora del matí, orines puntuals i orines de 24 hores, respectivament (Preau et al, 2010). Altres publicacions també destaquen que la variabilitat es redueix quan es tracta de mostres d'orina de primera hora del matí (Hoppin et al, 2002; Peck et al, 2010).

Recentment, Solymos i els seus col·laboradors han avaluat la variabilitat intraindividual de les concentracions de MEHP, MEHHP, MEOHP en orina de set voluntaris sans durant una setmana, per tal d'investigar la possibilitat que es registrin nivells alts dels metabòlits en funció de la dieta, l'habitatge o l'exposició ambiental (Solymos et al, 2011a). El rang de les medianes de les concentracions dels tres metabòlits estudiats va ser entre 1 i 3.8 ng/ml per al MEHP, 10.8 i 22.9 ng/ml per al MEHHP i entre 2.5 i 10.1 ng/ml per al

MEOHP. Aquestes concentracions són similars a les descrites habitualment per població europea (veure taula 1.3). Els baixos coeficients de correlació intraclasse obtinguts, entre 0.19 i 0.43, pels tres metabòlits, de nou van indicar l'existència de variabilitat en les concentracions dels metabòlits en un mateix subjecte i una baixa fiabilitat de les mesures amb el temps.

Altres treballs també fan referència als ICC com a mesura del grau de variabilitat; en cap d'ells el coeficient va superar el 0.30 per cap dels metabòlits estudiats (Teitelbaum et al, 2008; Peck et al, 2010). Valors d'ICC més elevats es van obtenir en estudis de variabilitat en població asiàtica amb mostres de dones embarassades, en aquest cas els ICC van ser de 0.51, 0.43 i 0.41 pels metabòlits MEHP, MEHHP i MEOHP, respectivament (Suzuki et al, 2009). En resum, segons tots els estudis publicats existeix una alta variabilitat de les concentracions en orina dels metabòlits de DEHP.

Diferents estudis reflecteixen que les concentracions dels metabòlits en orina de primera hora del matí són més elevades que les obtingudes en orina recollida durant 24 hores i fins i tot més elevades que les concentracions obtingudes en mostres puntuals (Wittassek et al, 2007; Preau et al, 2010; Frederiksen et al, 2011). Així, Frederiksen i els seus col·laboradors indiquen que entre el 40% i el 48% del total del contingut dels metabòlits de ftalats excretats en 24 hores són excretats en les orines de primera hora del matí (Frederiksen et al, 2011).

Malgrat la variabilitat intraindividual es considera que els metabòlits de DEHP, excepte el MEHP, tenen un bon valor predictiu és a dir, que la concentració dels metabòlits es pot relacionar directament amb el grau d'exposició (Hauser et al, 2004).

## **1.2.6 Poblacions altament exposades**

### **1.2.6.1 Exposició per dispositius mèdics**

Existeixen grups específics de població que presenten una exposició a DEHP força més elevada que la de la població general. Aquests grups de risc són sobretot aquells que estan sotmesos a tractaments mèdics que impliquen l'ús de material de PVC (FDA, 2001; EC, 2002; Health Canada, 2002; EC, 2007a). El contacte amb DEHP a nivell mèdic representa pel pacient una petita proporció del total de la contaminació ambiental individual. El grau de contacte dependrà del tipus, de la durada del tractament i de les variables individuals. Els tractaments d'hemodiàlisi i les transfusions repetides de sang corresponen a exposicions de llarga durada; les transfusions de sang puntuals, certes cirurgies o els tractaments d'oxigenació amb membrana extracorpòria corresponen a exposicions més curtes. Les transfusions de sang són un dels processos que impliquen més contaminació per aquest compost, però els procediments d'afèresi en les donacions de sang també proporcionen alts nivells de DEHP, especialment si es tracta d'afèresi en continu (Koch et al, 2005b; Koch et al, 2005c; Weisbach et al, 2006; Weuve et al, 2006).

A la taula 1.2 es presenten els procediments mèdics que poden contenir DEHP. A la taula 1.4 s'indiquen les poblacions hospitalàries de més risc per contaminació per DEHP.

**Taula 1.4** Poblacions de risc.

Població
Cirurgies cardíques
Nounats prematurs
Nounats amb nutrició parenteral
Nounats sotmesos a transfusió o ECMO
Pacients d'hemodiàlisi
Pacients multi transfosos (politraumatismes)
Pacients multi transfosos i ECMO (pacients d'UCI)
ECMO: Oxigenació amb membrana extracorpòria
UCI: Unitat de Cures Intensives

A la taula 1.5 es presenten els nivells dels metabòlits del DEHP publicats en diferents estudis poblacionals dins l'àmbit hospitalari. La població infantil és una de les més sotmeses al DEHP, sobretot en el cas dels nounats que reben diferents teràpies mèdiques a la UCI dels hospitals. Els procediments que impliquen una dosi més alta de DEHP per un nounat són els tractaments parenterals i l'oxigenació amb membrana extracorpòria (Calafat, et al 2004a; Green et al, 2005; Weuve et al, 2006). El tipus de tractament i el grau d'intensitat fan que el nivell d'exposició a DEHP sigui més o menys elevat, així doncs, segons l'estudi de Weuve i col·laboradors les concentracions en el cas dels nounats que reben llargs i intensos tractaments a la UCI de l'hospital són tretze cops més elevades que en el cas de rebre tractaments menys invasius i curts (Weuve et al, 2006).

En resum, tot i que existeixen poblacions de més risc que altres no s'ha limitat l'ús de materials que contenen DEHP per a cap tipus de grup de població en particular i procediment, però sí que s'intenta reduir al màxim el contacte en els pacients més vulnerables (EC, 2002; EC, 2007a; Health Canada, 2002).

**Taula 1.5** Mediane sense ajustar (percentil 95, valor màxim) de les concentracions dels metabòlits de DEHP en poblacions de risc.

Referència	Població	n	Concentració de metabòlits de DEHP en orina (mediana, ng/ml)					
			MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP	
<b>Exposició intravenosa a DEHP</b>								
Koch et al, 2005b,c	donants de plasma	6	34.7 (n.a, 97.8)	90.5 (n.a, 130.4)	82.8 (n.a, 153.0)	n.a	n.a	
	donants de plaquetes (discontinu)	6	117.6 (n.a, 311.2)	315.9 (n.a, 988.0)	306.9 (n.a, 816.0)	n.a	n.a	
	donants de plaquetes (continu)	6	231.9 (n.a, 536.5)	793.8 (n.a, 1343.0)	801.0 (n.a, 1153.0)	n.a	n.a	
<b>Nounats prematurs en UCI</b>								
Calafat et al, 2004a	nounats	41	129.0 (704.0, n.a)	2221.0 (13161.0, n.a)	1697.0 (10413.0, n.a)	n.a	n.a	
Koch et al, 2006	nounats	45	n.a	n.a (557.0, n.a)	n.a (406.0, n.a)	n.a (5550.0, n.a)	n.a (129.0, n.a)	
	intensitat baixa	13	4.0 (18.0 <sup>a</sup> , n.a)	27.0 (60.0 <sup>a</sup> , n.a)	29.0 (42.0 <sup>a</sup> , n.a)	n.a	n.a	
Weuve et al, 2006	nounats	intensitat mitjana	24	28.0(61.0 <sup>a</sup> , n.a)	307.0(614.0 <sup>a</sup> , n.a)	286.0 (611.0 <sup>a</sup> , n.a)	n.a	n.a
		intensitat alta	17	86.0(171.0 <sup>a</sup> , n.a)	555.0 (844.0 <sup>a</sup> , 3492.0)	598.0 (906.0 <sup>a</sup> , 3376.0)	n.a	n.a

n.a: no avaluat en el treball

<sup>a</sup> percentil 75

### 1.2.6.2 Exposició ocupacional

Altres tipus de poblacions de risc són aquelles que presenten contaminació per alts nivells d'exposició a DEHP dins l'àrea ocupacional. L'exposició ocupacional pel DEHP es pot donar via inhalació o per contacte dèrmic, sobretot en processos industrials de producció del DEHP o en els que s'utilitza el DEHP per a la fabricació d'altres productes. Hi ha certa preocupació pels efectes que pot ocasionar en els testicles, la fertilitat i els ronyons degut a una exposició continuada. Aquest grau de preocupació queda reflectit en diferents estudis (Pan et al, 2006; Gaudin et al, 2008; Hines et al, 2009a; Gaudin et al, 2011; Hines et al, 2011).

Un resum dels nivells dels metabòlits del DEHP obtinguts en diferents estudis d'exposició ocupacional es mostren a la taula 1.6. Gaudin i col·laboradors han recollit l'exposició de treballadors d'indústries de PVC i de plastisols de PVC (Gaudin et al, 2008; Gaudin et al, 2011). Com es pot observar en la taula, les concentracions dels metabòlits en els treballadors exposats són més elevades que en el grup control (no exposats) i especialment, les mostres recollides després de la jornada laboral són les que contenen les concentracions dels metabòlits més elevades. Amb tot, les dades també queden confirmades per altres treballs (Pan et al, 2006; Park et al, 2010).

Hines i col·laboradors han dut a terme un estudi en el què avaluaven l'exposició a DEHP en diferents fàbriques (Hines et al, 2009a). Les concentracions dels metabòlits de DEHP eren significativament més elevades en les indústries de PVC i en general, les concentracions augmentaven després de la jornada laboral (veure taula 1.7).

Finalment, per tal de prevenir i protegir al màxim els treballadors i donada la important contribució de l'entorn ocupacional a l'exposició a DEHP, són



encara necessaris més estudis per clarificar les claus de l'exposició i els sectors ocupacionals de més risc.

**Taula 1.6** Mediane sense ajustar (percentil 95) de les concentracions dels metabòlits de DEHP en treballadors d'indústries que utilitzen materials amb DEHP .

Referència	Treballadors (període)	n	Concentració de metabòlits de DEHP en orina (mediana, ng/ml)				
			MEHP	MEHHP	MEOHP	5cx-MEPP	2cx-MMHP
Pan et al, 2006	Exposats	74	562.3 (5379.7)	n.a	n.a	n.a	n.a
	No exposats	63	5.4 (23.2)	n.a	n.a	n.a	n.a
Gaudin et al, 2008	Exposats (prejornada)	25	16.1 (n.a)	n.a	n.a	37.6 (n.a)	n.a
	Exposats (postjornada)	25	55.9 (n.a)	n.a	n.a	103.7 (n.a)	n.a
	No exposats (prejornada)	19	12.0 (n.a)	n.a	n.a	38.1 (n.a)	n.a
	No exposats (postjornada)	19	10.4 (n.a)	n.a	n.a	11.4 (n.a)	n.a
Park et al, 2010	Exposats (prejornada)	25	7.51 (n.a)	33.0 (n.a)	13.7 (n.a)	n.a	n.a
	Exposats (postjornada)	25	10.4 (n.a)	43.4 (n.a)	15.2 (n.a)	n.a	n.a
Gaudin et al, 2011	Exposats (prejornada)	262	12.6 (97.9)	n.a	n.a	38.6 (306.0)	n.a
	Exposats (postjornada)	259	28.7 (240.0)	n.a	n.a	84.4 (567.0)	n.a
	No exposats (prejornada)	143	4.8 (24.3)	n.a	n.a	15.1 (102.3)	n.a
	No exposats (postjornada)	139	4.7 (27.0)	n.a	n.a	12.4 (101.0)	n.a

n.a: no avaluat en el treball

**Taula 1.7** Concentracions sense ajustar dels metabòlits de DEHP en treballadors d'indústries de diferents sectors (ng/ml) (Hines et al, 2009a).

	Indústria ftalat		PVC		Filtres vehicle		Producció PVC		Goma		Goma (calçat)		Goma (empaquetadora)		Saló cosmètica (exposició comú)	
n	9	9	25	25	18	18	12	12	25	25	21	21	20	20	25	26
Període	Mig	Fí	Mig	Fí	Mig	Fí	Mig	Fí	Mig	Fí	Mig	Fí	Mig	Fí	Mig	Fí
<b>MEHP</b>																
Mediana	6.1	7.6	26.7	37.3	10.1	11.1	22.6	29.2	5.3	7.6	5.4	12.5	14.2	22.3	10.2	23.0
Mínim	3.5	2.0	2.0	<LD	3.3	2.9	<LD	<LD	1.2	1.3	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Màxim	21.7	27.9	186.0	257.0	196.0	66.7	112.0	220.0	151.0	107.0	36.0	117.0	131.0	161.0	266.0	1830.0
<b>MEHHP</b>																
Mediana	45.1	54.9	224.0	282.0	35.8	45.4	190.0	289.0	30.1	34.3	60.8	106.0	50.4	74.8	12.5	21.3
Mínim	11.4	9.9	45.8	11.8	6.5	11.4	8.5	16.2	7.4	6.3	6.4	9.1	1.6	1.2	3.3	<LD
Màxim	118.0	196.0	1230.0	3090.0	427.0	294.0	565.0	1040.0	899.0	891.0	1060.0	1640.0	1090.0	1820.0	338.0	10800.0
<b>MEOHP</b>																
Mediana	34.2	36.8	111.0	148.0	28.1	36.6	131.0	200.0	18.4	22.1	37.5	70.0	31.3	42.4	8.1	12.2
Mínim	8.6	6.8	26.6	7.0	7.2	8.3	4.7	8.0	3.8	4.6	3.9	4.9	1.1	<LD	<LD	<LD
Màxim	73.6	121.0	648.0	1490.0	244.0	179.0	327.0	675.0	571.0	552.0	701.0	1100.0	915.0	1130.0	205.0	6750.0
<b>5cx-MEPP</b>																
Mediana	n.a.	n.a.	22.0	283.0	n.a.	n.a.	286.0	391.0	47.7	51.4	75.4	132.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Mínim	n.a.	n.a.	47.9	23.0	n.a.	n.a.	12.8	22.4	11.5	15.1	10.3	13.8	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Màxim	n.a.	n.a.	1430.0	2030.0	n.a.	n.a.	998.0	1080.0	486.0	497.0	2840.0	3520.0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Mig: a la meitat de la jornada laboral

Fí: al final de la jornada laboral

n.a: no avaluat en el treball

LD: límit de detecció

### 1.2.7 Toxicitat

Els estudis de toxicitat del DEHP s'han realitzat en animals de laboratori. El fetge, els ronyons i majoritàriament els testicles són els òrgans que es poden veure més afectats per la seva exposició. Propietats com les d'interferent endocrí i la possible carcinogènesi són la principal preocupació de les organitzacions internacionals reguladores i el motiu d'estudi de molts grups d'investigació.

Diferents estudis han demostrat que, per via oral a certes dosis, el DEHP origina defectes a nivell reproductiu en néixer i infertilitat. Aquests estudis s'han realitzat en animals rosegadors i tots ells han presentat toxicitat testicular dependent de l'edat (Gray et al, 2000; Moore et al, 2001; Blystone et al, 2010). Aquest efecte no s'ha observat en altres primats diferents dels humans. Malgrat la manca d'estudis en humans, els nounats poden ser susceptibles a diferents síndromes testiculars si estan exposats a altes dosis de DEHP. Aquest possible efecte tòxic en nounats és degut a què els nivells als que s'indueixen efectes tòxics en rosegadors són del mateix ordre dels que experimenten alguns nounats en determinades pràctiques mèdiques.

S'ha estudiat que el DEHP origina tumors de fetge en rosegadors exposats a altes dosis. El mecanisme tumoral és específic (receptors activadors de la proliferació de peroxisomes) i no és el rellevant en el cas dels humans. Així, el DEHP es considera no carcinogen pels humans (IARC, 2000; EC, 2002). Altres efectes adversos i tòxics del DEHP estudiats i que, per falta de dades, no estan del tot confirmats en la salut humana, es presenten a la taula 1.8.

**Taula 1.8** Efectes adversos del DEHP

Toxicitat	Referència
Genotoxicitat/mutagenia	EC, 2008
Immunotoxicitat	Jaakkola et al, 1999; Larsen et al, 2001
Toxicitat aguda	EC, 2008
Irritació, sensibilització	EC, 2008
Nefrotoxicitat	Crocker et al, 1988
Toxicitat pulmonar	Huber et al, 1996
Hepatotoxicitat	Shneider et al, 1991; Plonait et al, 1993

### 1.2.8 Legislació i salut pública

Degut als possibles efectes tòxics i a la possible incidència sobre la salut pública del DEHP, les diferents organitzacions governamentals han regulat la seva utilització des de fa anys. Les legislacions dels diferents estats s'han establert a partir de l'elaboració d'extensos informes que tenen en compte els treballs publicats sobre nivells d'exposició, de toxicitat i d'efectes adversos.

D'acord amb els efectes sobre la fertilitat i el desenvolupament, el DEHP està classificat com a tòxic per a la salut segons la directiva 2001/59/EC (2001/59/EC). El DEHP es descriu com a categoria 2 R60, pel que fa als efectes en la fertilitat i com a categoria 2 R61, per la toxicitat en el desenvolupament. A partir de les dades de diferents estudis de toxicitat a nivell reproductiu l'índex del nivell sense efecte advers observat (NOAEL) establert pel DEHP via administració oral és de 4,8 mg/kg dia. En el cas de la Ingesta Diària Tolerable (IDT) és de 48 µg/kg dia amb un factor de seguretat de 100 en el cas dels adults i de 20 µg/kg dia amb un factor de seguretat de 250 pels nomenats i infants fins a l'any (EC, 2004; EFSA, 2005;

EC, 2007a; EC, 2008). Pel que fa a la legislació americana el IDT és de 600 µg/kg dia per via intravenosa.

El DEHP és l'únic plastificant que apareix a la llista de la Farmacopea Europea i que pot formar part de productes farmacèutics i mèdics. En aquest sentit, l'ús del DEHP en els dispositius mèdics està permès i fins i tot, alguns informes remarquen que les avantatges que proporciona són superiors als inconvenients (EC, 2002).

La vulnerabilitat de la població infantil al DEHP va portar a prohibir-ne totalment el seu ús en joguines i cosmètics. A més, es va restringir en la indústria alimentària. Aquesta legislació és vigent a la UE des del 2005 i als EUA des del 2008 (2005/84/EC; EFSA, 2005; CE,2007b).

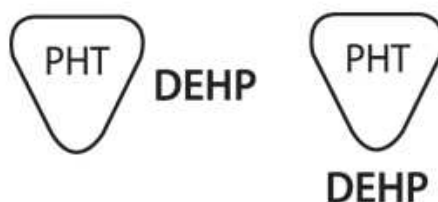
En conclusió, els avantatges que proporciona l'ús del DEHP són majors als possibles efectes sobre la salut, però a poc a poc, s'està minimitzant el seu ús i s'estan buscant alternatives, principalment dins l'entorn hospitalari.

### **1.2.9 Alternatives al PVC**

El PVC, i el DEHP com a plastificant, s'utilitzen en les bosses per emmagatzemar sang degut a les bones característiques de durabilitat, alta resistència en condicions de fred o calor, flexibilitat, transparència, manteniment de la flexibilitat de la membrana dels eritròcits, bona preservació d'aquests últims, entre moltes altres... (AuBuchon, et al 1988; Hess et al; 2002; Labow et al, 1987).

Les múltiples preocupacions referents a la toxicitat del DEHP han iniciat la cerca d'alternatives a l'ús del PVC (Simmchen et al, 2012). A més a més, d'acord amb la directiva europea 2007/47/EC, qualsevol tipus de material

mèdic que contingui DEHP cal que estigui marcat correctament amb uns símbols establerts (CEN, 2010; EC, 2007c) (figura 1.4).



**Figura 1.4** Símbols pel marcatge de material mèdic que conté DEHP.

Alguns materials ja s'han començat a modificar, per exemple les bosses utilitzades per a les infusions via parenteral, on el DEHP ha quedat substituït per altres plastificants (Sampson et al, 2011), o els revestiments d'heparina que ara s'utilitzen en els tubs quirúrgics. En el cas de les transfusions que es fan en nounats, s'intenta realitzar-les amb productes que siguin el més frescos possibles per tal de minimitzar la concentració del DEHP dins de la bossa durant l'emmagatzematge.

Les alternatives al DEHP que han anat sorgint són: butiril-trihexil-citrat (BTHC), tri-(2etilhexil)trimelitat (TEHTM), dietilhexiladipat (DEHA), diisononil èster de l'àcid ciclohexanedicarboxílic (DINCH), a més d'altres tipus de polímers com l'etilvinilacetat (EVA), les poliolefines, els poliuretans (PU) o els fluoropolímers.

Per les bosses que contenen plaquetes, el TEHTM presenta bones característiques respecte a la permeabilitat però és un plastificant menys eficient que el DEHP, ja que al polímer li cal més quantitat de plastificant per assolir la mateixa flexibilitat (Estep et al, 1984). El BTHC permet una bona conservació dels eritròcits fins a 35 dies a 4°C però el seu principal inconvenient és el seu preu elevat (Högman et al, 1991; Draper et al, 2002).

Altres alternatives com el DINCH preserven correctament els eritròcits i a més a més, tenen menys potencial de migració cap al medi.

Respecte als altres tipus de polímers, aquests acostumen a tenir uns preus força elevats, per bé que les bosses de sang d'EVA ja estan exteses al mercat. Una de les dificultats a l'hora de cercar bosses de diferent naturalesa és que cal garantir les propietats i la qualitat en tot tipus d'aplicació dins la medicina de la transfusió (Scott, et al 2005). A més, el processament de les bosses de sang de PVC implica uns costos baixos que fan complicat el canvi a un altre tipus de bosses dins la indústria del material mèdic.

En definitiva, la recerca de materials alternatius és constant i motiu d'estudi de molts grups d'investigació. El més important és generar les dades toxicològiques suficients per a que els nous productes puguin ser acceptats després de valorar correctament els seus riscos i beneficis.

### **1.2.10 Detecció dels metabòlits del DEHP en fluids biològics**

La preocupació pels possibles efectes sobre la salut dels ftalats, sobretot del DEHP, ha originat la necessitat de monitoritzar l'exposició de la població a aquest compost. Tal i com ja s'ha descrit en l'apartat 1.2.4, la monitorització de l'exposició es realitza amb l'avaluació dels nivells dels metabòlits dels ftalats en espècimens humans o amb la del contingut dels plastificants en els productes. Als darrers anys s'han desenvolupat diferents metodologies que permeten la quantificació del DEHP o dels seus metabòlits en diferents matrius com l'orina o el sèrum humà (veure taula 1.9), en la llet materna (Calafat et al, 2004b; Högberg et al, 2008; Hines et al, 2009b), en aigües (Luks et al, 2001; Hashizume et al, 2002; Saito et al, 2002; Leivadara et al, 2008), en productes de consum, en aliments (llet, preparats per a nadons...)



(Mortensen et al, 2005), en el material hospitalari (Gerlai et al, 1987; Dine et al, 1991; Kambia et al, 2001; Inoue et al, 2003b; Inoue et al, 2005; Takatori et al, 2008)...etc. La cromatografia líquida (CL) o de gasos (CG) i l'espectrometria de masses (EM) són les tècniques més utilitzades per a la separació, detecció i quantificació d'aquestes substàncies. Abans de l'anàlisi cal una etapa prèvia de preparació i extracció dels analits de la mostra. Les diferents tècniques de preparació i d'anàlisi en fluids biològics descrites a la literatura i desenvolupades per diferents grups es revisen breument a continuació.

### **1.2.10.1 Tractament de la mostra**

En l'etapa de preparació de la mostra té lloc l'extracció i concentració dels analits, a més de l'eliminació d'altres compostos de la matriu que poden interferir en els processos posteriors d'anàlisi. Els protocols d'extracció aplicats han de garantir una bona recuperació de l'analit al final de tot el procés. Els mètodes d'extracció difereixen en funció del volum de mostra disponible, la matriu i les característiques de l'instrument emprat per a la detecció final.

En el cas dels metabòlits de DEHP, com que s'excreten en forma glucuronoconjugada, és indispensable una primera etapa d'hidròlisi d'aquests conjugats abans de qualsevol procés d'extracció. Diferents estudis han avaluat la capacitat d'hidròlisi de diferents tipus d'enzims. L'enzim que proporciona l'alliberació dels metabòlits de DEHP en forma lliure de manera més efectiva i sense generar altres compostos interferents és la  $\beta$ -glucuronidasa procedent de l'*E.coli*. S'ha demostrat que aquest enzim no té activitat esterasa, de manera que no genera cap contaminació addicional a la mostra. En aquest sentit, cal evitar enzims que puguin hidrolitzar el DEHP present en la mostra cap a MEHP i crear una contaminació deguda a aquest

compost no controlada. Està descrit que enzims com la  $\beta$ -glucuronidasa procedent de *H. pomatia* sí que presenten aquest tipus de comportament no desitjat (Blount et al, 2000b). Pel procediment d'hidròlisi cal tamponar la mostra a pH 6.5-7, per exemple amb tampó acetat amònic i posteriorment, incubar-la amb l'enzim a 55°C o 37°C durant una hora o hora mitja, respectivament (Blount et al, 2000b; Kato et al, 2003; Koch et al, 2003c; Silva et al, 2003b). Darrerament, Solymos i col·laboradors han comprovat que la hidròlisi enzimàtica del MEHP, MEHHP i MEOHP en un mil·lilitre d'orina es pot completar en 10 minuts a temperatura ambient (Solymos et al, 2011b).

Els mètodes d'extracció convencionals són l'extracció líquid-líquid i l'extracció en fase sòlida. Darrerament i degut a les millores en la sensibilitat dels instruments, estan guanyant terreny protocols com l'extracció on line o la injecció directa de la mostra al cromatògraf. A vegades també s'apliquen més d'un tipus de procediment de manera consecutiva per la necessitat d'obtenir un extracte final més net (Blount et al, 2000b; Silva et al, 2003b; Mortensen et al, 2005; Högberg et al, 2008).

Per a l'extracció líquid-líquid s'utilitzen disolvents orgànics com l'acetat d'etil, el ciclohexà, l'heptà i l'acetonitril; aquest últim afavoreix la precipitació de les proteïnes de la mostra (Kambia et al, 2001; Buchta et al, 2003). L'extracció amb el disolvent s'acostuma a realitzar un parell de vegades per recuperar el màxim d'analit. La fase orgànica s'evapora a sequedat sota corrent de nitrogen i el residu sec es dissol amb una mescla, generalment d'aigua i de disolvent orgànic, per a què pugui ser analitzat després.

Per a l'extracció en fase sòlida s'utilitzen en la majoria dels casos columnes amb sorbents de fase reversa o columnes de naturalesa polimèrica com les d'estirè-divinilbenzè (Blount et al, 2000b; Inoue et al, 2003b; Kato et al, 2003; Silva et al, 2003b). El procediment a seguir consta de varies etapes: acondicionament de la columna amb acetonitril o metanol i aigua; càrrega de la mostra acidificada a la columna; rentat amb aigua i metanol i en darrer lloc,

L'elució dels analits amb acetonitril o acetat etil. L'elúit orgànic obtingut s'evapora sota corrent de nitrogen i l'extracte sec es dissol per ser analitzat. L'extracció en columnes d'aquest tipus origina extractes nets perquè una gran part de compostos interferents no queden retinguts a la matriu. En canvi, els analits es retenen sempre que la mostra s'hagi acidificat prèviament (pH 2) abans de carregar-se a la columna.

En diferents treballs apareix descrita la metodologia d'extracció on line o de "column switching" (Koch et al, 2003c; Inoue et al, 2003b; Preuss et al, 2005; Gaudin et al, 2008) que redueix el número d'etapes de manipulació de la mostra i així evita part de contaminació analítica, aspecte especialment crític quan l'analit és el DEHP, ja que està present arreu com a contaminant ambiental. Per la naturalesa d'aquest tipus d'extracció el sistema de separació cromatogràfica que té enllaçat és de cromatografia líquida.

L'objectiu principal de tots els procediments d'extracció citats és aconseguir un extracte final net minimitzant la presència d'interferents i la supressió iònica en l'EM, amb la mínima manipulació possible de la mostra d'orina o de sèrum...etc; d'aquesta manera s'optimitza la sensibilitat.

### **1.2.10.2 Separació cromatogràfica i sistemes de detecció**

La disponibilitat de les tècniques i dels equips d'instrumentació per a la separació i detecció dels compostos, així com la seva sensibilitat i robustesa ha millorat amb el temps. Als anys 70 i 80 la cromatografia de gasos era la tècnica més utilitzada per a la separació del DEHP i del seu monoèster MEHP (Marcel et al, 1973; Albro et al, 1984; Sjöberg et al 1985). En aquesta tècnica la separació dels analits té lloc en la columna del cromatògraf de gasos. Les columnes emprades acostumen a ser columnes capilars de 100% metilpolisiloxà (Kessler et al, 2001) o 5% difenil-metilpolisiloxà (Buchta et al,

2003; Kondo et al, 2010). L'aplicació d'un gradient de temperatures en el cromatògraf i el grau d'afinitat dels analits per la fase estacionària permet la seva separació. Generalment el gradient s'inicia amb una isoterma d'entre 175°C i 190°C, per continuar amb una rampa d'uns 20-30°C/min que acabarà als 280°C o 300°C. El DEHP pot ser analitzat directament per CG, en el cas del monoèster MEHP cal una derivatització prèvia per exemple amb pentafluoropropanolol o diazometà, per millorar el seu comportament cromatogràfic (Sjöberg et al, 1985; Kessler et al, 2001; Kondo et al, 2010). Respecte als sistemes de detecció acoblats als cromatògrafs de gasos se n'han utilitzat diversos: detector de captura d'electrons, detector d'ionització de flama (Albro et al, 1984), espectròmetre de masses amb ionització química o amb ionització per impacte electrònic (Sjöberg et al, 1985; Buchta et al 2003).

Amb els anys, es va considerar que els diferents metabòlits oxidats en orina del DEHP eren millors marcadors de la seva exposició. Per això, les tècniques analítiques es van anar millorant i adaptant per tal de cobrir també la determinació d'aquests compostos. Els primers en analitzar els metabòlits oxidats van ser Koch i els seus col·laboradors (Koch et al, 2003c). D'altra banda, a l'any 2005 es va presentar el primer estudi que quantificava 5cx-MEPP i identificava 2cx-MMHP en mostres d'orina (Preuss et al, 2005).

La millora tecnològica ha permès que l'acoblament de la separació per CL amb l'EM sigui actualment l'eina analítica més utilitzada. Els primers estudis utilitzaven la CL amb detectors de llum ultraviolada (UV) per l'anàlisi de DEHP i MEHP (Dine et al, 1991; Gerlai et al, 1987; Faouzi et al, 1999; Kambia et al, 2001), però l'ús de l'EM en tàndem per detectar ftalats i els seus metabòlits ja està descrit des de principis del 2000. Els procediments utilitzen columnes i elució per gradient amb fases mòbils d'aigua acidificada i majoritàriament acetonitril com a modificador orgànic. Pel que fa al tipus d'ionització fet servir pels espectròmetres de masses acostuma a ser per

electrosprai (ESI). Finalment, els límits de detecció obtinguts per moltes publicacions se situen per sota d'1 ng/ml dels metabòlits de DEHP en orina.

La injecció directa de la mostra al sistema cromatogràfic és un altre procediment. Solymos i els seus col·laboradors descriuen la quantificació de MEHP, MEHHP, MEOHP en mostres d'orina (Solymos et al, 2011a; Solymos et al, 2011b).

A la taula 1.9 es presenten les condicions descrites a la literatura de preparació i anàlisi de DEHP i metabòlits per CL-EM/EM.

**Taula 1.9** Procediments d'extracció i condicions de CL-EM/EM per l'anàlisi de DEHP i metabòlits descrits a la literatura.

Referència	Analít	Matriu	Extracció	Columna cromatogràfica	Fase mòbil	Mode ionització
Blount et al, 2000b	MEHP	orina	fase sòlida	phenyl (5µm x 50mm x 3mm)	aigua (tampó acetat amoniac 6mM) actonitril	APCI
Inoue et al, 2003a	DEHP	solucions intravenoses	líquid-líquid on line (silica-avidina)	precolumna RP C18 (5µm x 2mm x 5mm) RP C18 (5µm x 100mm x 2mm)	aigua actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI positiu
Inoue et al, 2003b	DEHP MEHP	plasma sèrum boví	on line (RP)	precolumna RP C18 (5µm x 2mm x 5mm) RP C18 (5µm x 100mm x 2mm)	aigua actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu ESI positiu
Kato et al, 2003	MEHP	sèrum	fase sòlida	phenyl (5µm x 50mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril	ESI negatiu
Koch et al, 2003c	DEHP MEHP	orina	on line (RP C8)	precolumna fenylpropyl 4mm x 3mm phenylhexyl (3µm x 150mm x 4.6mm)	metanol 10% actonitril en aigua 1% àcid acètic 90% actonitril en aigua 1% àcid acètic	ESI negatiu
Silva et al, 2003a	MEHP	sèrum	fase sòlida	phenyl (5µm x 50mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	APCI
Silva et al, 2003b	MEHP MEHHP MEOHP	orina	fase sòlida	phenyl (5µm x 50mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	APCI
Kato et al, 2004	MEHP MEHHP MEOHP	orina sèrum	fase sòlida	phenyl (5µm x 50mm x 2mm)	aigua actonitril	ESI negatiu
Silva et al, 2004c	MEHP MEHHP MEOHP	orina	fase sòlida	phenyl (3µm x 100mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Takatori et al, 2004	DEHP MEHP	sèrum	líquid-líquid	ODS C18, (3µm x 100mm x 2mm)	aigua (0.05% àcid acètic) actonitril	ESI negatiu ESI positiu
Kato et al, 2005b	MEHHP MEOHP	orina	fase sòlida	phenyl (3µm x 100mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Mortensen et al, 2005	MEHP	llet	líquid-líquid fase sòlida	phenyl (3µm x 100mm x 2.1mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Preuss et al, 2005	MEHP MEHHP MEOHP 5cc-MEPP 2cc-MMHP	orina	on line (RP C8)	precolumna fenylpropyl 4mm x 3mm phenylhexyl (3µm x 150mm x 4.6mm)	metanol 10% actonitril en aigua 1% àcid acètic 90% actonitril en aigua 1% àcid acètic	ESI negatiu
Silva et al, 2005a	MEHP MEHHP MEOHP	saliva	fase sòlida	phenyl (3µm x 100mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Silva et al, 2005b	MEHP MEHHP MEOHP	sèrum	fase sòlida	phenyl (3µm x 100mm x 2.1mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu

**Taula 1.9 (continuació)** Procediments d'extracció i condicions de CL-EM/EM per l'anàlisi de DEHP i metabòlits descrits a la literatura.

Referència	Analís	Matriu	Extracció	Columna cromatogràfica	Fase mòbil	Mode ionització
Silva et al, 2006b	MEHP MEHHP MEOHP 5 $\alpha$ -MEPP 2 $\alpha$ -MMHP	orina	fase sòlida	phenyl (3 $\mu$ m x 100mm x 2.1mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	APCI
Itoh et al, 2007	MEHP MEHHP MEOHP 5 $\alpha$ -MEPP 2 $\alpha$ -MMHP	orina	fase sòlida	phenyl (3 $\mu$ m x 100mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Silva et al, 2007	MEHP MEHHP MEOHP 5 $\alpha$ -MEPP	orina	on line (RP C18)	phenyl (3 $\mu$ m x 150mm x 2.1mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Gaudin et al, 2008	MEHP 5 $\alpha$ -MEPP	orina	on line (RP C18)	precolumna fenilpropyl 4mm x 3mm phenyl (80Å x 150 x 25mm <sup>2</sup> )	aigua:metanol (70:30), 0.05% àcid acètic aigua:actonitril (5:95), 0.05% àcid acètic	ESI negatiu
Takatori et al, 2008	DEHP MEHP	catèters solucions intravenoses	líquid-líquid	ODS C18, (3 $\mu$ m x 150mm x 2mm)	aigua (0.0005% àcid acètic) actonitril	ESI negatiu ESI positiu
Samandar et al, 2009	MEHP MEHHP MEOHP 5 $\alpha$ -MEPP 2 $\alpha$ -MMHP	orina	on line (RP C18)	phenyl (3 $\mu$ m x 150mm x 2.1mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Frederiksen et al, 2010	MEHP MEHHP MEOHP 5 $\alpha$ -MEPP	orina	fase sòlida	C18 phenyl (4 $\mu$ m x 75mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic) actonitril (0.1% àcid acètic)	ESI negatiu
Anderson et al, 2011	MEHP MEHHP MEOHP 5 $\alpha$ -MEPP	orina	on line (RP C18)	C18 phenyl (4 $\mu$ m x 250mm x 3mm)	aigua metanol (0.25% àcid acètic) metanol	ESI negatiu
Solymos et al, 2011a	MEHP	orina	injecció directa	precolumna C <sub>6</sub> phenyl (4mm x 2mm)	aigua (0.1% àcid acètic, 5mM acetat amònic)	ESI negatiu
Solymos et al, 2011b	MEHHP MEOHP			C <sub>6</sub> phenyl (3 $\mu$ m x 100mm x 2mm)	actonitril	





### 1.3 Referències bibliogràfiques

- Adibi, J. J.,** Whyatt, R. M., Williams, P. L., Calafat, A. M., Camann, D., Herrick, R., Nelson, H., Bhat, H. K., Perera, F. P., Silva, M. J., Hauser, R. (2008) Characterization of phthalate exposure among pregnant women assessed by repeat air and urine samples. *Environ Health Perspect.*, 116, 467-473.
- Adibi, J. J.,** Hauser, R., Williams, P. L., Whyatt, R. M., Calafat, A. M., Nelson, H., Herrick, R. and Swan, S. H. (2009) Maternal urinary metabolites of Di-(2-Ethylhexyl) phthalate in relation to the timing of labor in a US multicenter pregnancy cohort study. *Am.J Epidemiol.*, 169, 1015-1024.
- Albro, P. W.,** Thomas, R., Fishbein, L. (1973) Metabolism of diethylhexyl phthalate by rats. Isolation and characterization of the urinary metabolites. *J Chromatogr.*, 76, 321-330.
- Albro, P. W.** (1975) The metabolism of 2-ethylhexanol in rats. *Xenobiotica*, 625-36.
- Albro, P. W,** Corbett, J. T., Schroeder, J. L., Jordan, S., Matthews, H. B. (1982) Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect.*, 45, 19-25.
- Albro, P. W.,** Jordan, S., Corbett, J. T., Schroeder, J. L. (1984) Determination of Total Phthalate in Urine by Gas Chromatography. *Anal Chem.*, 56, 247-250.
- Anderson, W. A.,** Castle, L., Hird, S., Jeffery, J., Scotter, M. J. (2011) A twenty-volunteer study using deuterium labelling to determine the kinetics and fractional excretion of primary and secondary urinary metabolites of di-2-ethylhexylphthalate and di-iso-nonylphthalate. *Food Chem.Toxicol.*, 49, 2022-2029.
- Andrady, A. L.,** Neal, M. A. (2009) Applications and societal benefits of plastics. *Phil Trans R Soc B.*, 364, 1977-1984.
- Angerer, J.,** Bird, M. G., Burke, T. A., Doerrer, N. G., Needham, L., Robison, S. H., Sheldon, L., Zenick, H. (2006) Strategic biomonitoring initiatives: moving the science forward. *Toxicol Sci.*, 93(1), 3-10.

**APME**, Association of Plastics Manufacturers Europe. (2011) Plastics - the Facts 2011: An analysis of European plastics production, demand and recovery for 2010.

<http://www.plasticseurope.co.uk/Document/plastics---the-facts-2011.aspx?Page=DOCUMENT&FolID=2>

**Arndt, P. A.**, Kumpel, B. M. (2008) Blood doping in athletes--detection of allogeneic blood transfusions by flow cytometry. *Am.J Hematol.*, 83, 657-667.

**Astrand, P. O.**, Rodahl, K. (1987) Textbook of work physiology, McGraw-Hill Inc., New York.

**AuBuchon, J. P.**, Estep T. N., Davez, R. J. (1988) The effect of the plasticizer di-(2-ethylhexyl)phtalate on the survival of stored RBC's. *Blood*, 71, 448-452.

**Bakker, J.**, (1977) C. R. Valeri Blood Banking and the Use of Frozen Blood Products. *Vox Sanguinis.*, 32, 324.

**Barr, D. B.**, Silva, M. J., Kato, K., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hurtz, D., Sadowski, M., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2003) Assessing human exposure to phthalates using monoesters, and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ Health Perspect.*, 111, 1148-1151.

**Becker, K.**, Seiwert, M., Angerer, J., Heger, W., Koch, H. M., Nagorka, R., Roskamp, E., Schluter, C., Seifert, B., Ullrich, D. (2004) DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Environ Health.*, 207, 409-417.

**Becker, K.**, Goen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuss., H., Muller, J., Wittassek, M., Schulz, C., Kolossa-Gehring, M. (2009) GerES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health.*, 212(6), 685-692.

**Bell, R. D.**, Card, R. T., Johnson, M. A., Cunningham, T. A., Baker, F. (1976) Blood doping and athletic performance. *Austr.J.Sports Med.*, 8, 133-139.

**Berglund, B.**, Hemmingsson, P., Birgegard, G. (1987a) Detection of autologous blood transfusion in cross-country skiers. *Int.J.Sports Med.*, 8, 66-70.

- Berglund, B.**, Hemmingsson, P. (1987b) Effect of reinfusion of autologous blood on exercise performance in cross-country skiers. *Int.J.Sports Med.*, 8, 231-233.
- Berglund, B.** (1988) Development of techniques for the detection of blood doping in sport. *Sports Med.*, 5, 127-135.
- Blount, B. C.**, Silva, M. J., Caudill, S. P., Needham, L. L., Pirkle, J. L., Sampson, E. J., Lucier, W., Jackson, R. J., Brock, J. W. (2000a) Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect.*, 108(10), 979–982.
- Blount, B. C.**, Milgram, K. E., Silva, M. J., Malek, N. A., Reidy, J. A., Needham, L. L., Brock, J. W. (2000b) Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal.Chem.*, 72, 4127-4134.
- Blystone, C. R.**, Kissling, G. E., Bishop, J. B., Chapin, R. E., Wolfe, G. W., Foster, P. M. D. (2010) Determination of the di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) NOAEL for reproductive development in the rat: importance of the retention of extra animals to adulthood. *Toxicology Sciences.*, 116, 640–646.
- Braun, J.M.**, Kalkbrenner, A.E, Calafat, A.M, Bernert, J.T, Ye, X, Silva, M.J, Barr, D.B., Sathyanarayana, S., Lanphear, B.P. (2011) Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy. *Environ Health Perspect.*, 119(1), 131-137.
- Brien, A. J.**, Harris, R. J., Simon, T. L. (1989) The effects of an autologous infusion of 400 mL red blood cells on selected hematological parameters and 1500 m race time in highly trained runners. *Brain Med.Bull.*, 11, 6-16.
- Buchta, C.**, Bittner, C., Hocker, P., Macher, M., Schmid, R., Seger, C., Dettke, M. (2003) Donor exposure to the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate during plateletpheresis. *Transfusion*, 43, 1115-1120.
- Buick, F. J.**, Gledhill, N., Froese, A. B., Meyers, E. C. (1980) Effect of induced erythrocythemia on aerobic work capacity. *J.Appl.Physiol.*, 48, 636-642.
- Calafat, A. M.**, Needham, L. L., Silva, M. J., Lambert, G. (2004a) Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics*, 113(5), 429-434.

- Calafat, A. M.,** Slakman, A. R., Silva, M. J., Herbert, A. R., Needham, L. L. (2004b) Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 805, 49-56.
- Calbet, J. A.,** Lundby, C., Koskolou, M., Boushel, R. (2006) Importance of hemoglobin concentration to exercise: acute manipulations. *Respir Physiol Neurobiol.*, 151(2-3), 132-140.
- Carlstedt, F.,** Jönsson, B.A., Bornehag, C.G. (2012) PVC flooring is related to human uptake of phthalates in infants. *Indoor Air.* doi: 10.1111/j.1600-0668.2012.00788.x.
- Celsing, F.,** Svedenhag, J., Pihlstedt, P., Ekblom, B. (1987) Effects of anaemia and stepwise-induced polycythaemia on maximal aerobic power in individuals with high and low haemoglobin concentrations. *Acta Physiol. Scand.*, 129, 47-54.
- CEN.** (2010) European Committee for Standardization. Symbol for use in the labelling of medical devices - Requirements for labelling of medical devices containing phthalates, EN 15986:2011.
- <http://www.cen.eu/CEN/Sectors/TechnicalCommitteesWorkshops/CEN/TechnicalCommittees/Pages/Standards.aspx?param=581003&title=CEN/CLC/TC+3>
- Chou, K.,** Wright, R. O. (2006) Phthalates in food and medical devices. *J Med Toxicol.*, 2 (3), 126-135.
- Clark, K.** (2003) Assessment of Critical Exposure Pathways. *The Handbook of Environmental Chemistry.*, 3Q, 227-262.
- Colacino, J. A.,** Robert, H., Schechter, A. (2010) Dietary Intake Is Associated with Phthalate Body Burden in a Nationally Representative Sample. *Environ Health Perspect.*, 118(7), 998–1003.
- Cottrell, R.** (1979) British army tests blood boosting. *Phys.Sports Med.*, 7, 14-16.
- Crocker, J.,** Safe, S., Acott, P., (1988) Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J.Toxicol. Environ.Health.*, 23, 433-444.
- D'Amici, G. M.,** Rinalducci, S., Zolla. L., (2007) Proteomic Analysis of RBC membrane protein degradation during blood storage. *J Proteome Res.*, 6, 3242-3255.

- Damsgaard, R.**, Munch, T., Morkeberg, J., Mortensen, S. P., Gonzalez-Alonso, J. (2006) Effects of blood withdrawal and reinfusion on biomarkers of erythropoiesis in humans: Implications for anti-doping strategies. *Haematologica*, 91(7), 1006-1008.
- Dine, T.**, Luyckx, M., Cazin, M., Brunet, C., Cazin, J. C., Goudaliez, F. (1991) Rapid determination by high performance liquid chromatography of di-2-ethylhexyl phthalate in plasma stored in plastic bags. *Biomed.Chromatogr.*, 5, 94-97.
- Draper, C. J.**, Greenwalt, T. J. Dumaswala, U. J. (2002) Biochemical and structural changes in RBCs stored with different plasticizers: The role of hexanol. *Transfusion*, 42, 830-835.
- Duty, S.M.**, Calafat, A.M., Silva, M.J., Ryan, L., Hauser, R. (2005a) Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod.*, 20(3), 604-610.
- Duty, S.M.**, Ackerman, R.M., Calafat, A.M., Hauser, R. (2005b) Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environ Health Perspect.*, 113(11), 1530-1535.
- European Food Safety Authority.** (2005) Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) on a request from the commission related to bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) for use in food contact materials. *EFSA Journal*, 243, 1–20.
- <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/243.pdf>
- Ekblom, B.**, Goldbarg, A., Gullbring, B. (1972) Response to exercise after blood loss and reinfusion. *J.Appl.Physiol.*, 33, 175-180.
- Ekblom, B.**, Wilson, G., Astrand, P. O. (1976) Central circulation during exercise after venesection and reinfusion of red cells. *J.Appl.Physiol.*, 40, 379-383.
- Ekblom, B.** (2000) Blood boosting and sport. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.*, 14(1), 89-98.
- Elliott S.** (2008) Erythropoiesis-stimulating agents and other methods to enhance oxygen transport. *Br J Pharmacol.*, 154(3), 529-541.

**Estep, T. N.,** Pedersen, R. A., Miller, T. J., Stupar, K. R. (1984) Characterization of erythrocyte quality during the refrigerated storage of whole blood containing di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Blood*, 64, 1270-1276.

**European Commission.** (2001) Commission Directive 2001/59/EC adapting to technical progress for the 28th time Council Directive 67/548/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labelling of dangerous substances. *Official Journal L*, 225 , 1–333.

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:225:0001:0333:EN:PDF>

**European Commission.** Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices (SCMPMD). (2002) Opinion on Medical Devices Containing DEHP Plasticised PVC; Neonates and Other Groups Possibly at Risk from DEHP Toxicity. Brussels.

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scmp/out43\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scmp/out43_en.pdf)

**European Commission.** Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) (2004) Opinion on the result of a second Risk Assessment of bis(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP). Brussels.

[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/sct/documents/out214\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/sct/documents/out214_en.pdf)

**European Commission.** (2005) Commission Directive 2005/84/EC adapting amending for the 22nd time Council Directive 76/769/EEC on the approximation of the laws, regulations and administrative provisions of the Member States relating to restrictions on the marketing and use of certain dangerous substances and preparations (phthalates in toys and childcare articles). *Official Journal of the European Union*. Strasbourg.

<http://www.dehp-facts.com/upload/documents/webpage/Toys%20restrictions.pdf>

**European Commission.** Scientific Committee on Emerging and Newly-Identified Health Risks (SCENIHR). (2007a) Preliminary report on the safety of medical devices containing DEHP-plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. Brussels.

[http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_008.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_008.pdf)

**Comisión Europea.** (2007b) Directiva 2007/19/CE de la Comisión, por la que se modifican la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios y la Directiva 85/572/CEE del Consejo por la que se determina la lista de los simulantes que se deben utilizar para controlar la migración de los componentes de los materiales y objetos de material plástico destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea* L 91 de 31 de marzo de 2007. Bruselas.

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:097:0050:0069:ES:PDF>

**European Comision.** (2007c) Directive 2007/47/EC amending Council Directive 90/385/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to active implantable medical devices, Council Directive 93/42/EEC concerning medical devices and Directive 98/8/EC concerning the placing of biocidal products on the market. *Official Journal L*, 247 , 21–55.

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:247:0021:0055:en:PDF>

**European Commission.** European Chemicals Bureau. (2008) European Union Risk Assessment Report bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), Volume 80. Luxembourg: *Office for Official Publications of the European Communities*.

<http://www.dehp-facts.com/upload/documents/webpage/DEHP%20RA%20report%20full.pdf>

**Faouzi, M. A.,** Dine, T., Gressier, B., Kambia, K., Luyckx, M., Pagniez, D., Brunet, C., Cazin, M., Belabed, A., Cazin, J. C. (1999) Exposure of hemodialysis patients to di-2-ethylhexyl phthalate. *Int J Pharm.*, 180, 113-121.

**FDA**, US Food and Drug Administration, Public Health Notification (2001) Safety assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) released from polyvinyl chloride (PVC) medical devices. Center of Devices and Radiological Health Rockville, MD.

<http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM080457.pdf>

**Frederiksen, H.**, Skakkebaek, N. E., Andersson, A. M. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Mol.Nutr.Food Res.*, 51, 899-911.

**Frederiksen, H.**, Jorgensen, N., Andersson, A. M. (2010) Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal.Toxicol.*, 34, 400-410.

**Frederiksen, H.**, Aksglaede, L., Sorensen, K., Skakkebaek, N. E., Juul, A., Andersson, A. M. (2011) Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. *Environ Res.* 111, 656-663.

**Fromme, H.**, Gruber, L., Schlummer, M., Wolz, G., Wolz, G., Böhmer, S., Angerer J., Mayer, R., Liebl, B., Bolte, G. (2007a) Intake of phthalates and di(2-ethylhexyl)adipate: results of the Integrated Exposure Assessment Survey based on duplicate diet samples and biomonitoring data. *Environ.Int.*, 33, 1012-1020.

**Fromme, H.**, Bolte, G., Koch, H. M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R., Liebl, B. (2007b) Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health.*, 210, 21-33.

**Frye, A. J.**, Ruhling, R. O. (1977) RBC reinfusion, exercise hemoconcentration, and VO<sub>2</sub>. *Med.Sci.Sports.*, 9, 69.

**Gaudard, A.**, Varlet-Marie, E., Bressolle, F., Audran, M. (2003) Drugs for Increasing Oxygen Transport and Their Potential Use in doping: A Review. *Sports Med.*, 33, 187-212.

**Gaudin, R.**, Marsan, P., Robert, A., Ducos, P., Pruvost, A., Lévi, M., Bouscaillou, P. (2008) Biological monitoring of occupational exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate: survey of workers exposed to plastisols. *Int Arch Occup Environ Health.*, 81(8), 959-966.



- Gaudin, R.**, Marsan, P., Ndaw, S., Robert, A., Ducos, P. (2011) Biological monitoring of exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate in six French factories: a field study. *Int Arch.Occup.Environ Health.*, 84, 523-531.
- Gerlai, I.**, Pintér, J., Pick, J. (1987) Determination of DEHP in blood products stored in plastic bags by HPLC. *Chromatographia.*, 24 (1), 403-406.
- Giraud, S.**, Robinson, N., Mangin, P., Saugy, M. (2008) Scientific and forensic standards for homologous blood transfusion anti-doping analyses. *Forensic Sci Int.*, 179(1), 23-33.
- Göen, T.**, Dobler, L., Koschorreck, J., Muller, J., Wiesmuller, G. A., Drexler, H., Kolossa-Gehring, M. (2011) Trends of the internal phthalate exposure of young adults in Germany-Follow-up of a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg.Environ Health.*, 215, 36-45.
- Goforth, H. W.**, Campbell, N. L., Hogdon, J. A., Sucec, A. A. (1982) Hematologic parameters of trained distance runners following induced erythrocythemia. *Med.Sci.Sports Exerc.*, 14, 174.
- Gore, C. J.**, Parisotto, R., Ashenden, M. J., Stray-Gundersen, J., Sharpe, K., Hopkins, W., Emslie, K. R., Howe, C., Trout, G. J., Kazlauskas, R., Hahn, A. G. (2003) Second-generation blood tests to detect erythropoietin abuse by athletes. *Haematologica.*, 88(3), 333–344.
- Gray, L. E.**, Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D. N. R., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP, but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol.Sci.*, 58, 350 –365.
- Green, R.**, Hauser, R., Calafat, A. M., Weuve, J., Schettler, T., Ringer, S., Huttner, K., Hu, H. (2005) Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ Health Perspect.*, 113, 1222-1225.
- Guo, Y.**, Wu, Q., Kannan, K. (2011) Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environment International.*, 37, 893–898.
- Hashizume, K.**, Nanya, J., Toda, C., Yasui, T., Nagano, H., Kojima, N. (2002) Phthalate esters detected in various water samples and biodegradation of the phthalates by microbes isolated from river water. *Biol.Pharm.Bull.*, 25, 209-214.

- Hauser, R.,** Meeker, J. D., Park, S., Silva, M. J., Calafat, A. M. (2004) Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age. *Environ Health Perspect.*, 112, 1734-1740.
- Health Canada,** (2002) Expert advisory panel on DEHP in medical devices. Health Canada, Medical Devices Bureau, Report 2002 January 11, Ottawa, Canada.
- Hess, J. R.,** Greenwalt, T. G. (2002) Storage of red blood cells: New approaches. *Transfus Med Rev.*, 16, 283–295.
- Hines, C. J.,** Nilsen Hopf, N. B., Deddens, J. A., Calafat, A. M., Silva, M. J., Grote, A. A., Sammons, D. L. (2009a) Urinary phthalate metabolite concentrations among workers in selected industries: a pilot biomonitoring study. *Ann.Occup.Hyg.*, 53, 1-17.
- Hines, E. P.,** Calafat, A. M., Silva, M. J., Mendola, P., Fenton, S. E. (2009b) Concentrations of phthalate metabolites in milk, urine, saliva, and Serum of lactating North Carolina women. *Environ Health Perspect.*, 117, 86-92.
- Hines, C. J.,** Hopf, N. B., Deddens, J. A., Silva, M. J., Calafat, A. M. (2011) Estimated daily intake of phthalates in occupationally exposed groups. *J Expo.Sci Environ Epidemiol.*, 21, 133-141.
- Högberg, J.,** Hanberg, A., Berglund, M., Skerfving, S., Remberger, M., Calafat, A. M., Filipsson, A. F., Jansson, B., Johansson, N., Appelgren, M., Hakansson, H. (2008) Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations. *Environ Health Perspect.*, 116, 334-339.
- Högman, C. F.,** Eriksson, L., Ericson, A., Reppucci, A. J. (1991) Storage of saline-adenine-glucose-mannitol-suspended red cells in a new plastic container: polyvinylchloride plasticized with butyryln-trihexyl-citrate. *Transfusion*, 31, 26–29.
- Hoppin, J. A.,** Brock, J. W., Davis, B. J., Baird, D. D. (2002) Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect.*, 110, 515-518.
- Horowitz, B.,** Stryker, M. H., Waldman, A. A., Woods, K. R., Gass, J. D., Drago, J. (1985) Stabilization of red blood cells by the plasticizer, diethylhexylphthalate. *Vox Sanguinis.*, 48, 150–155.

- Huang, P.C.,** Kuo ,P.L., Guo, Y.L., Liao, P.C., Lee, C.C. (2007) Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod.*, 22(10), 2715-2722.
- Huang, P.C.,** Kuo, P.L., Chou, Y.Y., Lin, S.J., Lee, C.C. (2009) Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environ Int.*, 35(1), 14-20.
- Huber, W. W.,** Grasl-Kraupp, B., Schulte-Hermann, R. (1996) Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit. Rev Toxicol.*, 26, 365-481.
- IARC** International Agency for Research on Cancer. (2000) Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans, some industrial chemicals, Di(2-ethylhexyl) phthalate. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 77, 41-148, Lyon.
- <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol77/volume77.pdf>
- Inoue, K.,** Kawaguchi, M., Okada, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. (2003a) Column-switching high-performance liquid chromatography electrospray mass spectrometry coupled with on-line of extraction for the determination of mono- and di-(2-ethylhexyl) phthalate in blood samples. *Anal Bioanal Chem.*, 376(4), 527-533.
- Inoue, K.,** Higuchi, T., Okada, F., Iguchi, H., Yoshimura, Y., Sato, A., Nakazawa, H. (2003b) The validation of column-switching LC/MS as a high-throughput approach for direct analysis of di(2-ethylhexyl) phthalate released from PVC medical devices in intravenous solution. *J Pharm Biomed Anal.*, 31(6), 1145-1152.
- Inoue, K.,** Kawaguchi, M., Yamanaka, R., Higuchi, T., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H. (2005) Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin.Chim.Acta.*, 358, 159-166.
- Itoh, H.,** Yoshida, K., Masunaga, S. (2005) Evaluation of the effect of governmental control of human exposure to two phthalates in Japan using a urinary biomarker approach. *Int J Hyg Environ Health.*, 208, 237-245.
- Itoh, H.,** Yoshida, K., Masunaga, S. (2007) Quantitative Identification of Unknown Exposure Pathways of Phthalates Based on Measuring Their Metabolites in Human Urine. *Environ. Sci. Technol.*, 41(13), 4542-4547.

- Itoh, H.**, Iwasaki, M., Hanaoka, T., Sasaki, H., Tanaka, T. (2009) Tsugane S. Urinary phthalate monoesters and endometriosis in infertile Japanese women. *Sci Total Environ.*, 408, 37-42.
- Jaakkola, J. J.**, Oie, L., Nafstad, P., Botten, G., Samuelsen, So., Magnus, P. (1999) Interior surface materials in the home and the development of bronchial obstruction in young children in Oslo, Norway. *Am. J. Public Health.*, 89, 188-192.
- Jaeger, R. J.**, Rubin, R. J., (1970) Contamination of blood stored in plastic packs. *The Lancet.*, 18(2), 151.
- Jaeger, R. J.**, Rubin, R. J., (1972) Migration of a phthalate ester plasticiser from polyvinyl chloride blood bags into stored human blood and its localization in human tissues. *New England J Med.*, 287, 1114-1118.
- Ji, K.**, Lim, K.Y., Park, Y., Choi, K. (2010) Influence of a five-day vegetarian diet on urinary levels of antibiotics and phthalate metabolites: a pilot study with "Temple Stay" participants. *Environ Res.*, 110(4), 375-382.
- Jimenez, C.**, Ventura, R., Segura, J. (2004) Detection in urine of eprafoxiral (RSR 13), a potential doping agent, by a routine screening procedure based on methylation followed by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chim Acta.*, 505, 227-229.
- Kambia, K.**, Dine, T., Gressier, B., Germe, A. F., Luyckx, M., Brunet, C., Michaud, L., Gottrand, F. (2001) High-performance liquid chromatographic method for the determination of di(2-ethylhexyl) phthalate in total parenteral nutrition and in plasma. *J Chromatogr. B Biomed. Sci Appl.*, 755, 297-303.
- Kannan, M.**, Atreya, C., (2010) Differential profiling of human red blood cells during storage for 52 selected microRNAs. *Transfusion.*, 50, 1581-1588.
- Kasper-Sonnenberg, M.**, Koch, H. M., Wittsiepe, J., Wilhelm, M. (2012) Levels of phthalate metabolites in urine among mother-child-pairs - Results from the Duisburg birth cohort study, Germany. *Int J Hyg. Environ Health.* 215(3), 373-382.
- Kato, K.**, Silva, M. J., Brock, J. W., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hodge, C. C., Nakazawa, H., Needham, L. L., Barr, D. B. (2003) Quantitative detection of nine phthalate metabolites in human serum using reversed-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol.*, 27 (5), 284-289.

- Kato, K.,** Silva, M. J., Reidy, J. A., Hurtz, D., Malek, N. A., Needham, L. L., Nakazawa, H., Barr, D. B., Calafat, A. M. (2004) Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect.*, 112, 327-330.
- Kato, K.,** Silva, M.J., Needham, L.L., Calafat, A.M. (2005a) Determination of 16 phthalate metabolites in urine using automated sample preparation and on-line preconcentration/high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem.*, 77(9), 2985-2991.
- Kato, K.,** Silva, M. J., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2005b) Determination of total phthalates in urine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 814, 355-360.
- Kessler, W.,** Phokha, W., Csanady, G. A., Filser, J. G. (2001) No background concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate and mono(2-ethylhexyl) phthalate in blood of rats. *Arch.Toxicol.*, 75, 62-64.
- Kluwe, W.M.** (1982) Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian species. *Environ Health Perspect.*, 45, 3-10.
- Koch, H. M.,** Rossbach, B., Drexler, H., Angerer, J. (2003a) Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res.*, 93, 177-185.
- Koch, H. M.,** Drexler, H., Angerer, J. (2003b) An estimation of the daily intake of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and other phthalates in the general population. *Int J Hyg.Environ Health.*, 206, 77-83.
- Koch, H. M.,** Gonzalez-Reche, L. M., Angerer, J. (2003c) On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 784, 169-182.
- Koch, H. M.,** Bolt, H. M., Angerer, J. (2004a) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch.Toxicol.*, 78, 123-130.

- Koch, H. M.,** Drexler, H., Angerer, J. (2004b) Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *Int J Hyg. Environ Health.*, 207, 15-22.
- Koch, H. M.,** Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J. (2005a) New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch.Toxicol.*, 79, 367-376.
- Koch, H. M.,** Angerer, J., Drexler, H., Eckstein, R., Weisbach, V. (2005b) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) exposure of voluntary plasma and platelet donors. *Int J Hyg. Environ Health.*, 208, 489-498.
- Koch, H. M.,** Bolt, H. M., Preuss, R., Eckstein, R., Weisbach, V., Angerer, J. (2005c) Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch.Toxicol.*, 79, 689-693.
- Koch, H. M.,** Preuss, R., Angerer, J. (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl.*, 29, 155-165.
- Koch, H. M.,** Calafat, A. M. (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos.Trans.R.Soc.B.*, 364, 2063-2078.
- Koo, H. J.,** Lee, B. M. (2005) Human monitoring of phthalates and risk assessment. *J Toxicol Environ Health A.*, 68, 1379-1392.
- Kondo, F.,** Ikai, Y., Hayashi, R., Okumura, M., Takatori, S., Nakazawa, H., Izumi, S., Makino, T. (2010) Determination of five phthalate monoesters in human urine using gas chromatography-mass spectrometry. *Bull. Environ Contam Toxicol.*, 85, 92-96.
- Labow, R. S.,** Card, R. T., Rock, G. (1987) The effect of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate on red cell deformability. *Blood.*, 70, 319-323.
- Larsen, S. T.,** Lund, R. M., Nielsen, G. D., Thygesen, P., Poulsen, O. M. (2001) Di-(2-ethylhexyl) phthalate possesses an adjuvant effect in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicology Letters.*, 125, 11-18.
- Lasne, F.,** de Ceaurriz, J. (2000) Recombinant erythropoietin in urine. *Nature*, 405 (6787), 635.

- Latini, G.,** De Felice, C., Presta, G., Del Vecchio, A., Paris, I., Ruggieri, F., Mazzeo, P. (2003) Exposure to Di(2-ethylhexyl)phthalate in humans during pregnancy. A preliminary report. *Biol Neonate.*, 83, 22-24.
- Leigh-Smit, S.** (2004) Blood boosting. *Br J Sports Med.*, 38(1), 99-101.
- Leivadara, S.,** Nikolaou, A., Lekkas, T., (2008) Determination of organic compounds in bottled waters. *Food Chemistry.*, 108(1), 277-286.
- Lin, S.,** Ku, H.Y., Su, P.H., Chen, J.W., Huang, P.C., Angerer, J. Wang, S.L. (2011a) Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. *Chemosphere.* 82(7), 947-955.
- Lin, L.C.,** Wang, S.L., Chang, Y.C., Huang, P.C., Cheng, J.T., Su P.H, Liao, P.C. (2011b) Associations between maternal phthalate exposure and cord sex hormones in human infants. *Chemosphere.* 83(8), 1192-1199.
- Lorber, M.,** Angerer, J., Koch, H. M. (2010) A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to di-2-ethylhexyl phthalate. *J Expo Sci Environ Epidemiol.*, 20(1), 38-53.
- Luks-Betlej, K.,** Popp, P., Janoszka, B., Paschke, H. (2001) Solid-phase microextraction of phthalates from water. *J Chromatogr.A*, 938, 93-101.
- Magnani, M.,** Corsi, D., Bianchi, M., Paiardini, M., Galluzzi, L., Gargiullo, E., Parisi, A., Pigozzi, F. (2001) Identification of blood erythroid markers useful in revealing erythropoietin abuse in athletes. *Blood Cells Mol. Dis.*, 27(3), 559–571.
- Malcovati, L.,** Pascutto, C., Cazzola, M. (2003) Hematologic passport for athletes competing in endurance sports: a feasibility study. *Haematologica.*, 88, 570-581.
- Mallorquí, J.,** Segura, J., de Bolos, C., Gutierrez-Gallego, R., Pascual, J. A. (2008) Recombinant erythropoietin found in seized blood bags from sportsmen. *Haematologica.*, 93(2), 313-314.
- Marcel, Y. L.** (1973) Determination of Di 2-ethylhexyl Phthalate Levels in Human Blood Plasma and Cryoprecipitates. *Environ Health Perspect.* 119-121.
- Marsee, K.,** Woodruff, T.J., Axelrad, D.A., Calafat, A.M., Swan, S.H. (2006) Estimated daily phthalate exposures in a population of mothers of male infants exhibiting reduced anogenital distance. *Environ Health Perspect.*, 114(6), 805-809.

- Medbo, J. I.,** Tabata, I. (1989) Relative importance of aerobic energy release during short-lasting exhausting bicycling exercise. *J. Appl. Physiol.*, 67(5), 1881-1886.
- Meek, M. E.,** Chan, P. K. L. (1994) Bis(2-ethylhexyl)phthalate –evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.*, 12, 179–194.
- Meeker, J. D.,** Sathyanarayana, S., Swan, S. H. (2009) Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 364, 2097-2113.
- Milde, A.,** Kuhl-Burmeister, R., Ritz-Timme, S., Kaatsch, H. J. (1999) DNA typing in cases of blood chimerism. *Int. J. Legal Med.*, 112(5), 333–335.
- Moore, R. W.,** Rudy, T. A., Lin, T. M., Ko, K., Peterson, R. E. (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the androgenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.*, 109, 229-237.
- Morkeberg, J.,** Belhage, B., Rasmussen, A. B., Damsgaard, R., Ashenden, M., Dziegiel, M. H. (2008) Changes in red blood cell volume, plasma volume, and total blood volume after autologous blood collections. *Transfusion.*, 48(7), 1524-1526.
- Morkeberg, J.,** Belhage, B., Ashenden, M., Borno, A., Sharpe, K., Dziegiel, M. H., Damsgaard, R. (2009) Screening for autologous blood transfusions. *Int J Sports Med.*, 30, 285-292.
- Morkeberg, J.,** Sharpe, K., Belhage, B., Damsgaard, R., Schmidt, W., Prommer, N., Gore, C. J., Ashenden, M. (2011) Detecting autologous blood transfusions: a comparison of three passport approaches and four blood markers. *Scand J Med Sci Sports.*, 21(2), 235-243.
- Morkeberg, J.** (2012) Detection of Autologous Blood Transfusions in Athletes: A Historical Perspective. *Transfusion Medicine Reviews.*, 26, 199-208.
- Mortensen, G. K.,** Main, K. M., Andersson, A. M., Leffers, H., Skakkebaek, N. E. (2005) Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Anal. Bioanal. Chem.*, 382, 1084-1092.



**Muller, A. K.,** Nielsen, E., Ladefoged, O. (2003) Human Exposure to Selected Phthalates in Denmark. The Danish Veterinary and Food Administration, 1<sup>st</sup> Edition, Denmark.

[http://www.fodevarestyrelsen.dk/Publikationer/Alle\\_publicationer/2003/015.htm](http://www.fodevarestyrelsen.dk/Publikationer/Alle_publicationer/2003/015.htm)

**NCEH.** National Center for Environmental Health Division of Laboratory Sciences. (2005) Third National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals Services. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA.

<http://www.clu-in.org/download/contaminantfocus/pcb/third-report.pdf>

**NCEH.** National Center for Environmental Health Division of Laboratory Sciences. (2009) Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals Services. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA.

<http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>

**Nelson, M.,** Ashenden, M., Langshaw, M., Popp, H. (2002) Detection of homologous blood transfusion by flow cytometry: a deterrent against blood doping. *Haematologica*, 87, 881-882.

**Nelson, M.,** Popp, H., Sharpe, K., Ashenden, M. (2003) Proof of homologous blood transfusion through quantification of blood group antigens. *Haematologica*, 88(11), 1284-1295.

**Niino, T.,** Ishibashi, T., Ishiwata, H., Takeda, K., Onodera, S. (2003) Characterization of human salivary esterase in enzymatic hydrolysis of phthalate esters. *Journal of health science*, 49, 76-81.

**Nikolovski, Z.,** de la Torre, R., Chiva, C., Borrás, E., Andreu, D., Ventura, R., Segura, J. (2012) Alterations of the erythrocyte membrane proteome during storage – possible tool to identify autologous blood transfusion. *Drug Test Anal.*, DOI: 10.1002/dta.1342.

**Pace, N.,** Lozner, E. I., Consolazio, W. V., Pitts, G. C., Pecora, L. J. (1947) The increase in hypoxia tolerance of normal man accompanying the polycythemia induced by transfusion of erythrocytes. *Am.J.Physiol.*, 148, 152-163.

- Pan, G.**, Hanaoka, T., Yoshimura, M., Zhang, S., Wang, P., Tsukino, H., Inoue, K., Nakazawa, H., Tsugane, S., Takahashi, K. (2006) Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect.*, 114, 1643-1648.
- Parisotto, R.**, Gore, C. J., Emslie, K. R., Ashenden, M. J., Brugnara, C., Howe, C., Martin, D. T., Trout, G. J., Hahn, A. G. (2000) A novel method utilising markers of altered erythropoiesis for the detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica.*, 85(6), 564–572.
- Parisotto, R.**, Wu, M., Ashenden, M. J., Emslie, K. R., Gore, C. J., Howe, C., Kazlauskas, R., Sharpe, K., Trout, G. J., Xie, M. (2001) Detection of recombinant human erythropoietin abuse in athletes utilizing markers of altered erythropoiesis. *Haematologica.*, 86(2), 128–137.
- Park, M.S.**, Yang, Y.J, Hong, Y.P, Kim, S.Y, Lee, Y.P. (2010) Assessment of di (2-ethylhexyl) phthalate exposure by urinary metabolites as a function of sampling time. *J Prev Med Public Health.*, 43(4), 301-308.
- Pate, R. R.**, McFarland, J., Van Wyck, J., Okocha, J. (1979) Effects of blood reinfusion on endurance performance in female distance runners. *Med.Sci.Sports.*, 11, 97.
- Peck, C. C.**, Albro, P. W. (1982) Toxic potential of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate in the context of its disposition and metabolism in primates and man. *Environ Health Perspect.*, 45, 11-17
- Peck, J. D.**, Sweeney, A. M., Symanski, E., Gardiner, J., Silva, M. J., Calafat, A. M., Schantz, S. L. (2010) Intra- and inter-individual variability of urinary phthalate metabolite concentrations in Hmong women of reproductive age. *J Expo.Sci Environ Epidemiol.*, 20, 90-100.
- Peterson, J. H.**, Breindahl, T., (2000) Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Addit. Contam.*, 17, 133–141.
- Pialoux, V.**, Mounier, R., Brugniaux, J. V. (2009) Hemoglobin and hematocrit are not such good candidates to detect autologous blood doping. *Int J Hematol.*, 89, 714-715.
- Plonait, S. L.**, Nau, H., Maier, R. F., Wittfoht, W. M. O. (1993) Exposure of newborn infants to di-(ethylhexyl)-phthalate and 2ethylhexanoic acid following exchangetransfusion with polyvinylchloride catheters. *Transfusion*, 33, 598-605.

- Pottgiesser, T.,** Umhau, M., Ahlgrim, C., Ruthardt, S., Roecker, K., Schumacher, Y. O. (2007) Hb massmeasurement suitable to screen for illicit autologous blood transfusions. *Med Sci Sports Exerc.*, 39(10), 1748-1756.
- Pottgiesser, T.,** Schumacher, Y. O., Funke, H., Rennert, K., Baumstark, M. W., Neunuebel, K., Mosig, S. (2009) Gene expression in the detection of autologous blood transfusion in sports – a pilot study. *Vox Sang.*, 96 (4), 333-336.
- Preau, J. L.,** Wong, L. Y., Silva, M. J., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2010) Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ Health Perspect.*, 118, 1748-1754.
- Preuss, R.,** Koch, H. M., Angerer, J. (2005) Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 816, 269-280.
- Prommer, N.,** Sottas, P. E., Scoch, C., Schumacher, Y. O., Schmidt, W. (2008) Total hemoglobin mass—a new parameter to detect blood doping?. *Med Sci Sports Exerc.*, 40, 2112-2118.
- Rahman, M.,** Brazel, C. S. (2004) The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Prog Polym Sci.*, 29, 1223-1248.
- Reichel, C.** (2011a) Recent developments in doping testing for erythropoietin. *Anal Bioanal Chem.*, 401(2), 463-481.
- Reichel, C.,** (2011b) OMICS-strategies and methods in the fight against doping. *Forensic Sci Int.*, 213(1-3), 20-34.
- Rigoulet, L.** Dopage: l'affaire Festina affole le Tour de France. *Libération*. París, 16 de juliol de 1998.
- Robertson, R. J.,** Gilcher, R., Metz, K. F., Caspersen, C. J., Allison, T. G., Abbot, R. A., Skrinar, G. S., Krause, J. R., Nix, P. A. (1984) Hemoglobin concentration and aerobic work capacity in women following induced erythrocythemia. *J.Appl.Physiol.*, 57, 568-575.

- Robinson, B. F.,** Epstein, S. E., Kahler, R. L., Braunwald, E. (1966) Circulatory effects of acute expansion of blood volume: studies during maximal exercise and at rest. *Cir.Res.*, 19, 32.
- Romero-Franco, M.,** Hernández-Ramírez, R. U., Calafat, A. M., Cebrián, M. E., Needham, L. L., Teitelbaum, S., Wolff, M. S., López-Carrillo, L. (2011) Personal care product use and urinary levels of phthalate metabolites in Mexican women. *Environ Int.*, 37(5), 867-871.
- Saito, Y.,** Nakao, Y., Imaizumi, M., Morishima, Y., Kiso, Y., Jinno, K. (2002) Miniaturized solid-phase extraction as a sample preparation technique for the determination of phthalates in water. *Anal.Bioanal.Chem.*, 373, 81-86.
- Sallet, P.,** Brunet-Guedj, E., Mornex, R., Baverel, G. (2008) Study of a new indirect method based on absolute norms of variation to detect autologous blood transfusion. *Int J Hematol.*, 88(4), 362-368.
- Sampson, J.,** de Korte, D. (2011) DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services. *Transfusion Medicine.*, 21(2), 73.
- Sathyanarayana, S.,** (2008a) Phthalates and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.*, 38(2), 34-49.
- Sathyanarayana, S.,** Calafat, A. M., Liu, F., Swan, S. H. (2008b) Maternal and infant urinary phthalate metabolite concentrations: are they related?, *Environ Res.*, 108, 413-418.
- Schettler, T.** (2006) Human exposure to phthalates via consumer products. *Int J Androl.*, 29, 134-139.
- Schmid, P.,** Schlatter, Ch. (1985) Excretion and metabolism of di(2-ethylhexyl)-phthalate in man. *Xenobiotica*, 15, 3, 251-256.
- Scott, K. L.,** Lecak, J., Acker, J. P. (2005) Biopreservation of red blood cells: Past, present, and future. *Transfus Med Rev.*, 19, 127-142.
- Sharpe, K.,** Ashenden, M. J., Schumacher, Y. O. (2006) A third generation approach to detect erythropoietin abuse in athletes. *Haematologica.*, 91, 356-363.
- Shneider, B.,** Cronin, J., Van Marter, L., Maller, E., Truog, R., Jacobsen, M., Kevy, S. (1991) A prospective analysis of cholestasis in infants supported with extracorporeal membrane oxygenation. *J.Paediatr.Gastroenterol.Nutr.*, 13, 285-289.

- Silva, M. J.,** Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., Malek, N. A., Hodge, C. C., Hurtz, D., III, Calafat, A. M., Needham, L. L., Brock, J. W. (2003a) Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch.Toxicol.*, 77, 561-567.
- Silva, M. J.,** Malek, N. A., Hodge, C. C., Reidy, J. A., Kato, K., Barr, D. B., Needham, L. L., Brock, J. W. (2003b) Improved quantitative detection of 11 urinary phthalate metabolites in humans using liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B.*, 789, 393-404.
- Silva, M. J.,** Barr, D. B., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hodge, C. C., Caudill, S. P., Brock, J. W., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2004a) Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000. *Environ Health Perspect.*, 112, 331-338.
- Silva, M. J.,** Reidy, J. A., Herbert, A. R., Preau, J. L., Jr., Needham, L. L., Calafat, A.M. (2004b) Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull Environ ContamToxicol.*, 72, 1226-1231.
- Silva, M. J.,** Slakman, A. R., Reidy, J. A., Preau, J. L., Jr., Herbert, A. R., Samandar, E., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2004c) Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 805, 161-167.
- Silva, M. J.,** Reidy, J. A., Samandar, E., Herbert, A. R., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2005a) Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch.Toxicol.*, 79, 647-652.
- Silva, M. J.,** Samandar, E., Preau, J. L., Jr., Reidy, J. A., Needham, L. L., Calafat, A. (2005b) Automated solid-phase extraction and quantitative analysis of 14 phthalate metabolites in human serum using isotope dilution-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal.Toxicol.*, 29, 819-824.
- Silva, M. J.,** Samandar, E., Preau, J. L., Jr., Needham, L. L. and Calafat, A. M. (2006a) Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*, 219, 22-32.
- Silva, M. J.,** Reidy, J. A., Preau, J. L., Samandar, E., Needham, L. L. and Calafat, A. M. (2006b) Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Biomarkers*, 11, 1-13.

- Silva, M. J.,** Samandar, E., Preau, J. L., Jr., Reidy, J. A., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2007) Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 860, 106-112.
- Simmchen, J.,** Ventura, R., Segura, J. (2012) Progress in the removal of di[2-ethylhexyl]-phthalate (DEHP) as the plasticizer in blood bags. *Transf Med Rev.*, 26, 27-37.
- Sjöberg, P.,** Bondesson, U. (1985) Determination of di(2-ethylhexyl) phthalate and four of its metabolites in blood plasma by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr.*, 344, 167-175.
- Solyomos, E.,** Guddat, S., Geyer, H., Thomas, A., Thevis, M., Schänzer, W. (2011a) Di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites as markers for blood transfusion in doping control: Intra-individual variability of urinary concentrations. *Drug Test Analysis*, 3, 892–895.
- Solyomos, E.,** Guddat, S., Geyer, H., Flenker, U., Thomas, A., Segura, J., Ventura, R., Platen, P., Schulte-Mattler, M., Thevis, M., Schanzer, W. (2011b) Rapid determination of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a marker for blood transfusion in sports drug testing. *Anal.Bioanal.Chem.*, 401, 517-528.
- Spriet, L.,** Gledhill, N., Froese, A. B., Wilkes, D. L. (1986) Effect of graded erythrocythemia on cardiovascular and metabolic responses to exercise. *J.Appl.Physiol.*, 61, 1942-1948.
- Spriet, L.** (1991) Blood doping and oxygen transport. *Perspectives in Exercise Science and Sports Medicine.*, 4, 213-248.
- Suzuki, Y.,** Niwa, M., Yoshinaga, J., Watanabe, C., Mizumoto, Y., Serizawa, S., Shiraishi, H. (2009) Exposure assessment of phthalate esters in Japanese pregnant women by using urinary metabolite analysis. *Environ Health Prev Med.*, 14(3), 180-187.
- Takatori, S.,** Kitagawa, Y., Kitagawa, M., Nakazawa, H., Hori, S. (2004) Determination of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 804, 397-401.

- Takatori, S.**, Okamoto, Y., Kitagawa, Y., Hori, S., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H. (2008) Simulated neonatal exposure to DEHP and MEHP from PVC enteral nutrition products. *Int J Pharm.*, 352, 139-145.
- Teitelbaum, S.L.**, Britton, J.A., Calafat, A.M., Ye, X., Silva, M.J., Reidy, J.A., Galvez M.P., Brenner, B.L., Wolff, M.S. (2008) Temporal variability in urinary concentrations of phthalate metabolites, phytoestrogens and phenols among minority children in the United States. *Environ Res.*, 106(2), 257-269.
- Thompson, R. C.**, Swan, S. H., Moore, C. J., vom Saal, F. S. (2009) Our plastic age. *Phil Trans R Soc B.*, 364, 1973-1976.
- Thomson, J. M.**, Stone, J. A., Ginsburg, A. D., Hamilton, P. (1982) O<sub>2</sub> transport during exercise following blood reinfusion. *J. Appl. Physiol.*, 53(5), 1213-1219.
- Videman, T.**, Rytomaa, T. (1977) Effect of blood removal and auto-transfusion on heart rate response to a submaximal workload. *J. Sports Med. Phys. Fitness.*, 17, 387-390.
- Voss, S. C.**, Thevis, M., Schinkothe, T., Schanzer, W. (2007) Detection of homologous blood transfusion. *Int J Sports Med.*, 28(8), 633-637.
- WADA** (2009) World Anti-Doping Code.  
[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-The-Code/WADA\\_Anti-Doping\\_CODE\\_2009\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-The-Code/WADA_Anti-Doping_CODE_2009_EN.pdf)
- WADA** (2010) Technical Document TD2010BAR. Version1.0.  
[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA\\_TD2010\\_BAR\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/WADA_TD2010_BAR_EN.pdf)
- WADA** (2012a) The 2012 prohibited list International standard.  
[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf)

**WADA** (2012b) Athlete Biological Passport Operating Guidelines and compilation of required elements. Version 3.0.

[http://www.wada-ama.org/Documents/Science\\_Medicine/Athlete\\_Biological\\_Passport/WADA\\_ABP\\_OperatingGuidelines\\_version\\_3.0.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/Science_Medicine/Athlete_Biological_Passport/WADA_ABP_OperatingGuidelines_version_3.0.pdf)

**WADA** (2012c) International Standard for Laboratories. Version 7.0.

[http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA\\_Int\\_Standard\\_Laboratories\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-IS-Laboratories/ISL/WADA_Int_Standard_Laboratories_2012_EN.pdf)

**Weisbach, V.,** Koch, H. M., Angerer, J., Eckstein, R. (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate exposure of apheresis donors is procedure-related. *Transfusion*, 46, 1457-1458.  
**Weuve, J.,** Sanchez, B. N., Calafat, A. M., Schettler, T., Green, R. A., Hu, H., Hauser, R. (2006) Exposure to phthalates in neonatal intensive care unit infants: urinary concentrations of monoesters and oxidative metabolites. *Environ Health Perspect.*, 114, 1424-1431.

**Williams, M. H.,** Goodwin, A. R., Perkins, R., Bocrie, J. (1973) Effect of blood reinjection on upon endurance capacity and heart rate. *Med.Sci.Sports.*, 10, 113-118.

**Williams, M. H.,** Lindhjem, M., Schuster, R. (1978) Effect of blood infusion upon endurance capacity and ratings of perceived exertion. *Med.Sci.Sports.*, 10(2), 113-118.

**Williams, M. H.,** Wesseldine, S., Somma, T., Schuster, R. (1981) Effect of induced erythrocythemia upon 5-mile treadmill run time. *Med.Sci.Sports Exerc.*, 1981, 169-175.

**Wittassek, M.,** Wiesmuller, G. A., Koch, H. M., Eckard, R., Dobler, L., Muller, J., Angerer, J., Schluter, C. (2007) Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg.Environ Health.*, 210, 319-333.

**Wittassek, M.,** Angerer, J., Kolossa-Gehring, M., Schafer, S.D., Klockenbusch, W., Dobler, L. Günsel, A.K., Müller, A., Wiesmüller, G.A. (2009) Fetal exposure to phthalates--a pilot study. *Int J Hyg Environ Health.*, 212(5), 492-498.



- Wittassek, M.,** Koch, H. M., Angerer, J., Bruning, T. (2011) Assessing exposure to phthalates - the human biomonitoring approach. *Mol.Nutr.Food Res.*, 55, 7-31.
- Wolff, M. S,** Teitelbaum, S.L, Windham, G., Pinney, S.M, Britton, J.A., Chelimo, C., Godbold, J., Biro, F., Kushi, L.H., Pfeiffer, C.M., Calafat, A.M. (2008) Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls. *Environ Health Perspect.*, 115(1), 116-121.
- Wormuth, M.,** Scheringer, M., Vollenweider, M., Hungerbuhler, K. (2006) What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans?. *Risk Anal.* 26, 803–824.
- Ye, X.,** Pierik, F.H., Hauser, R., Duty S., Angerer, J., Park, M.M., Burdorf, A., Hofman, A., Jaddoe, V.W., Mackenbach, J.P., Steegers, E.A., Tiemeier, H., Longnecker, M.P. (2008) Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res.*, 108(2), 260-267.



## **CAPÍTOL 2**

---

### **JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS**



Pels laboratoris de control antidopatge és un repte important el desenvolupament de tècniques que permetin detectar el dopatge sanguini. Les transfusions de sang homòlogues poden ser detectades mitjançant l'anàlisi d'una mostra de sang de l'esportista, sempre i quan almenys dos antigens de superfície dels eritròcits siguin diferents entre les sangs. Però pel que fa a les transfusions autòlogues, actualment no hi ha cap tècnica disponible que permeti la seva detecció. Un avanç remarcable seria, a més, el desenvolupament d'un test que enlloc d'una mostra de sang requereís una mostra d'orina, atès que aquesta és la matriu biològica disponible en tots els controls antidopatge. En aquest sentit, es proposen els metabòlits del plastificant di(2-etilhexil) ftalat (DEHP) com a possibles marcadors per a la detecció de transfusions. La lliberació del DEHP present en les bosses utilitzades en les transfusions de sang origina que durant el procés d'una transfusió la contaminació de la sang del receptor per aquest compost sigui elevada i, en conseqüència, després d'una transfusió les concentracions dels metabòlits del DEHP en orina podrien ser més elevades. Per altra banda, el DEHP és un contaminant ambiental i tota la població presenta concentracions basals d'aquest compost i els seus metabòlits en orina.

L'objectiu de la tesi va ser avaluar si els metabòlits del plastificant DEHP poden ser usats com a marcadors de l'ús de transfusions sanguínies (homòlogues i autòlogues) en l'esport.

Els objectius específics d'aquest treball van ser:

1. Desenvolupar i validar una tècnica analítica per a la detecció i quantificació dels cinc principals metabòlits de DEHP en mostres d'orina: mono-(2-etilhexil) ftalat (MEHP), mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalat (MEOHP), mono-(2-carboximetilhexil) ftalat (2cx-MMHP) i mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalat (5cx-MEPP).

2. Comparar les concentracions dels metabòlits de DEHP en mostres de població general amb mostres de pacients hospitalitzats sotmesos a transfusions de sang i de pacients no transfosos que rebin tractaments mèdics que impliquin l'ús de materials plàstics, per tal de comprovar si les concentracions en orina dels metabòlits de DEHP augmenten després de la transfusió i si els resultats poden quedar confosos per altres tractaments mèdics diferents a les transfusions.
3. Avaluar les concentracions dels metabòlits de DEHP en mostres de voluntaris sotmesos a un procés d'autotransfusió controlat, amb l'objectiu de verificar en població sana que les concentracions en orina dels metabòlits de DEHP augmenten després de la transfusió, de definir el perfil d'excreció en orina d'aquests metabòlits i d'establir una finestra de detecció en la que les concentracions dels metabòlits romanen considerablement elevades després de la transfusió.
4. Determinar les concentracions dels metabòlits de DEHP en població general i en una població d'esportistes per establir els valors límits de referència que permetin distingir una exposició normal d'una exposició anormalment elevada que podria ser indicativa de l'ús de transfusions.

## CAPÍTOL 3

---

# **DESENVOLUPAMENT I VALIDACIÓ DEL MÈTODE D'ANÀLISI DE CINC METABÒLITS DE DEHP EN ORINA PER CL-EM/EM**





### **3.1 Introducció**

El di(2-etilhexil) ftalat (DEHP) és un dels plastificants més utilitzats en els productes de clorur de polivinil (PVC) per tal de dotar-los de més flexibilitat. El DEHP s'usa en molts productes domèstics i també en dispositius mèdics (CE, 2002; FDA, 2002). El DEHP forma part de les bosses emprades en les transfusions de sang perquè té propietats que ajuden a mantenir l'estabilitat dels eritròcits (Horowitz et al, 1985; Simmchen et al, 2012). Els plastificants no estan units químicament al polímer i poden migrar fàcilment cap a l'atmosfera, els productes alimentaris o passar directament al cos, fet que implica una exposició del medi ambient i de la població a aquest plastificant. La població general està exposada al DEHP de manera continuada (Frederiksen et al, 2007; Fromme et al, 2007; Koch et al, 2009). L'exposició a altes concentracions de DEHP pot provocar un ampli rang d'efectes adversos. És conegut que el DEHP és tòxic a nivell reproductiu i de desenvolupament i està àmpliament documentat els possibles efectes tòxics dels ftalats en el sistema reproductiu dels infants (Lottrup et al, 2006; Blystone et al, 2010); a més a més, el DEHP és un disruptor endocrí (Latini et al, 2004). Malgrat tot, els vincles directes entre els efectes observats en animals i un deteriorament en la salut reproductiva humana no estan del tot establerts (Koch et al, 2006).

El patró metabòlic del DEHP és complex i s'han indentificat i caracteritzat diferents metabòlits. El metabolisme del DEHP implica una hidròlisi ràpida a mono-(2-etilhexil) ftalat (MEHP) i la posterior formació del MEHP conjugat amb àcid glucurònic. El MEHP pot patir reaccions d'oxidació en la cadena lateral i originar més metabòlits (Albro et al, 1989; Silva et al, 2003). Actualment hi ha més de 15 metabòlits del DEHP identificats en orina humana (Koch et al, 2005). Els metabòlits oxidats mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalat (MEOHP) i els identificats i caracteritzats més recentment com el mono-(2-

carboximetilhexil) ftalat (2cx-MMHP) i mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalat (5cx-MEPP) són els metabòlits majoritaris en humans i tots ells són excretats en orina com a conjugats amb l'àcid glucurònic (Koch et al, 2003a; Silva et al, 2006a).

Tan els metabòlits secundaris com el metabòlit primari MEHP han estat utilitzats com a marcadors per predir l'exposició al DEHP (Barr et al, 2003; Kato et al, 2004; Silva et al 2006b).

Es coneix que els adults i els noutats que estan sotmesos a pràctiques mèdiques presenten un alt nivell d'exposició al DEHP (Calafat et al, 2004). Els treballadors d'indústries on s'utilitzen materials de DEHP també estan altament exposats a aquest compost i tenen concentracions dels seus metabòlits molt elevades en orina (Pan et al, 2006). En els darrers anys s'han desenvolupat metodologies que permeten detectar els metabòlits del DEHP per tal d'avaluar-ne l'exposició (Blount et al, 2000; Koch et al, 2003b; Kato et al, 2005; Preuss et al, 2005; Silva et al, 2007).

Un dels processos que podria implicar més exposició al DEHP són les transfusions de sang. L'ús de les transfusions de sang està prohibit a l'esport per l'Agència Mundial Antidopatge (AMA). Les transfusions homòlogues de sang (donant i receptor no són el mateix individu) poden ser detectades per l'anàlisi de mostres de sang per citometria de flux mitjançant la detecció de doble població d'eritròcits (existència d'eritròcits amb diferents antígens de superfície) (Arndt et al, 2008; Giraud et al, 2008). D'altra banda, les transfusions autòlogues de sang (donant i receptor són el mateix individu) no poden ser detectades pel mateix procediment analític ja que tots els eritròcits comparteixen els mateixos antígens de superfície. Atès que s'ha vist que el DEHP present en les bosses de sang per a transfusions es desprèn fàcilment de la bossa (Inoue et al, 2005), es podria suposar que subjectes que reben transfusions de sang estan exposats a més altes concentracions d'aquest compost i, en conseqüència, la concentració dels metabòlits de DEHP en

L'orina d'aquests podria ser més elevada. Així doncs, els metabòlits del DEHP en orina es podrien usar com a marcadors de l'ús de transfusions en l'esport.

En aquest capítol es descriu l'optimització i la validació d'un mètode per detectar i quantificar cinc metabòlits del DEHP (MEHP, MEOHP, MEHHP, 5cx-MEPP i 2cx-MMHP) en mostres d'orina, amb la finalitat d'aplicar el mètode en un futur a mostres d'orina de subjectes transfusos i comprovar que aquests metabòlits podrien ser marcadors de l'ús de transfusions en l'esport. Comparada amb altres estudis previs la metodologia proposada permet la quantificació de dos metabòlits addicionals del DEHP (5cx-MEPP i 2cx-MMHP) (Solymos et al, 2011a; Solymos et al, 2011b).

## **3.2 Material i mètodes**

### **3.2.1 Material i reactius**

Els disolvents i reactius que es van utilitzar van ser:

Acetat d'etil i acetonitril de qualitat HPLC (Merck, Darmstadt, Germany), àcid fòrmic de qualitat CL/EM (Merck, Darmstadt, Germany) i  $\beta$ -glucuronidasa (*Escherichia coli*) (Roche Biomedical, Mannheim, Germany). L'aigua Milli-Q es va obtenir a partir d'un sistema Milli-Q de purificació (Millipore Ibérica; Barcelona, Spain).

### **3.2.2 Substàncies de referència**

Les substàncies de referència utilitzades van ser MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP, 2cx-MMHP i els seus anàlegs marcats amb  $^{13}\text{C}$  MEHP $^{13}\text{C}_4$ , MEOHP $^{13}\text{C}_4$  i 5cx-MEPP $^{13}\text{C}_4$  (posicions 1 i 2 de l'anell  $^{13}\text{C}_2$ , i dicarboxil

$^{13}\text{C}_2$ ), que es van utilitzar com estàndards interns (ISTD). Tots ells es van obtenir de Cambridge Isotope Laboratories, Inc (Andover, MA, USA).

### 3.2.3 Preparació de les solucions

Les dissolucions comercials dels metabòlits del DEHP i els seus anàlegs marcats utilitzats com ISTD tenien una concentració de 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  i estaven preparades en acetonitril. Les solucions de treball de 10 i 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  es van preparar a partir de dilucions amb acetonitril de les dissolucions comercials. Totes les solucions es van emmagatzemar a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 3.2.4 Preparació de la mostra

Per l'anàlisi es van utilitzar alíquotes d'1 ml d'orina. Sobre 1 ml d'orina es van afegir els estàndards marcats MEHP $^{13}\text{C}_4$ , MEOHP $^{13}\text{C}_4$  i 5cx-MEPP $^{13}\text{C}_4$  a una concentració equivalent de 50 ng/ml de cada un d'ells. El pH es va ajustar a 6.5 amb un tampó d'acetat amònic (250  $\mu\text{l}$ ) i després es van afegir 30  $\mu\text{l}$  de  $\beta$ -glucuronidasa de *Escherichia coli*. Les mostres es van incubar a 55  $^\circ\text{C}$  durant 60 minuts. Després de la hidròlisi enzimàtica, les mostres es van acidificar amb tampó fosfat de pH 2 (2 ml). L'extracció es va dur a terme amb 8 ml d'acetat d'etil i un basculador automàtic a 40 rpm durant 20 minuts. Després de centrifugar les mostres (3500 rpm, 5 min) la fase orgànica es va separar i es va evaporar a sequedat sota corrent de nitrogen en un bany d'aigua a 40 $^\circ\text{C}$ . Els extractes es van reconstituir amb 200  $\mu\text{l}$  d'una mescla d'aigua i acetonitril (80:20, v|v, 0.01% acid fòrmic). Finalment, les alíquotes de 5  $\mu\text{l}$  es van analitzar per cromatografia de líquids d'ultra precisió acoblada a espectrometria de masses en tàndem (UPLC-EM/EM).

### **3.2.5 Anàlisi instrumental**

La separació cromatogràfica va tenir lloc en un sistema cromatogràfic Waters Acquity UPLC™ amb una columna Acquity BEH C<sub>18</sub> (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm de tamany de partícula) (Waters Corporation, Milford, MA) termostatitzada a 45°C. La fase mòbil consistia en aigua desionitzada amb 0.01% d'àcid fòrmic (solvent A) i acetonitril amb 0.01% d'àcid fòrmic (solvent B). La separació es va fer a un flux constant de 0.6 ml/min i utilitzant la següent elució per gradient: de 0 a 3 min, 20%B; increment lineal a 50%B en 2 min; increment lineal a 95%B en 1 min; 95%B durant 2 min, disminució a 20%B en 0.2 min i estabilització a les condicions inicials durant 3 min. La duració total de la injecció i del gradient cromatogràfic va ser de 9.5 minuts i el volum de mostra injectat de 5 µl.

L'instrument UPLC estava acoblat a un espectròmetre de masses de triple quadrupol, Quattro Premier XE (Micromass, Waters Corp.), amb una font d'ionització per electrospai (Z-spray) que treballava en mode d'ionització negatiu o positiu. Les condicions de la font van ser les següents: voltatge de capilar, 3 i 2,5 kV pel mode d'ionització positiu i negatiu, respectivament; temperatura de la font, 120°C; temperatura de desolvatació, 450°C; flux del gas de conus, 50 l/h i flux del gas de desolvatació 1200 l/h. Es va utilitzar gas nitrogen d'alta puresa com a gas de desolvatació i l'argó com a gas de col·lisió. Els paràmetres de treball de la ionització per electrospai (mode d'ionització, ions precursor i producte, voltatge de conus i energies de col·lisió) es van optimitzar per cada compost amb la infusió individual de les solucions dels compostos (10 µg/ml) a l'espectròmetre de masses a 10 µl/min amb fase mòbil (50:50, A:B). El voltatge de conus es va optimitzar per obtenir la màxima senyal de l'ió precursor i l'energia de col·lisió es va ajustar per maximitzar la senyal de ió producte més abundant per cada compost. La detecció i la quantificació es va fer en MRM (multiple reaction monitoring mode). Les condicions de MRM estan descrites en la taula 3.1.

Es van monitoritzar dues transicions específiques per cada analit. L'adquisició de les dades es va fer en dos grups d'adquisició amb dwell times de 50 ms, interchannel delays de 5 ms i interscan times de 20 ms. Totes les dades es van adquirir i processar amb el software MassLynx 4.1 (Waters Corporation, Milford, MA).

### 3.2.6 Validació del mètode

Es van avaluar els següents paràmetres: linealitat, límit de detecció (LD), límit de quantificació (LQ), rendiments d'extracció (RE), efecte matriu, precisió intraassaig i inter.

Degut a la presència ubíqua dels metabòlits del DEHP en les orines de la població general, la linealitat del mètode i els LD i LQ es van avaluar utilitzant corbes de calibració preparades en orina artificial. Per la resta dels assajos de validació, les corbes de calibració es van preparar a partir d'orines de subjectes sans amb concentracions baixes dels metabòlits del DEHP diluïdes en aigua. L'orina artificial es va preparar d'acord amb el protocol descrit per Brooks et al (Brooks et al, 1997): 0.1g d'àcid làctic, 0.4g d'àcid cítric, 2.1g de bicarbonat sòdic, 10g d'urea, 0.07g d'àcid úric, 0.8g de creatinina, 0.37g de clorur càlcic  $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5.2g de clorur sòdic, 0.0012g de sulfat de ferro II  $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.49g de sulfat de magnesi  $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 3.2g de sulfat de sodi  $\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 0.95g de dihidrogen fosfat de potasi, 1.2g d'hidrogen fosfat de di-potasi i 1.3g de clorur d'amoni es van disoldre en 1l d'aigua ultrapura.

Es van estudiar sis nivells de calibració: 0, 5, 10, 50, 100 i 400 ng/ml. Per al primer assaig de validació cada nivell de calibració es va preparar per quadruplicat. Les ratios entre les àrees del pic dels analits i les dels ISTD es van representar front les concentracions. El ISTD usat per a la quantificació de MEHP va ser el MEHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, el MEOHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> es va utilitzar per a la

quantificació de MEHHP i MEOHP i el 5cx-MEPP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> per a la quantificació de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP. El test de Dixon ( $\alpha=5\%$ ) es va aplicar per detectar valors aberrants entre els replicats de les ratios d'àrees a cada nivell de concentració. Per comprovar si es complia el criteri de constància de la variança al llarg de l'interval de calibració (homo/heteroscedasticitat) es va aplicar el test de Levene ( $\alpha=5\%$ ). El test F ( $\alpha=5\%$ ) es va aplicar per demostrar la fiabilitat en l'ajust del model lineal. Les corbes de calibració i els seus coeficients de determinació es van calcular a partir d'aplicar anàlisis per regressió lineal ponderat per la inversa de la concentració.

El LD i el LQ es van definir com a 3.3 i 10 cops el valor de la desviació estàndard del soroll, respectivament. Com a mesura del soroll es va utilitzar la desviació estàndard dels valors de concentració estimats d'una mostra carregada a 1 ng/ml de cada analit (n=4).

El rendiment d'extracció es va calcular amb l'anàlisi de tres replicats de mostres blanques carregades a 50 ng/ml de tots els compostos i tres replicats de mostres blanques carregades a la mateixa concentració però en les que els patrons es van afegir un cop realitzada l'extracció (senyal corresponent al 100% d'extracció). El rendiment d'extracció es va calcular per comparació de les ratios (àrea analit respecte àrea ISTD) obtingudes en les mostres carregades abans de l'extracció respecte el promig de les ratios de les mostres corresponents al 100% d'extracció.

L'efecte matriu es va haver de calcular per addicions estàndards degut a la impossibilitat d'obtenir una mostra completament lliure de tots els metabòlits. Es van calcular les concentracions dels analits en mostres d'orina (n=7) per calibració externa i per addició estàndard. Per a la calibració externa la corba de calibració es va fer en orina artificial. Es van preparar cinc nivells de concentració per duplicat: 0, 5, 10, 50 i 100 ng/ml. Les addicions estàndard es van dur a terme en cada mostra amb l'addició de quatre nivells de concentració i per duplicat (0, 5, 10 i 50 ng/ml). Finalment,

L'efecte matriu es va calcular per cada analit com la ratio entre el valor de concentració obtingut per calibració externa i l'obtingut per addicions estàndard.

Les precisions intraassaig i inter es van estimar utilitzant dues mostres de control de qualitat amb concentracions baixes i altes dels metabòlits del DEHP; respectivament. Les mostres de control de qualitat corresponien a mostres actuals obtingudes a partir de subjectes moderadament exposats a DEHP (control inferior, rang de concentracions 14-45 ng/ml pels diferents metabòlits) i pacients sotmesos a una transfusió de sang altament exposats a DEHP (control superior, rang de concentracions 54-278 ng/ml pels diferents metabòlits). Aquestes mostres es van obtenir del protocol clínic 2006/2456/1 aprovat pel comitè mèdic CEIC-IMAS (IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Espanya). La precisió intraassaig es va calcular amb l'anàlisi de tres replicats de les dues mostres control el mateix dia. La precisió interassaig es va calcular després de l'anàlisi d'aquestes dues mostres en onze dies d'assaig diferents. La precisió es va expressar com la desviació estàndard relativa de les concentracions calculades (%RSD).

### 3.3 Resultats i discussió

S'han estudiat diferents protocols de preparació de mostra i de condicions de detecció per l'anàlisi dels metabòlits del DEHP en orina en base a les dades de publicacions anteriors (Blount et al 2000; Koch et al, 2003b; Kato et al 2005; Preuss et al, 2005; Silva et al, 2007). Es va seleccionar una preparació de la mostra basada en l'extracció líquid líquid a pH 2 per a la quantificació dels metabòlits del DEHP en orina. Es va requerir d'una etapa d'hidròlisi amb  $\beta$ -glucuronidasa de *Escherichia coli* per trencar els metabòlits conjugats amb l'àcid glucurònic. Altres tipus d'enzims com la  $\beta$ -glucuronidasa procedent de *Helix pomatia* no eren adequats degut a la seva activitat



hidrolítica per convertir els ftalats al seu monoèster (Blount et al, 2000). L'extracció es va fer a pH 2 per obtenir els compostos protonats i posteriorment l'anàlisi es va fer per UPLC-MS/MS.

Pel que fa a les condicions d'optimització de LC-MS/MS es van estudiar diferents fases mòbils que contenien, aigua, acetonitril o metanol acidificat amb àcid fòrmic o acètic. Les diferents fases mòbils es van avaluar tenint present el comportament cromatogràfic dels analits i la senyal en ESI. Es van obtenir millors resultats si s'utilitzava aigua i acetonitril acidificats amb àcid fòrmic. La separació cromatogràfica es va assolir en un total de 10 minuts i els analits van eluir entre els 4.83 i els 6.11 minuts (taula 3.1).

**Taula 3.1** Temps de retenció (TR) i condicions d'adquisició MRM. Les transicions utilitzades per a la quantificació estan subratllades.

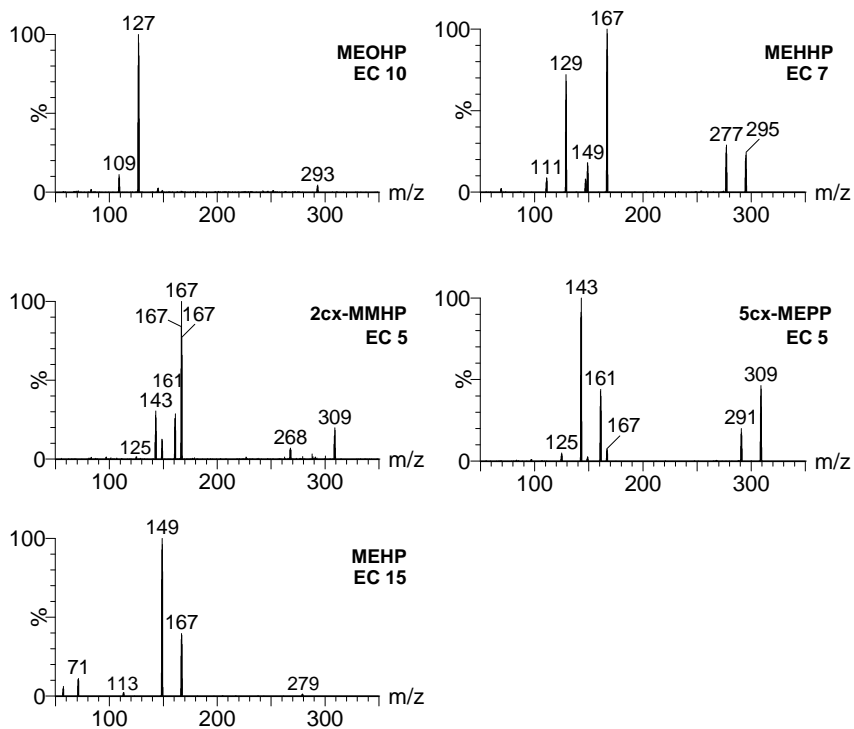
Metabòlit	MM <sup>a</sup>	TR <sup>b</sup> (min)	Mode (ESI) <sup>c</sup>	VC <sup>d</sup> (V)	EC <sup>e</sup> (eV)	Transicions (m/z)
MEHP	278.15	6.11	pos	15	15, 5	<u>279&gt;149</u> , 279>167
MEOHP	292.13	5.01	pos	10	10	<u>293&gt;127</u>
			neg	30	15	291>143
MEHHP	294.15	4.94	pos	12	7, 7	<u>295&gt;167</u> , 295>129
5cx-MEPP	308.13	4.83	pos	10	5, 5	<u>309&gt;143</u> , 309>161
2cx-MMHP	308.13	5.09	pos	10	5, 5	<u>309&gt;143</u> , 309>161
MEHP <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	282.15	6.11	pos	15	10, 10	<u>283&gt;153</u> , 283>171
MEOHP <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	296.13	5.01	pos	10	5, 10	<u>297&gt;127</u> , 297>109
5cx-MEPP <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	312.13	4.83	pos	10	5, 5	<u>313&gt;143</u> , 313>161

<sup>a</sup>MM, massa monoisotòpica; <sup>b</sup>TR, temps de retenció; <sup>c</sup>ESI, ionització per electrospai: pos, positiva;

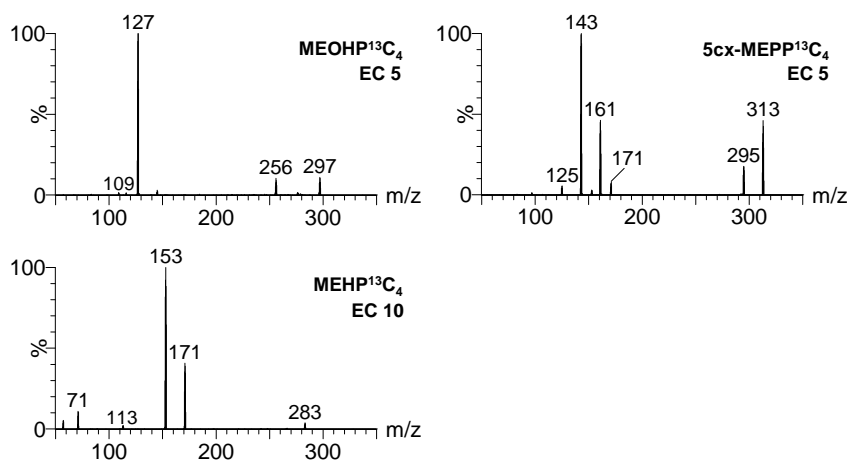
neg, negativa; <sup>d</sup>VC, voltatge de conus; <sup>e</sup>EC, energia de col·lisió.

Els paràmetres de treball en la ionització per ESI es van optimitzar per cada metabòlit del DEHP. Es van provar els modes d'ionització en positiu i en negatiu. En les nostres condicions, es va seleccionar la ionització en mode positiu ja que proporcionava més senyal. Per tots els compostos es van obtenir els ions moleculars protonats [M+H]<sup>+</sup> degut a la protonació del grup àcid carboxílic de la funció èster. En cap cas es van observar ions adductes.

El voltatge de conus es va optimitzar per maximitzar la senyal de l'ió molecular protonat i les energies de col·lisió es van ajustar per optimitzar la senyal dels ions producte més abundants. Les condicions òptimes per cada metabòlit es presenten en la taula 3.1. L'espectre de masses dels ions productes per tots els metabòlits i els seus estàndards interns per una de les energies de col·lisió òptimes es presenta en la figura 3.1.



**Figura 3.1** Espectre de masses dels ions producte procedent dels ions moleculars protonats: MEHP ( $m/z$  279), MEOHP ( $m/z$  293), MEHHP ( $m/z$  295), 5cx-MEPP ( $m/z$  309), 2cx-MMHP ( $m/z$  309), MEHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> ( $m/z$  283), MEOHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> ( $m/z$  297) i 5cx-MEPP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> ( $m/z$  313); (EC, energia de col·lisió).

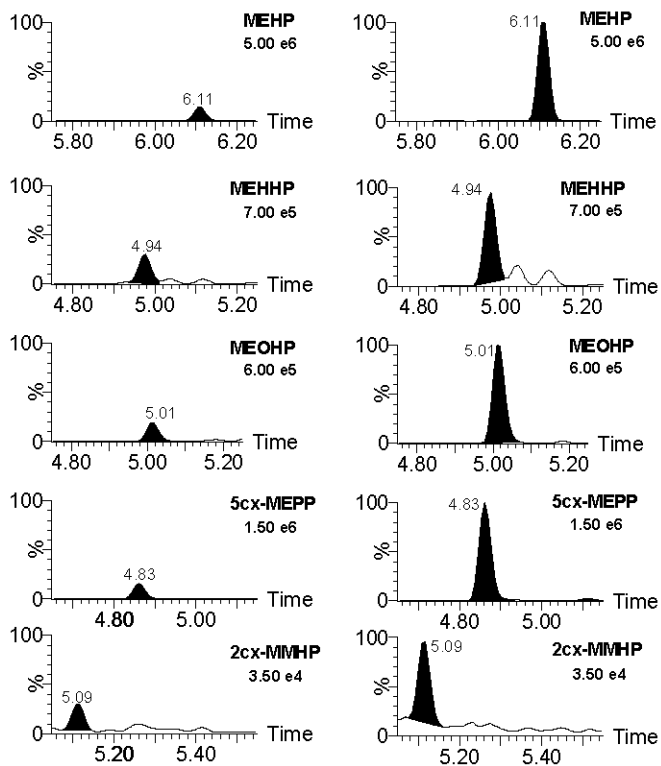


**Figura 3.1 cont.** Espectre de masses dels ions producte procedent dels ions moleculars protonats: MEHP ( $m/z$  279), MEOHP ( $m/z$  293), MEHHP ( $m/z$  295), 5cx-MEPP ( $m/z$  309), 2cx-MMHP ( $m/z$  309), MEHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> ( $m/z$  283), MEOHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> ( $m/z$  297) i 5cx-MEPP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> ( $m/z$  313); (EC, energia de col·lisió).

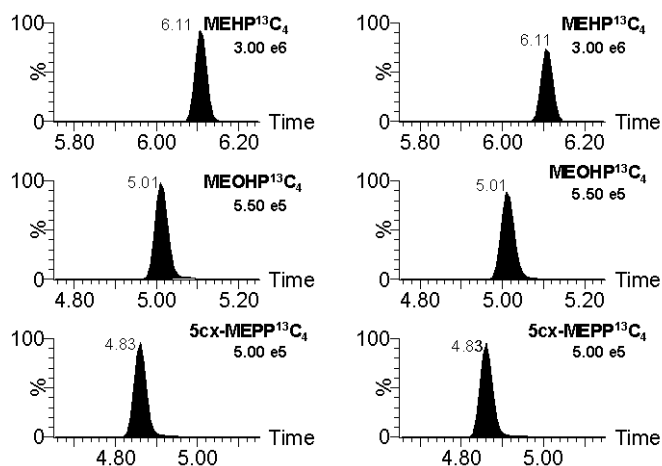
Els ions pseudomoleculars  $[M+H]^+$  dels metabòlits del DEHP presentaven un patró de fragmentació característic i dependent de l'energia de col·lisió. A energies de col·lisió baixes, es van observar els ions que procedien de pèrdues de molècules d'aigua ( $m/z$  277 i 291, per al MEHHP i el 5cx-MEPP, respectivament). Per tots els compostos, excepte el MEOHP i el seu anàleg isotòpic marcat, es van observar els ions  $m/z$  167 (àcid ftàlic protonat) i  $m/z$  149 (anhídrid ftàlic protonat). En els anàlegs marcats isotòpicament es van observar els ions equivalents a  $m/z$  171 i 153, respectivament. Per a tots els compostos es van observar els ions procedents de la protonació de la cadena lateral:  $m/z$  113 per al MEHP i el MEHP <sup>13</sup>C<sub>4</sub>,  $m/z$  127 per al MEOHP i el MEOHP <sup>13</sup>C<sub>4</sub>,  $m/z$  129 per al MEHHP i  $m/z$  143 per al 5cx-MEPP, el 2cx-MMHP i el 5cx-MEPP <sup>13</sup>C<sub>4</sub>. En la majoria de casos també es van obtenir els ions procedents de la pèrdua d'una molècula d'aigua de la cadena lateral (ions a  $m/z$  109 per al MEOHP i el MEOHP <sup>13</sup>C<sub>4</sub>;  $m/z$  111 per al MEHHP i  $m/z$

125 per al 5cx-MEPP, el 2cx-MMHP i el 5cx-MEPP <sup>13</sup>C<sub>4</sub>). Pels compostos que contenen un grup àcid carboxílic addicional en la cadena lateral (5cx-MEPP, 2cx-MMHP i 5cx-MEPP <sup>13</sup>C<sub>4</sub>) es va observar l'ió m/z 161 que es pot explicar per la protonació d'aquest grup àcid i que conté només la cadena lateral. En la taula 3.1 s'indiquen els ions utilitzats per a la quantificació.

En la figura 3.2 es mostren exemples de cromatogrames de mostres d'orines de subjectes moderadament i altament exposats a DEHP (control de qualitat inferior i superior, respectivament). Tal i com es pot observar, existeix una gran diferència en les intensitats de les senyals dels metabòlits entre les dues mostres.



**Figura 3.2** Cromatogrames de les transicions seleccionades pels metabòlits del DEHP i els ISTD. Esquerra, control de qualitat inferior; dreta, control de qualitat superior.



**Figura 3.2 cont.** Cromatogrames de les transicions seleccionades pels metabòlits del DEHP i els ISTD. Esquerra, control de qualitat inferior; dreta, control de qualitat superior.

El mètode desenvolupat és lineal en el rang de concentracions estudiat. Els coeficients de determinació van ser sempre majors de 0.99. El test F per comparar variàncies no va resultar significatiu, fet que va indicar un correcte ajust de les dades amb el model lineal al llarg de tot el rang de calibració. Els rendiments d'extracció (RE) i els límits de quantificació (LQ) i de detecció (LD) estan descrits a la taula 3.2. Els RE van ser majors del 90% per tots els metabòlits, els límits de detecció van ser inferiors a 1 ng/ml i els LQ estaven compresos entre els 1.2 i els 2.6 ng/ml.

**Taula 3.2.** Dades de validació: Rendiments d'extracció calculats a 50 ng/ml i límits de detecció i quantificació pels diferents metabòlits del DEHP.

Metabòlit	RE (%), promig $\pm$ SD (ng/ml)	LD (ng/ml)	LQ (ng/ml)
MEHP	97.1 $\pm$ 3.3	0.9	2.6
MEHHP	102.0 $\pm$ 1.1	0.6	1.9
MEOHP	94.8 $\pm$ 1.2	0.4	1.2
5 $\alpha$ -MEPP	93.8 $\pm$ 0.5	0.8	2.4
2 $\alpha$ -MMHP	90.2 $\pm$ 5.1	0.6	1.8

RE: rendiment d'extracció; SD: desviació estàndard;

LD: límit de detecció;

LQ: límit de quantificació.

Pel que fa a la especificitat del mètode, no van aparèixer pics als temps de retenció dels analits ni dels ISTD després de l'anàlisi de mostres d'orina artificial, de manera que els reactius no originaven contaminació addicional. En mostres d'orina reals, degut a l'exposició ubiqua al DEHP, es van detectar nivells baixos dels analits en la gran majoria de mostres.

Les precisions intraassaig i inter obtingudes per les mostres de control de qualitat, control inferior i control superior, es mostren a la taula 3.3. La precisió intraassaig va ser millor del 8%, mentres que la precisió interassaig va ser millor del 12%. Les dades indiquen que el mètode proporciona una adequada precisió a l'hora de quantificar els cinc metabòlits de DEHP en mostres d'orina.



**Taula 3.3.** Resultats de validació: precisió intraassaig i inter per les mostres de control de qualitat (CI i CS).

		Precisió intraassaig (N=3)		Precisió interassaig (N=11)	
Metabòlit	Nivell	Conc estimada		Conc estimada	
		(promig $\pm$ SD) (ng/ml)	Precisió (RSD%)	(promig $\pm$ SD) (ng/ml)	Precisió (RSD%)
MEHP	CI	14.9 $\pm$ 0.8	5.6	15.3 $\pm$ 1.1	6.9
	CS	131.2 $\pm$ 3.5	2.7	129.0 $\pm$ 2.7	2.1
MEHHP	CI	35.4 $\pm$ 1.6	4.6	36.0 $\pm$ 3.6	10.0
	CS	148.4 $\pm$ 1.3	0.9	137.8 $\pm$ 12.4	9.0
MEOHP	CI	29.2 $\pm$ 1.9	6.6	27.8 $\pm$ 1.3	4.5
	CS	159.0 $\pm$ 6.6	4.2	150.3 $\pm$ 4.4	2.9
5cx-MEPP	CI	44.9 $\pm$ 2.2	5.0	44.2 $\pm$ 1.8	4.0
	CS	277.5 $\pm$ 8.1	2.9	272.5 $\pm$ 6.4	2.4
2cx-MMHP	CI	18.4 $\pm$ 1.5	8.0	18.5 $\pm$ 2.2	12.0
	CS	57.0 $\pm$ 0.8	1.4	53.5 $\pm$ 5.3	9.8

CI: control inferior; CS: control superior; Conc concentració;  
SD: desviació estàndard; RSD: desviació estàndard relativa.

L'efecte matriu no va ser significatiu per al MEHP, el 5cx-MEPP i el 2cx-MMHP. Per al MEHHP i el MEOHP, les relacions entre les concentracions calculades amb la calibració externa i amb les addicions estàndard van ser de 1.2 i 1.6, respectivament, amb una desviació estàndard per a tots dos metabòlits del 20% (n=7 mostres); fet que indica un increment de la concentració per efecte matriu, sobretot per al MEOHP. La desviació estàndard obtinguda indica que aquest efecte és reproduïble entre les diferents mostres d'orina. Amb la finalitat de corregir l'efecte matriu es van usar estàndards interns marcats isotòpicament.

El mètode analític desenvolupat i validat és sensible i permet la detecció de concentracions baixes dels cinc metabòlits principals del DEHP en orina, tot i utilitzar un protocol d'extracció de la mostra més senzill que els descrits a la literatura per aquest tipus d'aplicacions (Kato et al, 2004; Silva et al, 2006b; Itoh et al, 2007). En aquest sentit, el límit de detecció obtingut per tots els metabòlits és inferior a 1 ng/ml i coincideix amb el d'altres treballs en els que fan servir extracció en fase sòlida. A més a més, el volum de mostra

necessari per l'anàlisi és baix i els temps d'anàlisi són curts, donat que s'usa la cromatografia d'ultra precisió UPLC. Per altra banda, el mètode desenvolupat utilitza la ionització per electrosprai en mode positiu, que també proporciona una sensibilitat adient per obtenir límits de detecció baixos. Per garantir la formació dels ions moleculars protonats en la ionització en mode positiu va ser necessària l'addició d'àcid fòrmic tan a la fase aquosa com al modificador orgànic; generalment la ionització en mode negatiu no necessita un pH baix i per tan és l'àcid acètic l'additiu més comunment emprat en aquests casos (Silva et al, 2004).

### **3.4 Conclusions**

El mètode proposat és efectiu, precís i utilitza un protocol de preparació de la mostra senzill, a més de temps d'anàlisi curts. Així doncs, pot ser adient per ser aplicat a les mostres d'orina en els laboratoris de control antidopatge com una tècnica de cribatge per sospitar de la pràctica de transfusions de sang. La viabilitat del mètode desenvolupat també el fa òptim per ser aplicat en estudis epidemiològics d'avaluació de l'exposició i de toxicitat del DEHP en els que el número de mostres analitzades acostuma a ser molt elevat.

### 3.5 Referències bibliogràfiques

- Albro, P. W.**, Lavenhar, S. R. (1989) Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab Rev.*, 21, 13-34.
- Arndt, P. A.**, Kumpel, B. M. (2008) Blood doping in athletes--detection of allogeneic blood transfusions by flow cytometry. *Am.J Hematol.*, 83, 657-667.
- Barr, D. B.**, Silva, M. J., Kato, K., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hurtz, D., Sadowski, M., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2003) Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ Health Perspect.*, 111, 1148-1151.
- Blount, B. C.**, Milgram, K. E., Silva, M. J., Malek, N. A., Reidy, J. A., Needham, L. L., Brock, J. W. (2000) Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal.Chem.*, 72, 4127-4134.
- Blystone, C. R.**, Kissling, G. E., Bishop, J. B., Chapin, R. E., Wolfe, G. W., Foster, P.M.D. (2010) Determination of the di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) NOAEL for reproductive development in the rat: importance of the retention of extra animals to adulthood. *Toxicology Sciences.*, 116, 640-646.
- Brooks, T.**, Keevil C. W. (1997) A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Lett Appl Microbiol.*, 24, 203-206.
- Calafat, A. M.**, Needham, L. L., Silva, M. J., Lambert, G. (2004) Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics*, 113(5), 429-434.
- European Commission.** Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices (SCMPMD). (2002) Opinion on Medical Devices Containing DEHP Plasticised PVC; Neonates and Other Groups Possibly at Risk from DEHP Toxicity. Brussels.

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scmp/out43\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scmp/out43_en.pdf)

**FDA**, US Food and Drug Administration. (2002) FDA Public Health Notification: PVC Devices Containing Plasticizer DEHP. Center of Devices and Radiological Health. U.S.

<http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm062182.htm>

**Frederiksen, H.**, Skakkebæk, N., Andersson, A. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Mol. Nutr. Food Res.* 51, 899 – 911.

**Fromme, H.**, Bolte, G., Koch, H. M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R., Liebl, B. (2007) Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health.*, 210, 21-33.

**Giraud, S.**, Robinson, N., Mangin, P., Saugy, M. (2008) Scientific and forensic standards for homologous blood transfusion anti-doping analyses. *Forensic Sci Int.*, 179(1), 23-33.

**Horowitz, B.**, Stryker, M. H., Waldman, A. A., Woods, K. R., Gass, J. D., Drago, J. (1985) Stabilization of red blood cells by the plasticizer, diethylhexylphthalate. *Vox Sanguinis.*, 48, 150–155.

**Inoue, K.**, Kawaguchi, M., Yamanaka, R., Higuchi, T., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H. (2005) Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin.Chim.Acta.*, 358, 159-166.

**Itoh, H.**, Yoshida, K., Masunaga, S. (2007) Quantitative Identification of Unknown Exposure Pathways of Phthalates Based on Measuring Their Metabolites in Human Urine. *Environ. Sci. Technol.*, 41(13), 4542–4547.

**Kato, K.**, Silva, M. J., Reidy, J. A., Hurtz, D., Malek, N. A., Needham, L. L., Nakazawa, H., Barr, D. B., Calafat, A. M. (2004) Mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect.*, 112, 327-330.

**Kato, K.**, Silva, M. J., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2005) Determination of total phthalates in urine by isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 814, 355-360.

- Koch, H. M.,** Rossbach, B., Drexler, H., Angerer, J. (2003a) Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates--determination of secondary and primary phthalate monoester metabolites in urine. *Environ Res.*, 93, 177-185.
- Koch, H. M.,** Gonzalez-Reche, L. M., Angerer, J. (2003b) On-line clean-up by multidimensional liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry for high throughput quantification of primary and secondary phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 784, 169-182.
- Koch, H. M.,** Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J. (2005) New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch.Toxicol.*, 79, 367-376.
- Koch, H. M.,** Preuss, R. and Angerer, J. (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl.*, 29, 155-165.
- Koch, H. M.,** Calafat, A. M. (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos.Trans.R.Soc.B.*, 364, 2063-2078.
- Latini, G.,** Verrotti, A., De Felice, C. (2004) Di-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.*, 4(1), 37-40.
- Lottrup, G.,** Anderson, A. M, Leffers, H., Mortensen, G. K. Toppari, J., Skakkebaek, N. E., Main, K. M. (2006) Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *Int J Androl.*, 29, 172-180.
- Pan, G.,** Hanaoka, T., Yoshimura, M., Zhang, S., Wang, P., Tsukino, H., Inoue, K., Nakazawa, H., Tsugane, S., Takahashi, K. (2006) Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environ Health Perspect.*, 114, 1643-1648.
- Preuss, R.,** Koch, H. M., Angerer, J. (2005) Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 816, 269-280.

- Silva, M. J.,** Barr, D. B., Reidy, J. A., Kato, K., Malek, N. A., Hodge, C. C., Hurtz, D., III, Calafat, A. M., Needham, L. L., Brock, J. W. (2003) Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch.Toxicol.*, 77, 561-567.
- Silva, M. J.,** Slakman, A. R., Reidy, J. A., Preau, J. L., Jr., Herbert, A. R., Samandar, E., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2004) Analysis of human urine for fifteen phthalate metabolites using automated solid-phase extraction. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 805, 161-167.
- Silva, M. J.,** Samandar, E., Preau, J. L., Jr., Needham, L. L. and Calafat, A. M. (2006a) Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*, 219, 22-32.
- Silva, M. J.,** Reidy, J. A., Preau, J. L., Samandar, E., Needham, L. L. and Calafat, A. M. (2006b) Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Biomarkers*, 11, 1-13.
- Silva, M. J.,** Samandar, E., Preau, J. L., Jr., Reidy, J. A., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2007) Quantification of 22 phthalate metabolites in human urine. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 860, 106-112.
- Simmchen, J.,** Ventura, R., Segura, J. (2012) Progress in the removal of di-[2-ethylhexyl]-phthalate (DEHP) as the plasticizer in blood bags. *Transf Med Rev.*, 26, 27-37.
- Solymos, E.,** Guddat, S., Geyer, H., Flenker, U., Thomas, A., Segura, J., Ventura, R., Platen, P., Schulte-Mattler, M., Thevis, M., Schanzer, W. (2011a) Rapid determination of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a marker for blood transfusion in sports drug testing. *Anal.Bioanal.Chem.*, 401, 517-528.
- Solymos, E.,** Guddat, S., Geyer, H., Thomas, A., Thevis, M., Schänzer, W. (2011b) Di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites as markers for blood transfusion in doping control: Intra-individual variability of urinary concentrations. *Drug Test Analysis*, 3, 892-895.

## **CAPÍTOL 4**

---

### **METABÒLITS DE DEHP EN ORINA D'ATLETES COM A MÈTODE DE CRIBATGE DE L'ÚS IL·LÍCIT DE DOPATGE SANGUINI: ESTUDI COMPARATIU AMB PACIENTS SOTMESOS A TRANSFUSIONS SANGUÍNIES**

Monfort N, Ventura R, Latorre A, Belalcazar V, López M, Segura J. [Urinary di-\(2-ethylhexyl\)phthalate metabolites in athletes as screening measure for illicit blood doping: a comparison study with patients receiving blood transfusion.](#) Transfusion. 2010 Jan;50(1):145-9.





## CAPÍTOL 5

---

### **PLASTIFICANTS EXCRETATS EN ORINA: INDICI DE L'ÚS DE TRANSFUSIONS DE SANG AUTÒLOGA EN L'ESPORT**



## **5.1 ESTUDI DELS METABÒLITS MEHP, MEHHP I MEOHP**

---

Monfort N, Ventura R, Platen P, Hinrichs T, Brixius K, Schanzer W, et al. [Plasticizers excreted in urine: indication of autologous blood transfusion in sports.](#) Transfusion. 2012 Mar; 52(3):647-657.



## **5.2 ESTUDI DELS METABÒLITS**

### **5cx-MEPP I 2cx-MMHP**

---





## **5.2.1 Introducció**

Els diferents metabòlits del DEHP s'utilitzen per avaluar l'exposició de la població a aquest plastificant. Els metabòlits MEHP, MEHHP i MEOHP van ser els primers en utilitzar-se com a marcadors. Posteriorment, es va demostrar que les concentracions dels metabòlits més oxidats 5cx-MEPP i 2cx-MMHP també eren indicatives del grau d'exposició (Preuss et al, 2005; Koch et al, 2009; Lorber et al, 2010).

L'objectiu d'aquest capítol és estudiar els nivells de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP en voluntaris sans dies abans i després que hagin rebut una transfusió de sang autòloga.

## **5.2.2 Material i mètodes**

### **5.2.2.1 Material i reactius**

Els reactius i les substàncies de referència utilitzades estan descrites en l'apartat de material i mètodes del capítol 3.

### **5.2.2.2 Mostres analitzades**

Les mostres d'orina analitzades estan descrites en l'apartat de material i mètodes del capítol 5.1.

### **5.2.2.3 Preparació de la mostra**

El procediment seguit per a la preparació de la mostra es detalla en l'apartat 3.2.4 del capítol 3.

#### **5.2.2.4 Anàlisi instrumental**

Les condicions d'anàlisi instrumental es descriuen en el capítol 3.

#### **5.2.2.5 Càlculs i anàlisi estadístic**

Les anàlisis estadístiques aplicades es detallen en l'apartat de material i mètodes del capítol 5.1.

### **5.2.3 Resultats i discussió**

Les concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP es presenten en les taules 5.2.1 i 5.2.2. En elles s'indiquen els percentils de distribució 10, 25, 50, 75 i 90 juntament amb el valor màxim. Les concentracions corresponents a les mostres recollides al voltant del dia de l'extracció de sang es presenten en la primera taula. En la segona, es mostren les concentracions obtingudes el dia de la transfusió i també dies abans i posteriors a aquest.

La mediana de les concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP dies abans i després de la flebotomia oscil·la entre 8.7 i 20.6 ng/ml i 8.8 i 13.4 ng/ml, respectivament. Aquests valors són molt propers als valors de la mediana de 13.4 i 10.3 ng/ml de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP respectivament, corresponents a les mostres després de 21 dies de la transfusió de la sang (dia 21 en la taula 5.2.2, es considera el dia més lliure de contaminació per DEHP deguda a la transfusió). Així, el procés de flebotomia, tal i com també es va observar pels metabòlits MEHP, MEHHP i MEOHP, no ocasiona variacions significatives de les concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP.

La distribució de les concentracions el dia de la transfusió s'indica en el dia 0 de la taula 5.2.2. Els nivells obtinguts per aquests dos metabòlits aquest dia són molt elevats i el percentil 90 se situa a 2415.1 i 509.4 ng/ml de

5cx-MEPP i 2cx-MMHP, respectivament. Les concentracions continuen elevades un dia després de la transfusió i lleugerament elevades dos dies després, especialment pel 2cx-MMHP (dies 1 i 2 a la taula 5.2.2). A diferència del que s'observa sobretot pel MEHP, MEHHP i MEOHP, els nivells de 2cx-MMHP el dia després de la transfusió són molt elevats i gairebé del mateix ordre als del mateix dia de la transfusió (mediana de concentracions 137.4 i 143.6 ng/ml el dia de la transfusió i un dia després, respectivament), fet estrictament relacionat amb què la vida mitjana del 2cx-MMHP és la més llarga de tots cinc metabòlits.

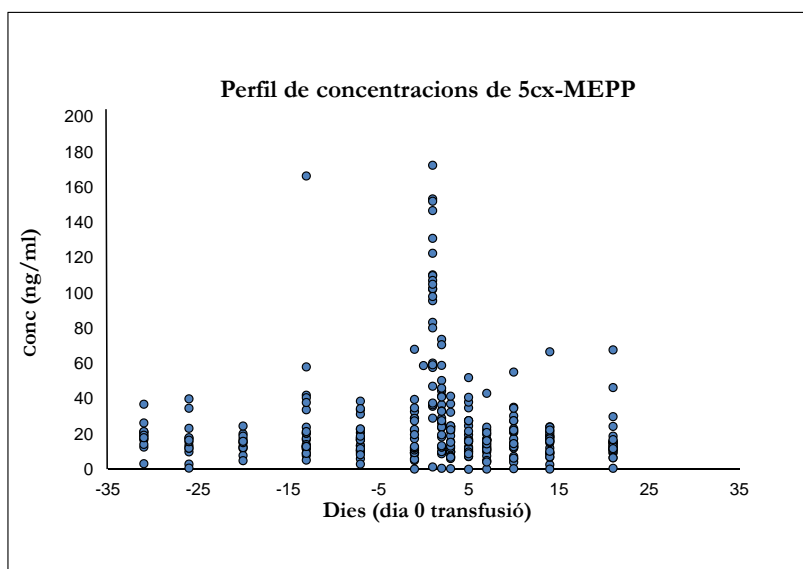
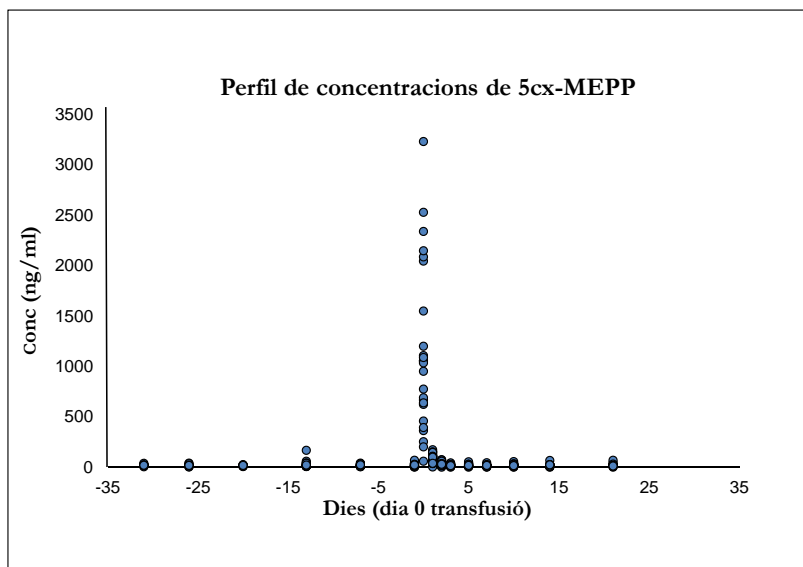
**Taula 5.2.1** Distribució de concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP ajustades per gravetat específica dies abans i després de la flebotomia (des de 4 dies abans fins entre 1 i 21 dies després).

Metabòlit	Dies al voltant flebotomia	n	Concentració (ng/ml)					Màx
			percentil 10	percentil 25	percentil 50	percentil 75	percentil 90	
5cx-MEPP	-4	13	7.0	15.5	19.0	21.4	32.8	37.0
	1	24	2.5	3.0	8.7	17.2	37.9	120.8
	7	22	5.3	10.1	13.2	17.3	23.3	38.7
	14	13	6.9	13.0	20.6	35.9	51.2	58.2
	21	13	9.7	15.1	18.9	27.1	34.2	34.5
2cx-MMHP	-4	13	5.2	7.4	13.2	16.8	23.3	27.2
	1	24	5.5	11.7	13.4	17.9	41.1	166.5
	7	22	2.9	5.2	8.8	11.0	20.6	40.7
	14	13	9.6	10.7	12.1	17.5	46.0	53.4
	21	13	7.3	9.7	12.6	16.0	24.4	26.2

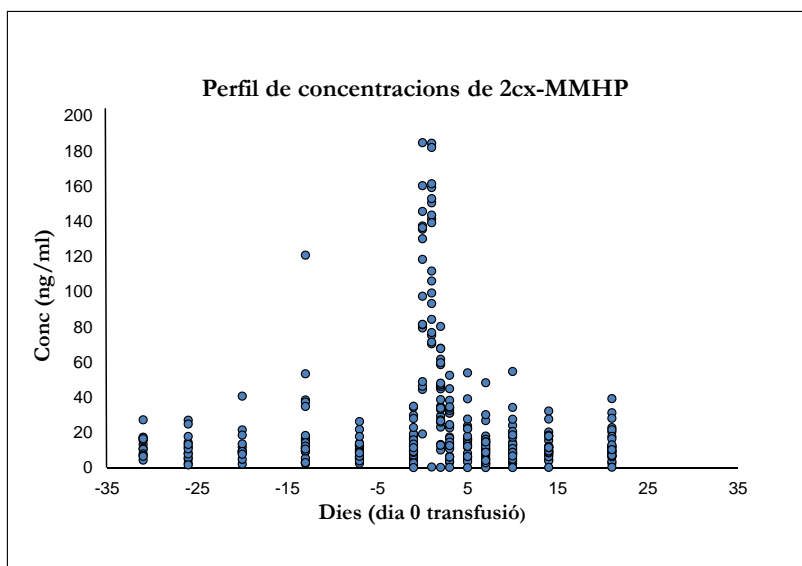
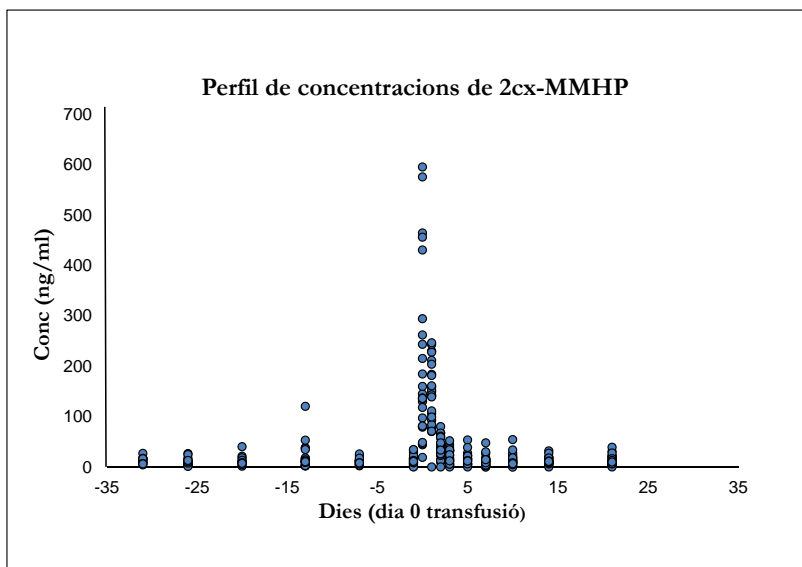
**Taula 5.2.2** Distribució de concentracions ajustades per gravetat específica de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP dies abans i després de la transfusió de sang (dia 0 correspon a la transfusió).

Metabòlit	Dies al voltant reinfusió	n	Concentració (ng/ml)					Màx
			percentil 10	percentil 25	percentil 50	percentil 75	percentil 90	
5cx-MEPP	-7	23	4.2	10.4	16.7	22.8	34.2	38.7
	-1	24	5.4	9.4	12.7	28.6	37.3	68.1
	0	25	231.9	539.4	1035.6	1797.4	2415.1	3231.8
	1	25	33.1	52.5	98.1	116.5	152.7	172.5
	2	25	9.6	15.9	27.6	43.1	63.7	73.8
	3	25	6.5	9.9	19.1	24.3	34.3	41.6
	5	24	7.4	10.4	16.4	27.6	39.5	52.1
	7	25	4.4	10.4	14.5	16.9	23.0	43.2
	10	24	5.0	12.2	14.9	26.5	35.0	55.2
	14	24	4.8	9.4	16.2	20.6	24.1	66.7
	21	25	6.6	11.1	13.4	16.5	36.5	67.9
2cx-MMHP	-7	23	3.0	5.8	9.4	12.8	20.2	26.2
	-1	24	1.9	6.2	12.8	18.9	32.0	34.9
	0	25	45.6	81.4	137.4	278.6	509.4	595.9
	1	25	71.0	88.9	143.6	194.2	235.7	246.8
	2	25	11.7	24.5	34.5	53.3	67.8	80.3
	3	25	3.4	8.6	17.5	33.2	41.0	52.5
	5	24	3.9	6.5	14.2	22.2	33.4	54.0
	7	25	2.1	4.8	11.0	15.2	28.1	48.3
	10	24	3.1	7.7	12.3	19.0	30.9	54.7
	14	24	4.2	8.0	11.4	17.3	23.9	32.3
	21	25	3.2	6.9	10.3	19.1	29.3	39.3

El perfil de concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP per tots els voluntaris (n=25) al llarg dels dies abans i després de la reinfusió dels eritròcits es mostra en les figures 5.2.1a i 5.2.1b (dia 0 correspon a la transfusió).



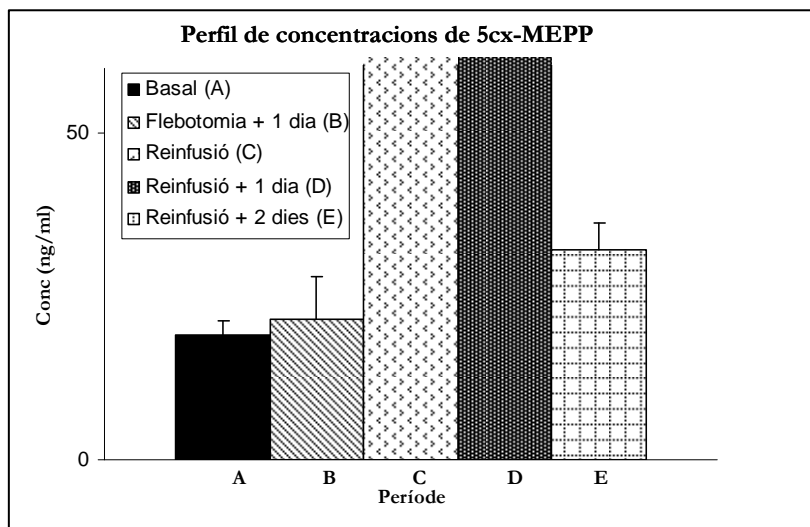
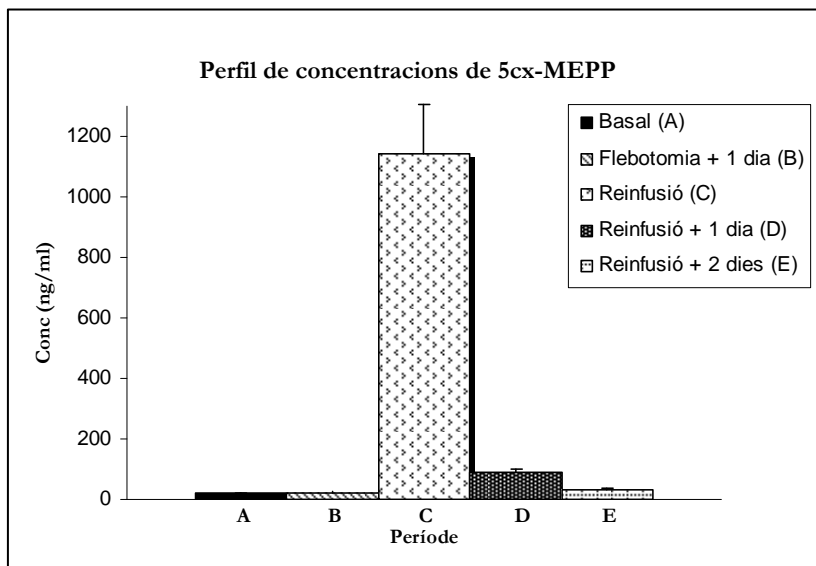
**Figura 5.2.1a** Perfil de concentracions de 5cx-MEPP ajustades per gravetat específica per tots els voluntaris (n=25; eix de concentracions ampliat en la figura inferior).



**Figura 5.2.1b** Perfil de concentracions de 2cx-MMHP ajustades per gravetat específica per tots els voluntaris (n=25; eix de concentracions ampliat en la figura inferior).

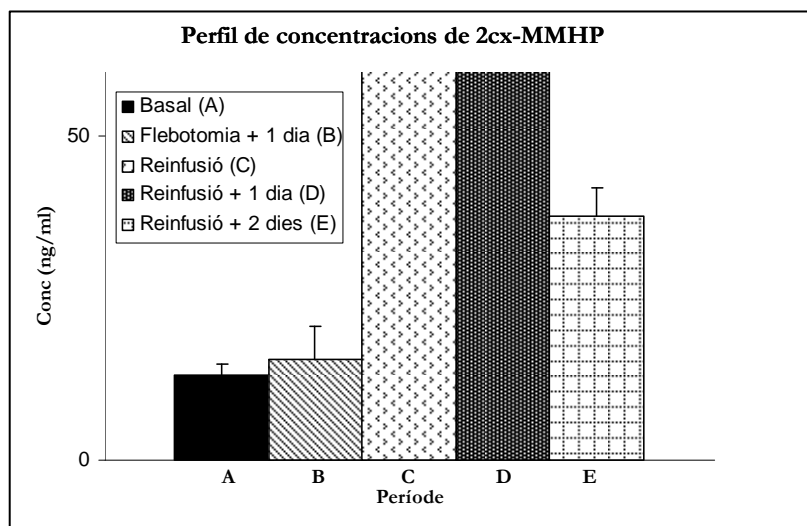
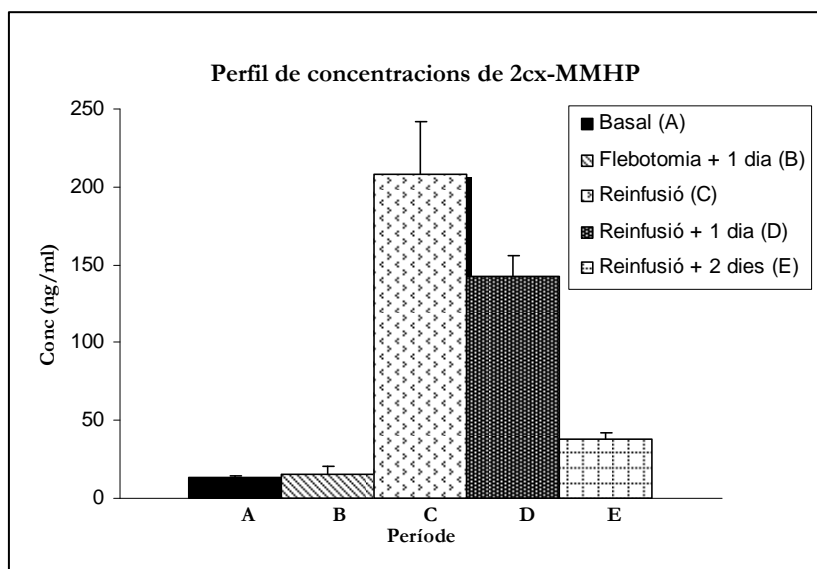
Durant el dia de la reinfusió s'observa clarament en els gràfics l'elevació de les concentracions dels respectius metabòlits. El dia després disminueixen les concentracions però encara són de l'ordre dels centenars de ng/ml, la mitjana és de 89.6 ng/ml pel 5cx-MEPP i de 142.8 ng/ml pel 2cx-MMHP.

Per tal de comparar les concentracions dels dos metabòlits en les diferents situacions de l'estudi d'autotransfusió les mostres dels voluntaris es van agrupar en cinc grups: A, basal; B, dia després de la flebotomia; C, dia de la reinfusió; D, un dia després de la reinfusió; E, dos dies després de la reinfusió. En les Figures 5.2.2a i 5.2.2b queden representats aquests grups. S'observa principalment que pel 2cx-MMHP les concentracions dos dies després de la reinfusió continuen elevades i es poden diferenciar d'una situació basal.



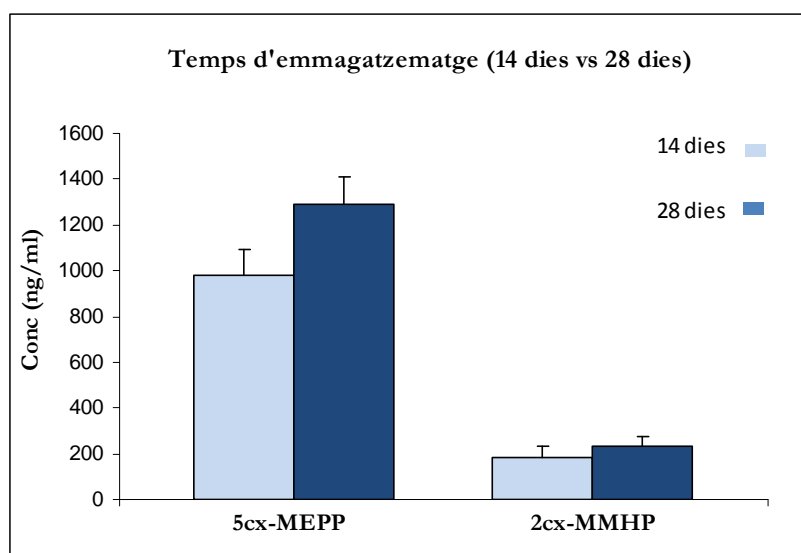
**Figura 5.2.2a** Mitjana i error estàndard de les concentracions ajustades per gravetat específica de 5cx-MEPP en cinc situacions diferents (eix de concentracions ampliat en la figura inferior).





**Figura 5.2.2b** Mitjana i error estàndard de les concentracions ajustades per gravetat específica de 2cx-MMHP en cinc situacions diferents (eix de concentracions ampliat en la figura inferior).

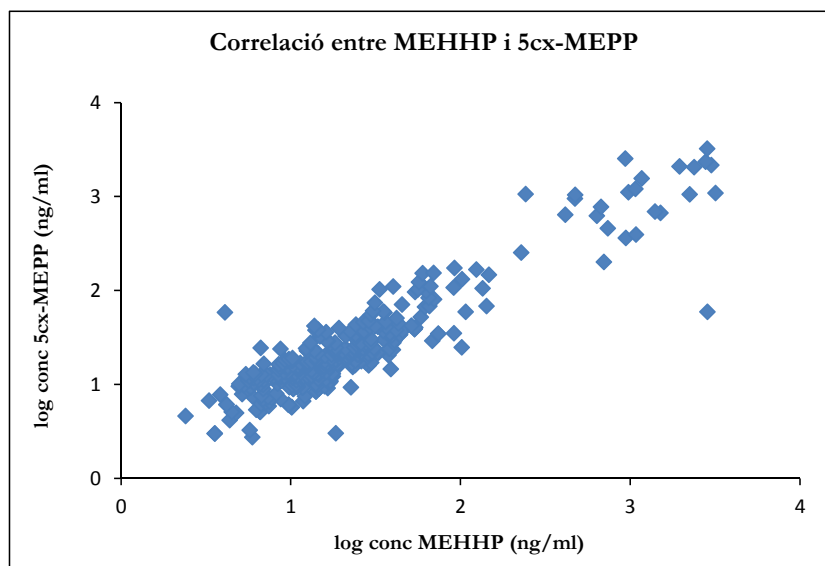
El disseny de l'estudi va permetre que a una part dels voluntaris se'ls transfongués sang que havia estat emmagatzemada durant 14 dies (grup 1, n=12) i a l'altra part després de 28 dies (grup 2, n=13). En la figura 5.2.3 es presenta la mitjana de concentracions dels dos metabòlits pels dos grups de voluntaris el dia de la reinfusió. S'observa que la mitjana de concentracions és lleugerament més elevada en el cas dels subjectes que havien rebut sang conservada durant 28 dies, però les diferències no van resultar estadísticament significatives.



**Figura 5.2.3** Mitjana i error estàndard de les concentracions ajustades per gravetat específica obtingudes el dia de la reinfusió (Grup 1, 14 dies, n=12; Grup 2, 28 dies, n=13).

Les correlacions entre els logaritmes de les concentracions de MEHHP i 5cx-MEPP es mostren en la figura 5.2.4, el coeficient de correlació de Pearson que es va obtenir va ser de 0.919 (no es van considerar per l'anàlisi les concentracions inferiors al límit de quantificació de la tècnica). Aquest

tipus de correlacions ha estat descrit per diferents grups i el situen a 0.91 quan es tracta de MEHHP i 5cx-MEPP (Silva et al, 2006b; Frederiksen et al, 2010).



**Figura 5.2.4** Correlació entre MEHHP i 5cx-MEPP.

Per avaluar la variabilitat intraindividual es van calcular els coeficients de variació de les concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP per cadascun dels voluntaris al llarg de diferents dies abans de la reinfusió. Les dades triades per realitzar l'avaluació de la variabilitat corresponen a totes aquelles mostres d'orina que estaven considerablement allunyades del dia de la reinfusió, per tal d'evitar que les variacions en les concentracions estiguessin originades per la transfusió (no s'inclouen dades entre el dia de la reinfusió i els cinc dies posteriors). Els valors es presenten a la taula 5.2.3. La mitjana dels coeficients de variació és de 43.5% per al 5cx-MEPP i 54.5% per al 2cx-MMHP. Aquests valors són del mateix ordre que els obtinguts per al MEHP, el

MEHHP i el MEOHP descrits al capítol 5.1, que van estar compresos entre 53.6% i 64.0%.

**Taula 5.2.3** Distribució individual de concentracions ajustades per gravetat específica de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP dies abans de la reinfusió.

Grup	Sexe	5cx-MEPP			2cx-MMHP		
		Mitjana (ng/ml)	CV (%)	Rang (ng/ml)	Mitjana (ng/ml)	CV (%)	Rang (ng/ml)
1	d	32.2	43.8	22.2-42.1	34.2	18.0	29.8-38.5
	h	64.1	138.5	8.9-166.4	49.3	125.5	10.8-120.7
	h	15.5	40.9	11.0-22.7	7.5	110.3	2.5-17.0
	h	9.4	1.4	9.3-9.5	4.6	34.7	2.8-5.9
	d	11.6	13.1	10.6-13.3	5.3	65.8	2.4-9.4
	d	6.4	23.1	5.7-8.0	5.1	29.7	3.4-5.8
	h	14.8	29.9	11.7-17.9	7.5	31.5	5.8-9.1
	h	13.6	26.3	10.4-17.5	10.2	51.0	5.2-15.6
	d	8.7	84.6	3.0-16.9	16.1	114.4	3.9-37.3
	h	21.9	69.2	9.3-38.7	5.3	81.3	1.0-9.6
	h	10.4	39.7	5.7-13.5	4.7	70.2	2.7-8.5
	d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
2	d	26.2	72.0	9.9-58.2	20.8	80.4	8.3-53.4
	h	14.0	46.9	3.0-33.8	14.0	46.9	2.5-17.0
	h	13.7	13.6	13.0-16.8	8.3	26.3	5.0-10.9
	h	19.7	41.8	11.9-33.9	10.1	42.9	2.0-14.3
	d	22.2	51.4	7.9-40.7	22.2	51.4	8.5-34.8
	d	16.2	40.7	11.8-34.7	16.2	40.7	9.5-27.2
	h	26.9	29.5	17.6-37.0	17.4	52.4	5.7-28.0
	d	8.1	67.5	0.7-20.8	8.1	67.5	1.6-15.9
	h	21.8	48.8	8.4-35.0	21.8	48.8	10.9-40.7
	d	13.1	14.0	12.1-29.0	13.1	14.0	11.2-16.3
	h	18.3	55.3	12.0-68.1	18.3	55.3	7.8-35.0
	h	23.1	37.3	15.2-27.6	10.2	23.1	7.0-13.4
h	19.1	14.6	15.9-23.0	9.7	26.4	6.5-13.3	
		<b>Mitjana CV (%)</b>	43.5		54.5		
		<b>95% IC (%)</b>	32.1-57.2		41.9-67.9		

h= home, d= dona, CV= Coeficient de variació, IC= Interval de confiança, n.d= no disponible

## 5.2.4 Conclusions

Les concentracions obtingudes el dia de la reinfusió i dies després dels metabòlits 5cx-MEPP i 2cx-MMHP indiquen que aquests també poden ser utilitzats com a marcadors de l'ús de transfusions en l'esport. Un fet a destacar és que pel 2cx-MMHP les concentracions es mantenen significativament elevades un dia després de la reinfusió, degut a que té una

vida mitjana més llarga que els altres metabòlits (Koch et al, 2005; Koch et al, 2006; Frederiksen et al, 2007). En aquest sentit, el 2cx-MMHP sembla tenir una finestra de detecció més ampla després de la transfusió i per tant, pot ser un marcador que faci sospitar l'ús d'una transfusió en un interval de temps més llarg al que ho farien els altres quatre metabòlits proposats al llarg del treball.

Les concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP obtingudes els dies més allunyats de la transfusió són equivalents als descrits en població general per altres grups d'investigació; la mediana de les concentracions dels diferents estudis se situa entre els 11.5 i els 85.5 ng/ml pel 5cx-MEPP i els 5.8 i 36.6 ng/ml pel 2cx-MMHP (Silva et al, 2006a; Silva et al, 2006b; Göen et al, 2011; Kasper et al, 2012).

Pel que fa a la influència del temps d'emmagatzematge i les concentracions detectades en orina, sembla indicar que aquestes són més altes quan el temps d'emmagatzematge dels eritròcits és més alt degut a que la lliberació del DEHP cap a la bossa incrementa amb el temps (Inoue et al, 2005).

S'ha comprovat que existeix un grau de variabilitat en les concentracions de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP per un mateix individu al llarg de diferents dies. Els coeficients de variació de les concentracions per aquests dos metabòlits són molt similars als ja obtinguts pels altres metabòlits. Si bé les concentracions de la població general en orina se situen a nivells baixos per aquests dos metabòlits, tampoc es pot descartar que un mateix subjecte pugui originar puntualment una excreció en orina de 5cx-MEPP i 2cx-MMHP més elevada sense causes definides.



### 5.2.5 Referències bibliogràfiques

- Frederiksen, H.,** Skakkebaek, N. E., Andersson, A. M. (2007) Metabolism of phthalates in humans. *Mol.Nutr.Food Res.*, 51, 899-911.
- Frederiksen, H.,** Jorgensen, N., Andersson, A. M. (2010) Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal.Toxicol.*, 34, 400-410.
- Göen, T.,** Dobler, L., Koschorreck, J., Muller, J., Wiesmuller, G. A., Drexler, H., Kolossa-Gehring, M. (2011) Trends of the internal phthalate exposure of young adults in Germany-Follow-up of a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg. Environ Health.*, 215, 36-45.
- Inoue, K.,** Kawaguchi, M., Yamanaka, R., Higuchi, T., Ito, R., Saito, K., Nakazawa, H. (2005) Evaluation and analysis of exposure levels of di(2-ethylhexyl) phthalate from blood bags. *Clin.Chim.Acta.*, 358, 159-166.
- Kasper-Sonnenberg, M.,** Koch, H. M., Wittsiepe, J., Wilhelm, M. (2012) Levels of phthalate metabolites in urine among mother-child-pairs - Results from the Duisburg birth cohort study, Germany. *Int J Hyg. Environ Health.* 215(3), 373-382.
- Koch, H. M.,** Bolt, H. M., Preuss, R., Angerer, J. (2005) New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch.Toxicol.*, 79, 367-376.
- Koch, H. M.,** Preuss, R., Angerer, J. (2006) Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure-- an update and latest results. *Int J Androl.*, 29, 155-165.
- Koch, H. M.,** Calafat, A. M. (2009) Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos.Trans.R.Soc.B.*, 364, 2063-2078.
- Lorber, M.,** Angerer, J., Koch, H. M. (2010) A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to di-2-ethylhexyl phthalate. *J Expo Sci Environ Epidemiol.*, 20(1), 38-53.

- Preuss, R., Koch, H. M., Angerer, J.** (2005) Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 816, 269-280.
- Silva, M. J., Samandar, E., Preau, J. L., Jr., Needham, L. L., Calafat, A. M.** (2006a) Urinary oxidative metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate in humans. *Toxicology*, 219, 22-32.
- Silva, M. J., Reidy, J. A., Preau, J. L., Samandar, E., Needham, L. L., Calafat, A. M.** (2006b) Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Biomarkers*, 11, 1-13.



## **CAPÍTOL 6**

---

### **CONCENTRACIONS DE METABÒLITS DE DEHP EN ORINA DE DIFERENTS TIPUS DE POBLACIONS**



## **6.1 Introducció**

El di(2-etilhexil) ftalat (DEHP) està considerat com un contaminant ambiental degut a que està present en molts productes quotidians a més, també forma part de productes utilitzats en algunes aplicacions específiques com per exemple, les bosses emprades en les transfusions de sang. En aquesta última aplicació i d'acord amb els resultats presentats en els capítols 4 i 5, les concentracions dels metabòlits de DEHP en orina s'elevan significativament després de rebre una transfusió.

La possible utilització dels metabòlits de DEHP com a marcadors de l'ús de transfusions en l'esport fa necessària la definició del rang de concentracions normal d'aquests metabòlits en orina de la població general. A la literatura estan publicats els nivells de concentració dels metabòlits en varies tipus de cohorts donada la importància del DEHP sobre la salut, però és important que es generin el major número de dades possibles (Preuss et al, 2005; Wittassek et al, 2007; Göen et al, 2011). Recentment, Solymos i els seus col·laboradors han descrit les concentracions d'alguns d'aquests metabòlits en un grup control i també en un grup d'esportistes (Solymos et al, 2011a).

També serà necessari l'establiment de límits de referència per cada metabòlit, que permetin decidir si una mostra té concentracions anormalment elevades dels metabòlits que podrien ser indicació de l'ús d'una transfusió.

En aquest capítol es descriuen les concentracions dels cinc metabòlits de DEHP obtingudes en mostres procedents de població general i en mostres d'esportistes de diferents disciplines, amb la finalitat de definir els rangs basals dels metabòlits i els valors límits de referència esmentats.

## 6.2 Material i mètodes

### 6.2.1 Material i reactius

Els reactius i les substàncies de referència utilitzades estan descrites en l'apartat de material i mètodes del capítol 3.

### 6.2.2 Mostres analitzades

Es van quantificar els metabòlits de DEHP en orines de dos tipus de poblacions. La primera incloïa 30 voluntaris sans que reflectien l'exposició comú per DEHP (grup control). Aquests voluntaris no havien rebut cap transfusió de sang ni cap tractament mèdic que impliqués equipament de plàstic. Els voluntaris van ser seleccionats per la Unitat de Recerca Clínica de l'IMIM-Hospital de Mar d'acord amb el protocol clínic aprovat pel comitè mèdic CEIC-IMAS (IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Espanya, protocol 2006/2456/1). La mitjana d'edat era de  $23.67 \pm 2.34$  anys (rang: 21-31 anys) i la distribució per sexe era de 50% homes i 50% dones. Es van recollir mostres d'orina de 24 hores que es van emmagatzemar en tubs de polipropilè a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

El segon grup en el que es van quantificar els metabòlits del DEHP corresponia a esportistes. Es van analitzar un total de 464 mostres d'orina de controls antidopatge oficials (principalment de natació, ciclisme i atletisme). En aquest cas, es van recollir orines puntuals en ampolles de vidre, que van quedar emmagatzemades a  $-20^{\circ}\text{C}$  fins a l'anàlisi.

### **6.2.3 Preparació de la mostra**

El procediment seguit per a la preparació de la mostra es detalla en l'apartat 3.2.4 del capítol 3.

### **6.2.4 Anàlisi instrumental**

Les condicions d'anàlisi instrumental s'assenyalen en l'apartat 3.2.5 del capítol 3.

### **6.2.5 Càlculs i anàlisi estadístic**

Tots els resultats de concentració van ser corregits per gravetat específica utilitzant la següent fórmula:

$$\text{Concentració ajustada} = \text{Concentració} \cdot [(1.020 - 1) / (\text{gravetat específica de la mostra} - 1)]$$

Aquesta correcció matemàtica per gravetat específica s'usa en les anàlisis de control antidopatge per molts analits (WADA, 2004). El tractament estadístic de les dades es va fer amb les concentracions transformades en logaritme i amb el software SPSS 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). El programa RefVal (RefVal 4.11, Oslo, Norway) es va fer servir per a la determinació dels límits superiors de referència (LR) i la detecció de valors extrems. Es va calcular el fractil 99.9% dels límits de referència per estimacions paramètriques (Solberg, 1995).

## 6.3 Resultats i discussió

### 6.3.1 Concentracions en orina de diferents tipus de poblacions

L'ús de les transfusions de sang produeix un augment en les concentracions dels metabòlits del DEHP en orina (veure capítols 4 i 5). Per altra banda, el DEHP està present arreu i la població general hi està constantment exposada. Per tal de tenir un criteri per sospitar d'una exposició aguda al DEHP (per exemple, una transfusió de sang) és necessari definir el rang habitual de les concentracions dels metabòlits del DEHP. Per aquest motiu, es va quantificar els metabòlits del DEHP en diferents grups de poblacions.

Tenint present les possibles diferències en les mostres d'orina degut al diferent estat de dilució d'aquestes, es va mesurar la gravetat específica de les mostres. Tots els resultats de concentració es van corregir per gravetat específica, tal i com és habitual en els laboratoris de control antidopatge per minimitzar les variacions entre mostres (WADA, 2004). Els resultats de les concentracions ajustades per gravetat específica de tots els metabòlits del DEHP pels diferents grups estudiats es mostren a la taula 6.1. A la taula 6.1 es presenten els percentils de concentració 10, 25, 50, 75 i 90 de cada un dels metabòlits.

**Taula 6.1.** Distribució de concentracions corregides per gravetat específica dels metabòlits del DEHP en subjectes del grup control i en esportistes.

		Concentració (ng/ml)				
		Percentil				
Grup	Metabòlit	10	25	50	75	90
Control n=30	MEHP	5.1	8.1	16.0	22.7	26.4
	MEHHP	11.8	31.1	51.4	80.2	112.7
	MEOHP	9.1	20.2	38.2	65.1	111.7
	5cx-MEPP	17.4	33.2	55.0	109.2	143.1
	2cx-MMHP	10.7	22.5	34.0	60.5	169.0
Esportistes n=464	MEHP	2.5	3.5	5.5	9.4	15.3
	MEHHP	10.9	15.8	27.3	44.3	76.0
	MEOHP	5.1	8.5	13.6	22.0	39.8
	5cx-MEPP	12.3	18.8	28.4	46.7	81.8
	2cx-MMHP	8.4	12.8	21.1	33.8	66.2

Els nivells observats en el grup control pels cinc metabòlits estan d'acord amb els primers estudis publicats (Preuss et al, 2005). Si bé, les concentracions són lleugerament més elevades a les publicades a la literatura els darrers anys, possiblement degut a que s'han analitzat mostres d'orina de 24 hores (Barr et al, 2003; Fromme et al, 2007; Wittassek et al, 2007; Frederiksen et al, 2010).

La distribució de les concentracions dels metabòlits del DEHP en les mostres dels esportistes també es presenta en la taula 6.1. Els nivells observats pel grup d'esportistes per MEHP, MEHHP, MEOHP i 5cx-MEPP estan d'acord amb dades publicades (Fromme et al, 2007; Wittassek et al, 2007; Frederiksen et al, 2010; Colacino et al, 2010; Solymos et al, 2011a). Pel 2cx-MMHP la mediana de les concentracions és equivalent a la descrita per Guo i col·laboradors (Guo et al, 2011), però lleugerament més elevada que la reportada per altres grups (Fromme et al, 2007, Wittassek et al, 2007). Tal i com es va descriure en el capítol 4, les concentracions de tots els metabòlits

en els atletes són lleugerament més baixes a les del grup control. Aquesta diferència podria estar relacionada amb el procés de presa de mostra (mostres d'orina de 24 hores vs mostres puntuals). Es coneix que les concentracions dels metabòlits dels ftalats en mostres d'orina de primera hora del matí tendeixen a ser més elevades que les trobades en mostres recollides durant el dia (Frederiksen et al, 2011). Per aquesta raó, és d'esperar que les concentracions dels metabòlits a les mostres puntuals recollides durant el dia (esportistes) són menors a les recollides durant 24 hores (control).

### **6.3.2 Límits de referència per als metabòlits del DEHP**

A partir de les concentracions trobades en mostres d'esportistes es van calcular els límits de referència (LR) per al MEHHP, el MEOHP, el 5cx-MEPP i el 2cx-MMHP (taula 6.2). Aquestes concentracions de tall es van calcular amb un risc d'1 entre 1000 d'originar un resultat fals positiu (99.9% LR). Els LR es van establir a partir de les dades transformades en logaritme de les concentracions ajustades per gravetat específica dels diferents metabòlits del DEHP en les mostres dels esportistes (n=464). No es va poder proposar LR per al MEHP ja que la distribució de les seves dades no esdevenia Gaussiana fins i tot després d'aplicar una transformació logarítmica (Solberg, 1995).



**Taula 6.2.** Límits de referència (99.9% LR) proposats pels diferents metabòlits del DEHP en ng/ml.

Metabòlit	ng/ml
<b>MEHHP</b>	338.4
<b>MEOHP</b>	158.5
<b>5cx-MEPP</b>	331.1
<b>2cx-MMHP</b>	229.1

Els LR proposats poden ser aplicats en les anàlisis d'orina de metabòlits del DEHP per distingir una exposició normal d'una exposició elevada que podria ser sospitosa d'un procediment de transfusió. El rang dels LR va ser de 158.5 a 338.8 ng/ml per un risc d'1:1000.

El LR proposat per al MEOHP està d'acord amb el descrit per Solymos i col·laboradors (Solymos et al, 2011a), però el 99.9% LR proposat per al MEHHP en l'estudi previ (193.0 ng/ml) és menor que el valor obtingut amb les nostres dades. Aquesta diferència pot ser deguda a l'origen diferent de les mostres analitzades per ambdós grups.

Els LR es van avaluar utilitzant les concentracions detectades en l'experiment de transfusió autòloga de sang en 25 voluntaris presentat en els capítols 5.1 i 5.2. Les concentracions de MEOHP el dia de la reinfusió van ser més elevades que el 99.9% LR per tots els subjectes de l'estudi; per al MEHHP i el 5cx-MEPP, el 92% i el 88% de les mostres, respectivament, tenien concentracions més elevades que el 99.9% LR proposat; per al 2cx-MMHP el 32% dels subjectes tenien concentracions més elevades que el 99.9% LR. Un dia després de la transfusió les concentracions de tots els metabòlits per tots els voluntaris eren menors que el LR proposat, excepte per al 2cx-MMHP en el que el 12% de les mostres superaven el LR.

Per tant, el MEHHP, el MEOHP i el 5cx-MEPP podrien ser usats com a marcadors de l'ús de transfusions de sang durant les primeres 24 hores després de la transfusió, mentres que el 2cx-MMHP podria ser utilitzat per sospitar més enllà de les 24 hores. Dins del camp del control antidopatge es coneix que la majoria dels atletes que utilitzen transfusions sang ho fan molt poc temps abans de la competició i per això, la finestra de detecció que proporcionen els metabòlits del DEHP és adequada per a la sospita d'aquest tipus de dopatge sanguini.

Els LR proposats per al MEHHP i el MEOHP també es van comparar amb les concentracions d'aquests metabòlits publicades a la literatura i obtingudes en mostres de pacients hospitalitzats subjectes a transfusions de sang (veure capítol 4; Solymos et al, 2011a). Els LR proposats són adients per detectar transfusions de sang en la majoria de les mostres recollides durant les primeres 24 hores després de la transfusió (veure capítol 4; Solymos et al, 2011a) i també en algunes mostres recollides entre les 24 i 48 hores després de la transfusió (veure capítol 4).

L'elevació puntual de les concentracions dels metabòlits de DEHP en orina deguda a una causa incontrolada no es pot descartar. Per aquesta raó, les concentracions de tall proposades es van comparar amb les concentracions obtingudes en estudis longitudinals en població alemana al llarg de diferents dies, reflectint la variabilitat intraindividual a l'exposició del DEHP (Solymos et al, 2011b). Les concentracions màximes detectades pel MEHHP i el MEOHP al llarg d'una setmana d'estudi no eren superiors als LR proposats en el nostre estudi (Solymos et al, 2011b). Contràriament, Preau i col·laboradors van descriure màxims de concentració superiors a 338 ng/ml per alguns voluntaris en un estudi amb una cohort americana (Preau et al, 2010). Les diferències entre els dos estudis poden reflectir el diferent estil de vida de les dues cohorts. Així doncs, són encara necessaris més estudis que

clarifiquin els orígens dels increments d'exposició a DEHP observats en alguns individus no subjectes a transfusions de sang.

### **6.3.3 Metabòlits del DEHP com a marcadors de l'ús de transfusions; avantatges i inconvenients**

La mesura dels metabòlits del DEHP permet el cribatge de l'ús de transfusions de sang en totes les mostres d'orina sotmeses a controls antidopatge. A més, pot ser útil tant per detectar les transfusions de sang homòlogues com les autòlogues; per aquestes últimes no es disposa encara de cap tècnica per a la seva detecció (Morkeberg et al, 2012). Si es compara amb altres tests per a la detecció de dopatge sanguini (per exemple, citometria de flux) aquest enfoc utilitza mostres d'orina, disponibles en la major part de controls antidopatge, en lloc de les mostres de sang, que només es recullen per a un nombre limitat d'esportistes. A més, aquesta metodologia és més ràpida, barata i més fàcil d'aplicar perquè emprà la cromatografia de líquids d'ultra precisió acoblada a espectrometria de masses en tàndem, tècnica actualment disponible en tots els laboratoris antidopatge.

No obstant, no es poden excloure altres fonts puntuals d'exposició elevada a DEHP, com per exemple les procedents de l'entorn ocupacional o la dieta (Fromme et al, 2007; Preau et al, 2010). En aquest sentit, són encara necessaris estudis longitudinals per tal d'identificar les possibles causes d'aquests augments inesperats. Els nivells basals d'aquests metabòlits podrien incorporar-se en el passaport biològic de l'esportista per tal de monitoritzar possibles canvis sobtats en les concentracions en orina que permetrien sospitar de l'ús d'una transfusió.

El PVC amb el DEHP com a plastificant és el material emprat per l'emmagatzematge de productes sanguinis. El fet que es comencin a analitzar els metabòlits de DEHP en els laboratoris pot portar a la cerca d'altres materials alternatius per preservar la sang. Fina ara, no hi ha cap alternativa que ofereixi les mateixes qualitats que els materials amb DEHP a l'hora de conservar els productes sanguinis en bones condicions. S'han estudiat altres plastificants i polímers per a les bosses de sang, però els temps d'emmagatzematge d'eritròcits obtinguts són menors, així que el DEHP no sembla tenir un substitut imminent (Simmchen et al, 2012).

## **6.4 Conclusions**

Les concentracions de metabòlits de DEHP en subjectes exposats al DEHP de manera normal (grup control) i en esportistes van ser baixes per tots els metabòlits. Les concentracions basals obtingudes en el grup d'esportistes es van usar per establir límits de referència per quatre metabòlits del DEHP.

El mètode proposat és adequat com a mètode de cribatge per ser aplicat a totes les mostres d'orina rebudes en els laboratoris de control antidopatge per sospitar de l'abús de transfusions sanguínies a l'esport.

## 6.5 Referències bibliogràfiques

- Barr, D. B.,** Silva, M. J., Kato, K., Reidy, J. A., Malek, N. A., Hurtz, D., Sadowski, M., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2003) Assessing human exposure to phthalates using monoesters and their oxidized metabolites as biomarkers. *Environ Health Perspect.*, 111, 1148-1151.
- Colacino, J. A.,** Robert, H., Schecter, A. (2010) Dietary Intake Is Associated with Phthalate Body Burden in a Nationally Representative Sample. *Environ Health Perspect.*, 118(7), 998–1003.
- Frederiksen, H.,** Jorgensen, N., Andersson, A. M. (2010) Correlations between phthalate metabolites in urine, serum, and seminal plasma from young Danish men determined by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Anal.Toxicol.*, 34, 400-410.
- Frederiksen, H.,** Aksglaede, L., Sorensen, K., Skakkebaek, N. E., Juul, A., Andersson, A. M. (2011) Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: estimation of daily phthalate intake. *Environ Res.* 111, 656-663.
- Fromme, H.,** Bolte, G., Koch, H. M., Angerer, J., Boehmer, S., Drexler, H., Mayer, R., Liebl, B. (2007) Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int J Hyg Environ Health.*, 210, 21-33.
- Göen, T.,** Dobler, L., Koschorreck, J., Muller, J., Wiesmuller, G. A., Drexler, H., Kolossa-Gehring, M. (2011) Trends of the internal phthalate exposure of young adults in Germany-Follow-up of a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg. Environ Health.*, 215, 36-45.
- Guo, Y., Wu, Q.,** Kannan, K. (2011) Phthalate metabolites in urine from China, and implications for human exposures. *Environment International.*, 37, 893–898.
- Morkeberg, J.** (2012) Detection of Autologous Blood Transfusions in Athletes: A Historical Perspective. *Transfusion Medicine Reviews.*, 26, 199-208.
- Preau, J. L.,** Wong, L. Y., Silva, M. J., Needham, L. L., Calafat, A. M. (2010) Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ Health Perspect.*, 118, 1748-1754.

- Preuss, R.,** Koch, H. M., Angerer, J. (2005) Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.*, 816, 269-280.
- Simmchen, J.,** Ventura, R., Segura, J. (2012) Progress in the removal of di-[2-ethylhexyl]-phthalate (DEHP) as the plasticizer in blood bags. *Transf Med Rev.*, 26, 27-37.
- Solberg, H.E.** (1995) RefVal: a program implementing the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry on the statistical treatment of reference values. *Comput Methods Programs Biomed.*, 48(3), 247-256.
- Solyms, E.,** Guddat, S., Geyer, H., Flenker, U., Thomas, A., Segura, J., Ventura, R., Platen, P., Schulte-Mattler, M., Thevis, M., Schanzer, W. (2011a) Rapid determination of urinary di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry as a marker for blood transfusion in sports drug testing. *Anal.Bioanal.Chem.*, 401, 517-528.
- Solyms, E.,** Guddat, S., Geyer, H., Thomas, A., Thevis, M., Schänzer, W. (2011b) Di(2-ethylhexyl)phthalate metabolites as markers for blood transfusion in doping control: Intra-individual variability of urinary concentrations. *Drug Test Analysis*, 3, 892–895.
- WADA** (2004) Technical Document TD2004EAAS. Version 1.0.  
[http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end\\_steroids\\_aug\\_04.pdf](http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/end_steroids_aug_04.pdf)
- Wittassek, M.,** Wiesmuller, G. A., Koch, H. M., Eckard, R., Dobler, L., Muller, J., Angerer, J., Schluter, C. (2007) Internal phthalate exposure over the last two decades--a retrospective human biomonitoring study. *Int J Hyg. Environ Health.*, 210, 319-333.

## **CAPÍTOL 7**

---

## **CONCLUSIONS**





## CONCLUSIONS

### Metodologia analítica:

1. Es va desenvolupar un mètode per a la quantificació de cinc metabòlits de DEHP en orina humana que consisteix en una hidròlisi enzimàtica de la mostra, una extracció líquid-líquid i anàlisi per UPLC-EM/EM. Els metabòlits estudiats van ser: mono-(2-etilhexil) ftalat (MEHP), mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalat (MEHHP), mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalat (MEOHP), mono-(2-carboximetilhexil) ftalat (2cx-MMHP) i mono-(2-etil-5-carboxipentil) ftalat (5cx-MEPP).
2. El mètode es va validar d'acord amb els estàndards de qualitat ISO 17025 vigents. Els rendiments d'extracció van ser superiors al 90% per a tots els analits, els límits de quantificació van estar compresos entre 1.2 i 2.6 ng/ml i els valors de precisió intraassaig i inter van ser millors al 12%. Va ser necessari usar els compostos marcats isotòpicament com a patrons interns per controlar l'efecte matriu en la quantificació d'alguns dels metabòlits.

### Concentració de metabòlits del DEHP en pacients hospitalitzats:

3. Les concentracions de MEHP, MEHHP i MEOHP en orina de pacients hospitalitzats que havien estat sotmesos a transfusions de sang (n=25) van ser significativament més elevades que les del grup control (n=30), especialment dins les 24 hores següents a la transfusió. També es van observar diferències significatives entre les concentracions dels metabòlits en pacients transfosos i els pacients hospitalitzats que no havien rebut transfusions (n=39).

4. No es van trobar diferències estadísticament significatives entre les concentracions de MEHP, MEHHP i MEOHP en pacients sotmesos a tractaments mèdics que van implicar l'ús de materials plàstics, però no de transfusions, i el grup control.

**Concentració de metabòlits del DEHP en voluntaris sans després de rebre una transfusió autòloga d'eritròcits:**

5. Les concentracions dels cinc metabòlits de DEHP durant les 24 i 48h després de la transfusió van ser significativament superiors a les dels nivells basals per a tots els voluntaris sotmesos a un experiment de transfusió autòloga després de l'emmagatzematge dels eritròcits durant 14 dies (grup 1, n=12) o 28 dies (grup 2, n=13). Per al 2cx-MMHP, les concentracions dos dies després de la transfusió continuaven sent elevades i diferents d'una situació basal.
6. Les concentracions dels metabòlits del DEHP en orina van ser més altes quan més llarg va ser el temps d'emmagatzematge de la sang abans de la reinfusió (14 dies vs 28 dies), encara que les diferències trobades no van ser estadísticament significatives.
7. En relació a la variabilitat en les concentracions basals dels metabòlits de DEHP al llarg de diferents dies per als diferents voluntaris, el promig de coeficients de variació obtingut per a 25 voluntaris es va situar entre el 43.5 % i el 64.0% per a tots els metabòlits.

**Concentració de metabòlits del DEHP en un grup control i en esportistes:**

8. Les concentracions dels cinc metabòlits de DEHP en mostres d'orina de població general (grup control, n=30) i en orina d'esportistes (n=464) van ser baixes per a tots els metabòlits en ambdós grups, indicant un grau d'exposició compatible amb el descrit a la literatura per a població general.
9. Els límits de referència (99.9%) calculats a partir de les concentracions obtingudes en esportistes van ser: 338.4 ng/ml MEHHP, 158.5 ng/ml MEOHP, 331.1 ng/ml 5cx-MEPP i 229.1 ng/ml 2cx-MMHP. Aquests límits de referència permetrien diferenciar una exposició normal a DEHP d'una exposició anormalment elevada, que podria ser deguda a una transfusió de sang i donarien una finestra de detecció de 24 a 48h després de la transfusió, en funció del metabòlit.

**Conclusions generals:**

10. La mesura dels metabòlits de DEHP en orina és una bona eina per sospitar de l'ús de transfusions, tant autòlogues com homòlogues en l'esport, que podria ser aplicada com a tècnica de cribatge en totes les mostres d'orina que reben els laboratoris de control antidopatge.
11. La variabilitat intraindividual deguda a l'existència d'algunes fonts d'exposició a DEHP, diferents a les transfusions, fa necessària la realització d'estudis longitudinals addicionals que aportin informació sobre aquestes fonts d'exposició.
12. La metodologia proposada permet la possibilitat de detectar per primera vegada el dopatge sanguini mitjançant l'ús de transfusions

autòlogues ja que, fins al moment, els laboratoris de control antidopatge no disposen de cap mètode per a la detecció d'aquest tipus de transfusions.

## **ANNEXES**

---



## Annex I

Monfort, N., Ventura, R., Balcells, G., Segura, J. (2012) Determination of five di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in urine by UPLC-MS/MS, markers of blood transfusion misuse in sports. *Journal of Chromatography B*, (accepted for publication). DOI: 10.1016/j.jchromb.2012.09.030.

Monfort, N., Ventura, R., Latorre, A., Belalcazar, V., López, M., Segura, J. (2009) [Phthalate exposure: new clue to suspect illicit blood transfusion](#). *Recent Advances in Doping Analysis (17)*. Proceedings of the 27th Cologne Workshop. 147-154.

Segura, J., Monfort, N., Ventura, R. (2012) Detection methods for autologous blood doping. *Drug testing and analysis*. DOI: 10.1002/dta.405.







Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chromb](http://www.elsevier.com/locate/chromb)

## Determination of five di-(2-ethylhexyl)phthalate metabolites in urine by UPLC-MS/MS, markers of blood transfusion misuse in sports

Núria Monfort<sup>a,b</sup>, Rosa Ventura<sup>a,b</sup>, Georgina Balcells<sup>a</sup>, Jordi Segura<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Grup de Recerca en Bioanàlisi i Serveis Anàlitzics, Programa de Recerca en Neurociències, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Barcelona, Spain  
<sup>b</sup> Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, UPF, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 19 July 2012  
 Accepted 16 September 2012  
 Available online xxx

#### Key words:

Blood doping  
 Transfusion  
 Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)  
 Plasticizers  
 Ultra-performance liquid chromatography  
 coupled to tandem mass spectrometry  
 (UPLC-MS/MS)  
 Doping control

### ABSTRACT

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is the most commonly used plasticizer for polyvinyl chloride, which is found in a large variety of products, including most of the bags used for blood storage because of its protective role on erythrocytes survival. DEHP metabolites have been recently proposed as markers of the misuse of blood transfusion in athletes. In this study, a method to quantify the main five DEHP metabolites in urine has been developed: mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate (MEHHP), mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate (MEOHP), mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate (5cx-MEPP), and mono-(2-carboxymethylhexyl)phthalate (2cx-MMHP). The method involved an enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* followed by an acidic extraction with ethyl acetate. The hydrolysed extracts were analysed by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Isotope labelled MEHP, MEOHP and 5cx-MEPP were used as internal standards. Analysis of all the metabolites was achieved in a total run time of 10 min, using a C<sub>18</sub> column and a mobile phase containing deionized water and acetonitrile with formic acid, with gradient elution at a flow-rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup>. Detection of the compounds was performed by multiple reaction monitoring, using electrospray ionization in positive and negative ion modes. The method was validated for quantitative purposes. Extraction recoveries were greater than 90% and the limits of quantitation ranged from 1.2 to 2.6 ng mL<sup>-1</sup>. Intra-day precisions were better than 8% for all metabolites while inter-assay precisions were better than 12%. Concentrations of DEHP metabolites were measured in a control group (n = 30, subjects reflecting the common environmental DEHP exposure), and in sportsmen (n = 464), to evaluate population distribution exposure to DEHP. Additionally, threshold concentrations indicating outliers of common exposure for DEHP metabolites are proposed.

© 2012 Published by Elsevier B.V.

### 1. Introduction

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) is one of the most widely used plasticizers in polyvinyl chloride products to increase flexibility. Thus, DEHP is used in numerous household products, floor tiles, furniture upholstery, and medical devices, among other products [1,2]. Especially relevant is its presence in bags for blood storage based on its properties to maintain erythrocytes stability [3,4]. Plasticizers are not chemically bound to the polymer and they leach, migrate or gas out into the atmosphere, into foodstuff or directly into the body fluids, exposing the environment and people. General population is ubiquitously exposed to DEHP [5–7]. Exposure to high concentrations of DEHP may produce a wide range of adverse effects. DEHP is a known reproductive and developmental toxicant

and the possible effects of phthalates on the reproductive systems in children are well documented [8,9]. Furthermore, DEHP is also a suspected human endocrine disruptor/modulator [10]. However, direct links between the effects observed in animals and a decline in human reproductive health have not yet been established [11].

The metabolic pattern of DEHP is complex and several metabolites have been identified and characterized. Metabolism of DEHP involves very rapid hydrolysis to mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) catalysed by unspecific lipases and formation of a glucuronide conjugate. Additionally, MEHP can undergo oxidations in the side chain to form several metabolites [12,13]. Nowadays, more than 15 metabolites of DEHP have been identified in human urine [14]. Oxidized metabolites mono-(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate (MEHHP) and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate (MEOHP) along with two other recently identified, mono-(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate (5cx-MEPP) and mono-(2-carboxymethylhexyl)phthalate (2cx-MMHP), are the major urinary DEHP metabolites in adult humans, excreted as conjugates with glucuronic acid [15,16]. A simplified metabolic pathway of DEHP is illustrated in Fig. 1.

\* Corresponding author at: Grup de Recerca en Bioanàlisi i Serveis Anàlitzics, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques, Dr. Aiguader, 88, 08003 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 3160470; fax: +34 93 3160499.  
 E-mail address: [jsegura@imim.es](mailto:jsegura@imim.es) (J. Segura).

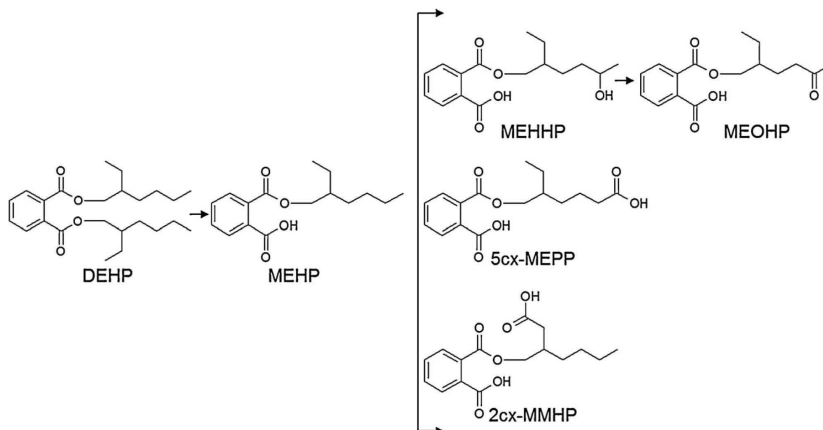


Fig. 1. Simplified metabolic pathway of DEHP: MEHP, mono(2-ethylhexyl)phthalate; MEHHP, mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate; MEOHP, mono(2-ethyl-5-oxohexyl)phthalate; 5cx-MEPP, mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate; 2cx-MMHP, mono(2-carboxymethylhexyl)phthalate.

Secondary metabolites as well as the primary metabolite MEHP have been used as markers to predict exposure to DEHP [17–19]. It is known that adults and neonates who undergo a variety of serious medical procedures involving plastic materials experience much higher exposures to DEHP [20]. Workers from industries where materials containing DEHP are used have also high concentrations of DEHP metabolites in urine [21]. This has led to the development of analytical methods to detect DEHP metabolites in recent years addressed to the evaluation of exposure [22–26].

One of the processes leading to high and acute exposure to DEHP is blood transfusion. The use of blood transfusion is prohibited in sports by the World Anti-Doping Agency. Homologous blood transfusion (donor and receptor are different subjects) can be detected by the analysis of blood samples by flow cytometry through the identification of double populations of erythrocytes having different specific surface antigens [27,28]. However, autologous transfusion (donor and receptors are the same subject) invalidates the possibility of using the same analytical approach because all red blood cells bear the same surface antigens. Instead, DEHP is released from blood bags [29] and urinary concentrations of DEHP metabolites have demonstrated to be higher in patients subjected to homologous blood transfusion and in moderately trained volunteers who were subjected to a protocol of autologous blood transfusion [30–32]. So, the detection of high concentrations of DEHP metabolites in urine has been proposed as a marker of the misuse of both homologous and autologous blood transfusions in sports [33]. The ubiquitous exposure to DEHP of the general population makes the definition of commonly exposed population concentrations necessary. In recent works, common concentrations of some of the metabolites have been described [30,34–36].

In this study, a method to detect five DEHP metabolites in urine (MEHP, MEOHP, MEHHP, 5cx-MEPP and 2cx-MMHP) has been optimized and validated. Compared to previous studies [30–32,34–36], the methodology proposed allows the quantification of two additional DEHP metabolites (5cx-MEPP and 2cx-MMHP). The developed method has been used to investigate the concentrations of these five metabolites in general population and in samples

from different sportive subjects in order to define basal population ranges of the metabolites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Standards of MEHP, MEHHP, MEOHP, 5cx-MEPP, 2cx-MMHP and their  $^{13}\text{C}_4$  labelled (ring-1,2  $^{13}\text{C}_2$  and dicarboxyl  $^{13}\text{C}_2$ ) analogues,  $^{13}\text{C}_4$ -MEHP,  $^{13}\text{C}_4$ -MEOHP,  $^{13}\text{C}_4$ -5cx-MEPP,  $^{13}\text{C}_4$ -2cx-MMHP, which were used as internal standards (ISTD), were obtained from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (Andover, MA, USA). Ethyl acetate (HPLC grade), acetonitrile (LC gradient grade), formic acid (LC/MS grade) and other reagents (analytical grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Milli-Q water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore Ibérica; Barcelona, Spain).  $\beta$ -Glucuronidase (*Escherichia coli*) was purchased from Roche Biomedical (Mannheim, Germany).

### 2.2. Standards and solutions

Stock standard solutions of DEHP metabolites and isotopically labelled ISTDs of  $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$  were prepared in acetonitrile. Working standard solutions of 10 and  $1\ \mu\text{g mL}^{-1}$  were prepared by appropriate dilutions with acetonitrile of the stock solutions. All solutions were stored at  $-20\ ^\circ\text{C}$ .

### 2.3. Sample preparation

Aliquots of urine samples (1 mL) were added with a concentration of  $50\ \text{ng mL}^{-1}$  of each ISTD ( $^{13}\text{C}_4$ -MEHP,  $^{13}\text{C}_4$ -MEOHP and  $^{13}\text{C}_4$ -5cx-MEPP). The pH was adjusted to 6.5 with ammonium acetate buffer (250  $\mu\text{L}$ ) and, then, 30  $\mu\text{L}$  of  $\beta$ -glucuronidase from *E. coli* were added. Samples were incubated at  $55\ ^\circ\text{C}$  for 60 min. After enzymatic hydrolysis, samples were acidified with phosphate buffer pH 2 (2 mL). The extraction was performed with 8 mL of ethyl acetate by shaking at 40 rpm for 20 min. After centrifugation

G Model

CHROMB 181091-9

## ARTICLE IN PRESS

N. Monfort et al. / J. Chromatogr. B xxx (2012) xxx–xxx

3

(3500 rpm, 5 min), organic layers were evaporated to dryness under nitrogen stream in a water bath at 40 °C. The extracts were reconstituted with 200  $\mu$ L of a mixture of deionized water:acetonitrile (80:20 v/v, 0.01% formic acid) and aliquots of 5  $\mu$ L were analysed by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

#### 2.4. Instrumental analysis

Chromatographic separations were carried out on a Waters Acquity UPLC<sup>TM</sup> system using an Acquity BEH C<sub>18</sub> column (100 mm  $\times$  2.1 mm i.d., 1.7  $\mu$ m particle size) (Waters Corporation, Milford, MA). The column temperature was set to 45 °C. The mobile phase consisted of deionized water with 0.01% formic acid (solvent A) and acetonitrile with 0.01% formic acid (solvent B). Separation was performed at a flow-rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup> with the following gradient elution: from 0 to 3 min, 20%B; linear increase to 50%B in 2 min; linear increase to 95%B in 1 min; 95%B during 2 min, decrease to 20%B in 0.2 min; and stabilization at initial conditions for 1.3 min. The total run time was 9.5 min. The sample volume injected was 5  $\mu$ L.

The UPLC instrument was coupled to a Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters Corp.) with an electrospray (Z-spray) ionization source working in positive and negative ionization mode. Source conditions were set as follows: capillary voltage, 3 and 2.5 kV for positive and negative ionization mode, respectively; source temperature, 120 °C; desolvation temperature, 450 °C; cone gas flow-rate, 50 L h<sup>-1</sup> and desolvation gas flow-rate, 1200 L h<sup>-1</sup>. High-purity nitrogen was used as desolvation gas and argon was used as collision gas. Electrospray ionization (ESI) working parameters (ionization mode, precursor and product ions, cone voltage and collision energies) were optimized for each compound using direct infusion of individual standard solutions of the compounds (10  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) at 10  $\mu$ L min<sup>-1</sup> with mobile phase (50:50, A:B) with a flow rate at 20  $\mu$ L min<sup>-1</sup>. Cone voltage was optimized to obtain the maximum signal of the precursor ion and the collision energy was adjusted to maximize the signal of the most abundant product ion for each compound. Detection and quantitation was performed in multiple reaction monitoring mode (MRM). MRM conditions are described in Table 1. Two specific transitions were monitored for each analyte. Data acquisition was performed in two acquisition groups with dwell times of 50 ms, interchannel delays of 5 ms and interscan times of 20 ms. All data were acquired and processed using MassLynx 4.1 software (Waters Corporation, Milford, MA).

#### 2.5. Method validation

The following parameters were evaluated: linearity, limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), extraction recovery, matrix effect and intra- and inter-assay precisions.

Due to the ubiquitous presence of DEHP metabolites in urines from human population, the linearity of the method and the LOD and LOQ were evaluated using a calibration curve prepared in artificial urine. For the rest of the validation assays, calibration curves were prepared by using urines from healthy subjects with very low levels of DEHP metabolites diluted with water.

The artificial urine was prepared based on a protocol described elsewhere [37]: 0.1 g of lactic acid, 0.4 g of citric acid, 2.1 g of sodium bicarbonate, 10 g of urea, 0.07 g of uric acid, 0.8 g of creatinine, 0.37 g of calcium chloride-2H<sub>2</sub>O, 5.2 g of sodium chloride, 0.0012 g of iron II sulphate-7H<sub>2</sub>O, 0.49 g of magnesium sulphate-7H<sub>2</sub>O, 3.2 g of sodium sulphate-10H<sub>2</sub>O, 0.95 g of potassium dihydrogen phosphate, 1.2 g of di-potassium hydrogen phosphate and 1.3 g of ammonium chloride were dissolved in 1 L ultrapure water.

Six calibration levels were studied: 0, 5, 10, 50, 100 and 400 ng mL<sup>-1</sup>. For the first validation assay, each calibration level was prepared in quadruplicate. The peak area ratios of the selected transitions of the analyte and the ISTD were plotted against concentrations. The ISTD used were: MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> for the quantification of MEHP; MEOHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> for the quantification of MEHHP and MEOHP; and 5cx-MEPP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub> for the quantification of 5cx-MEPP and 2cx-MMHP. The Dixon test ( $\alpha=5\%$ ) was applied to detect outliers in the replicates of the area ratios at each concentration level. The behaviour of the variance over the calibration range (homo/heteroscedasticity) was evaluated by applying the Levene Test ( $\alpha=5\%$ ). To demonstrate the goodness of fit using the linear model, the *F* test ( $\alpha=5\%$ ) was applied to compare the variance attributable to lack of fit with that due to random error. Least-square regression analysis weighted by the concentration was applied to calculate the calibration curves and the coefficients of determination. The LOD and LOQ were defined as 3.3 and 10 times the value of the standard deviation of the noise, respectively. The standard deviation of the estimated concentration values of a sample spiked with 1 ng mL<sup>-1</sup> for each analyte ( $n=4$ ) was used as a measure of the noise.

The extraction recovery was calculated by the analysis of three replicates of a blank urine spiked with 50 ng mL<sup>-1</sup> of the compounds and three replicates of a blank sample spiked with the same concentration of analytes after the extraction procedure. The ratio of the peak areas between the analytes and the corresponding ISTD obtained from the extracted spiked samples was compared with ratios obtained for samples in which the analytes were added after the extraction procedure (representing 100% of extraction recovery).

Due to the impossibility to obtain true blank urine samples, the matrix effect was evaluated by standard additions. The concentrations levels of the analytes in 7 urine samples were calculated by both external calibration and standard addition calibration. For external calibration, a calibration curve was prepared in artificial urine. Five calibration levels were prepared in duplicate at the following levels: 0, 5, 10, 50, and 100 ng mL<sup>-1</sup>. External calibration concentrations were calculated for each sample. Standard additions were carried out in every sample by addition of four concentration levels in duplicate (0, 5, 10, and 50 ng mL<sup>-1</sup>). The matrix effect was calculated for each analyte as the ratio between the external calibration concentration and standard addition concentration.

The intra- and inter-assay precisions were estimated by using two quality control samples with low and high concentrations of DEHP metabolites. These quality control samples were actual samples obtained from subjects moderately exposed to DEHP (low control, concentrations around a range of 14–45 ng mL<sup>-1</sup> for the different metabolites) and from patients subjected to blood transfusion highly exposed to DEHP (high control, concentrations range around 54–278 ng mL<sup>-1</sup>). Intra-assay precision was calculated by the analysis of three replicates of the two control samples on the same day. Inter-assay precision was calculated after analysis of these two samples in eleven different days. Precisions were expressed as the relative standard deviation (RSD) of the concentrations measured.

#### 2.6. Subjects

In order to evaluate basal concentrations of DEHP metabolites, urines from two different populations groups were quantified. The first group (control group) included 30 healthy subjects reflecting common environmental DEHP exposure. They were volunteers that did not receive any blood transfusion or any medical procedure involving plastic equipment. The volunteers were selected by the IMIM-Hospital de Mar Clinical Research Unit according to a clinical protocol approved by the ethical committee CEIC-IMAS

GModel

CHROMB181091-9

## ARTICLE IN PRESS

N. Monfort et al. / J. Chromatogr. B xxx (2012) xxx-xxx

**Table 1**  
Monitoring conditions in the UPLC<sub>A</sub>-MS/MS system for DEHP metabolites. Transitions used for quantitation are underlined.

Compound	MM <sub>A</sub>	RT <sup>b</sup> (min)	ESI mode <sup>c</sup>	CV <sub>A</sub> (V)	CE <sup>e</sup> (eV)	Ion transitions (m/z)
MEHP	278.15	6.11	pos	15	15, 5	<u>279</u> > <u>149</u> , 279 > 167
MEOHP	292.13	5.01	pos	10	10	<u>293</u> > <u>127</u>
			neg	30	15	291 > 143
MEHHP	294.15	4.94	pos	12	7, 7	<u>295</u> > <u>167</u> , 295 > 129
5cx-MEPP	308.13	4.83	pos	10	5, 5	<u>309</u> > <u>143</u> , 309 > 161
2cx-MMHP	308.13	5.09	pos	10	5, 5	<u>309</u> > <u>143</u> , 309 > 161
MEHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	282.15	6.11	pos	15	10, 10	<u>283</u> > <u>153</u> , 283 > 171
MEOHP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	296.13	5.01	pos	10	5, 10	<u>297</u> > <u>127</u> , 297 > 109
5cx-MEPP- <sup>13</sup> C <sub>4</sub>	312.13	4.83	pos	10	5, 5	<u>313</u> > <u>143</u> , 313 > 161

<sup>a</sup> MM, monoisotopic mass.

<sup>b</sup> RT, retention time.

<sup>c</sup> ESI, electrospray ionization: pos, positive; neg, negative.

<sup>d</sup> CV, cone voltage.

<sup>e</sup> CE, collision energy.

(IMIM-Hospital del Mar, Barcelona, Spain, protocol 2006/2456/1). The average age was 23.67 ± 2.34 years (range: 21–31 years), and the gender distribution was 50% females and 50% of males. 24 h urine samples were collected and stored at -20 °C in polypropylene bottles until analysis.

In the second group (sportsmen group), a total of 464 official doping control urine samples covering different sports disciplines (mainly aquatics, athletics, cycling) were analysed. Spot urine samples were collected and stored at -20 °C in glass bottles until analysis.

Urine samples used as quality control samples were also obtained within the clinical protocol 2006/2456/1. The low quality control was a sample belonging to a volunteer of the "control group" described above. The high quality control was a urine sample collected from a hospitalized patient subjected to homologous blood transfusion [30].

### 2.7. Statistical analysis and calculations

All results of concentration were corrected by specific gravity, using the following formula:

Adjusted concentration

$$= \text{concentration} \left[ \frac{1.020 - 1}{\text{specific gravity of the sample} - 1} \right]$$

This mathematical correction by specific gravity is usually carried out in doping control analyses for some analytes [38]. Statistical analysis was performed on the logarithmic transformed concentrations with computer software SPSS 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). The program RefVal (RefVal 4.11, Oslo, Norway) was used for the determination of the upper reference limits (RL) and the detection of outliers. The 99.9% fractile of reference limits by parametric estimation was assessed [39]. Outlier detection occurred with Horn's algorithm. The outliers were removed from the statistics.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Method development and validation

Different sample preparation protocols and different detection conditions were studied to analyse DEHP metabolites in urine, as per the data previously published [22–26]. A sample preparation based on a liquid-liquid extraction at pH 2 was finally selected to quantify DEHP metabolites in urine. A hydrolysis step to cleave the glucuronide conjugates was needed. β-Glucuronidase from *E. coli*

was used; other preparations, such as β-glucuronidase from *Helix pomatia*, were not adequate due to its hydrolytic activity on phthalates to convert them to their monoesters [25]. The extraction was performed at pH 2 to obtain the protonated compounds. Thereafter, the samples were analysed by UPLC<sub>A</sub>-MS/MS.

Regarding the LC<sub>A</sub>-MS/MS optimization, mobile phases containing water, acetonitrile or methanol acidified with formic acid or acetic acid were studied. The mobile phases were evaluated taking into account chromatographic behaviour of the analytes and signal in ESI. Best results were obtained using a mobile phase with water and acetonitrile acidified with formic acid. The chromatographic separation was achieved with a total running time of 10 min, with all the compounds eluting between 4.8 and 6.1 min (Table 1).

ESI working parameters were optimized for each DEHP metabolite. Positive and negative ion modes were tested. In our conditions, positive ion mode was selected because higher signal was obtained. Protonated molecular ions [M+H]<sup>+</sup> were obtained for all the compounds formed by protonation of one of the carbonyl groups. No formation of adduct ions was observed. The cone voltage was optimized to maximize the signal of the protonated molecular ion and collision energy was adjusted to optimize the signal of the most abundant product ions. The optimal conditions for each metabolite are presented in Table 1. The product ion mass spectra of all metabolites and isotopically labelled internal standards at one of the optimal collision energies are presented in Fig. 2.

Pseudomolecular ions [M+H]<sup>+</sup> of DEHP metabolites showed a characteristic collision induced dissociation pattern. Ions resulting from the loss of water molecules were only observed at low collision energies (m/z 277 and 291, for MEHHP and 5cx MEPP, respectively). For all the compounds, except MEOHP and its isotopic labelled analogue, ions at m/z 167 (protonated phthalic acid) and at m/z 149 (protonated phthalic anhydride) were observed. The equivalent ions at m/z 171 and 153 were observed in the corresponding isotopic labelled analogues. Ions resulting from the protonated lateral chain were observed for all metabolites: m/z 113 for MEHP and MEHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, m/z 127 for MEOHP and MEOHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, m/z 129 for MEHHP, and at m/z 143 for 5cx MEPP, 2cx MMHP and 5cx MEPP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>. A subsequent loss of a water molecule was observed for most of them (ions at m/z 109 for MEOHP and MEOHP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, m/z 111 for MEHHP, and m/z 125 for 5cx MEPP, 2cx MMHP and 5cx MEPP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>). For compounds with an additional carboxylic acid function in the lateral chain (5cx MEPP, 2cx MMHP and 5cx MEPP-<sup>13</sup>C<sub>4</sub>), additional ions resulting from the protonation of this group and including the lateral chain were also observed at m/z 161. The ions selected for quantitative purposes are indicated in Table 1.

Examples of chromatograms of urine samples from subjects with low and high exposure to DEHP (low and high quality control

Please cite this article in press as: N. Monfort, et al., J. Chromatogr. B (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.030>

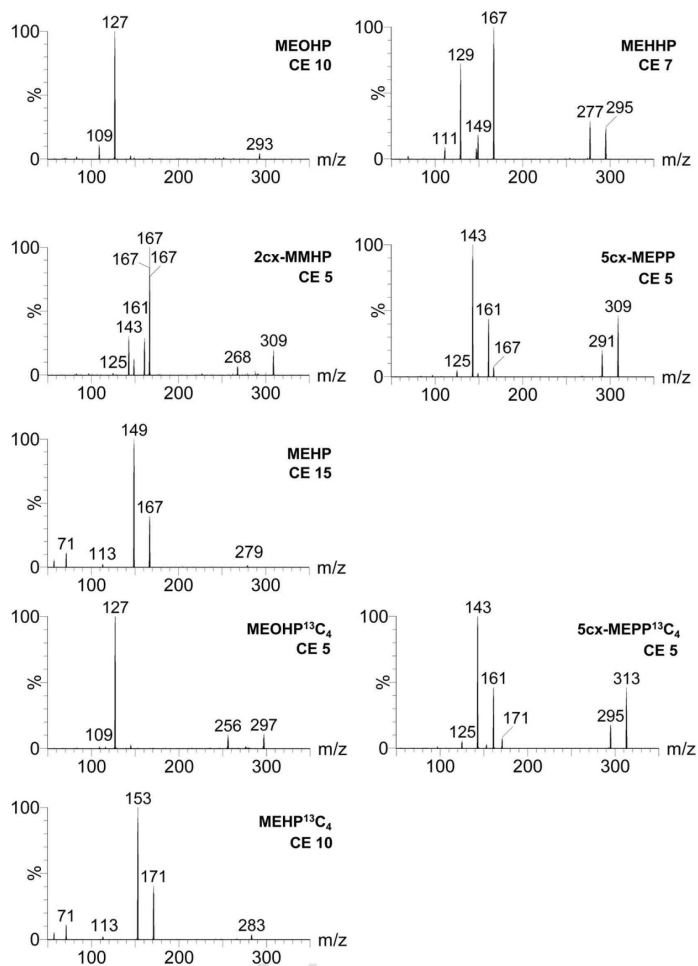


Fig. 2. Product ion mass spectra arising from the protonated molecular ions of MEHP ( $m/z$  279), MEOHP ( $m/z$  293), MEHHP ( $m/z$  295), 5cx-MEPP ( $m/z$  309), 2cx-MMHP ( $m/z$  309),  $\text{MEHP}^{13}\text{C}_4$  ( $m/z$  283),  $\text{MEOHP}^{13}\text{C}_4$  ( $m/z$  297) and  $\text{5cx-MEPP}^{13}\text{C}_4$  ( $m/z$  313) (CE, collision energy).

334 samples, respectively) are given in Fig. 3. As it can be observed,  
335 there is a great difference in intensities between both samples for  
336 all metabolites.

337 The method developed was linear in the range of concentrations  
338 studied. Coefficients of determination were always greater than  
339 0.99. The F test for comparing variances was not significant, indicat-  
340 ing adequate adjustment of the data to the proposed linear model  
341 over the calibration range. Extraction recoveries and LOQ are listed

342 in Table 2. Extraction recoveries greater than 90% were obtained  
343 for all metabolites, and LOQ ranged from 1.2 to 2.6  $\text{ng mL}^{-1}$ .

344 Regarding specificity of the method, no peaks at the retention  
345 time of the analytes and ISTDs were observed after analysis of arti-  
346 ficial urine samples indicating no contamination due to reagents.  
347 In actual urine samples, low basal levels of the analytes were  
348 detectable in most of the samples due to ubiquitous exposition to  
349 DEHP.

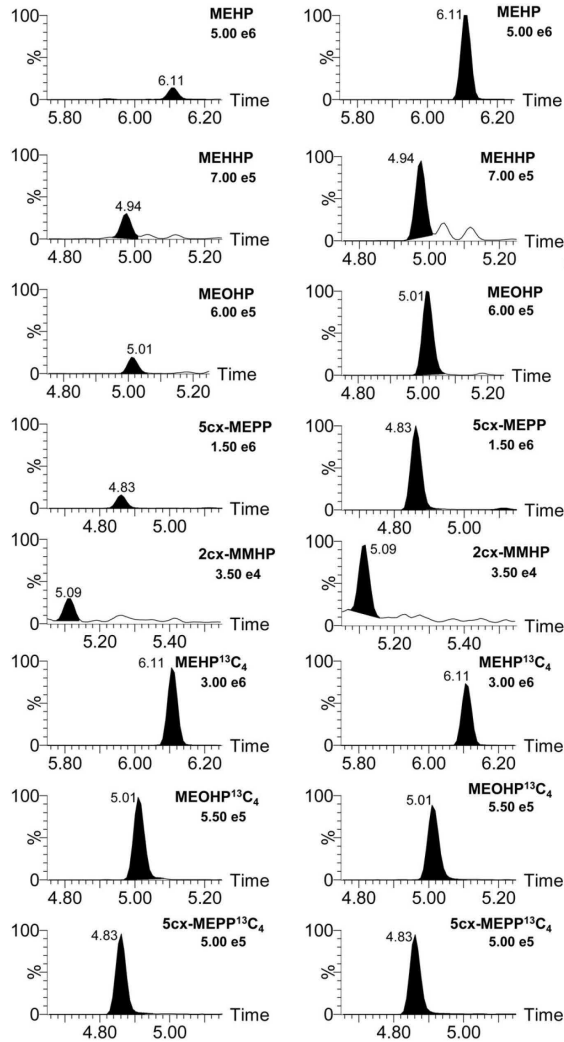


Fig. 3. Chromatograms of the selected transitions of DEHP metabolites and ISTDs. Left, low quality control sample; right, high quality control sample.

350 The intra- and inter-assay precisions obtained for the low and  
 351 high concentration quality control samples are shown in Table 3.  
 352 Intra-assay precision was always better than 8%, while inter-assay  
 353 precision was better than 12%. The data indicates that the method

provides adequate precision for the quantitation of the five DEHP  
 354 metabolites in urine samples.

355 The matrix effect was found to be not significant for MEHP, 5cx-  
 356 MEPP and 2cx-MMHP. For MEHHP and MEOHP, the ratios between  
 357

G Model

CHROMB181091-9

## ARTICLE IN PRESS

N. Monfort et al. / J. Chromatogr. B xxx (2012) xxx–xxx

7

Table 2

Validation data: Extraction recoveries (ER) calculated at 50 ng mL<sup>-1</sup> and limits of quantitation (LOQ) for the different DEHP metabolites.

Compound	ER (%), mean ± SD (ng mL <sup>-1</sup> )	LOQ (ng mL <sup>-1</sup> )
MEHP	97.1 ± 3.3	2.6
MEHHP	102.0 ± 1.1	1.9
MEOHP	94.8 ± 1.2	1.2
5cx-MEPP	93.8 ± 0.5	2.4
2cx-MMHP	90.2 ± 5.1	1.8

SD, standard deviation.

the concentrations calculated from the external calibration and the standard addition were 1.2 and 1.6, respectively, with a standard deviation for both of approximately 20% (n = 7 samples), showing a reproducible matrix enhancement effect especially for MEOHP. In order to correct the matrix effect isotopically labelled standards were used.

For MEHP, MEHHP and MEOHP, the developed methodology demonstrated sensitivity and reliability similar to previously described methods [34]. In addition, it offers the possibility of quantification of two additional DEHP metabolites (5cx-MEPP and 2cx-MMHP), which is important to have the largest number of potential markers.

### 3.2. Concentrations in urine samples from different population groups

The use of blood transfusions produces a huge increase in the concentration of all DEHP metabolites in urine [30–35]. However, as DEHP is ubiquitously present, all population is exposed to some extent. In order to have a criterion to suspect of an acute exposure to DEHP (e.g., blood transfusion), it is necessary to define the common

range of metabolites concentrations. In this regards, the quantitation of the DEHP metabolites in urine from different population groups was performed.

Taking into account the possible differences of the urine samples regarding dilution status or variations due to sampling, specific gravity of the samples was measured. Concentrations were corrected by specific gravity, as it is usually performed in doping control laboratories to minimize the variations of the different dilution status of the samples [38]. The results of the specific gravity adjusted concentrations for all five DEHP metabolites in samples from the control group are shown in Table 4. Concentrations corresponding to percentiles 10th, 25th, 50th, 75th, and 90th are presented. The levels observed in the control group for the five DEHP metabolites are similar to first studies published [16]. However, they are slightly higher than the concentrations published in the literature in recent years probably due to the 24-h urine samples analysed in our work [7,17,40,41].

Distribution of the concentrations of the DEHP metabolites in the sports related samples is also described in Table 4. The levels observed in the sportsmen group for MEHP, MEHHP, MEOHP, and 5cx-MEPP are in accordance with published data [7,34,40–42]. Regarding 2cx-MMHP, the median concentration agrees with that described by Guo et al. [43], however it is greater the reported by other groups [7,40]. As it was previously described, all the concentrations of the athletes' samples were lower than those of the control group [30], and it could be due to the difference in the sample collection (spot urine samples vs. 24h). Concentrations of phthalates in the first morning urine are known to be higher than those found in samples collected during the day [44]. For this reason, it may be expected that concentrations in spot urines collected during the day will be lower than those in 24 h urine samples.

Table 3

Validation data: results of intra- and inter-assay precision for the low and high quality control samples (LC and HC, respectively).

Compound	Conc.	Intra-assay precision (N = 3)		Inter-assay precision (N = 11)	
		Estimated Conc. (mean ± SD) (ng mL <sup>-1</sup> )	Precision (RSD%)	Estimated Conc. (mean ± SD) (ng mL <sup>-1</sup> )	Precision (RSD%)
MEHP	LC	14.9 ± 0.8	5.6	15.3 ± 1.1	6.9
	HC	131.2 ± 3.5	2.7	129.0 ± 2.7	2.1
MEHHP	LC	35.4 ± 1.6	4.6	36.0 ± 3.6	10.0
	HC	148.4 ± 1.3	0.9	137.8 ± 12.4	9.0
MEOHP	LC	29.2 ± 1.9	6.6	27.8 ± 1.3	4.5
	HC	159.0 ± 6.6	4.2	150.3 ± 4.4	2.9
5cx-MEPP	LC	44.9 ± 2.2	5.0	44.2 ± 1.8	4.0
	HC	277.5 ± 8.1	2.9	272.5 ± 6.4	2.4
2cx-MMHP	LC	18.4 ± 1.5	8.0	18.5 ± 2.2	12.0
	HC	57.0 ± 0.8	1.4	53.5 ± 5.3	9.8

Conc., concentration; SD, standard deviation; RSD, relative standard deviation.

Table 4

Distribution of concentrations of DEHP metabolites in the subjects of the control group and sportsmen, corrected for specific gravity.

Group	Compound	Concentration (ng mL <sup>-1</sup> )				
		Percentile				
		10th	25th	50th	75th	90th
Control (n = 30)	MEHP	5.1	8.1	16.0	22.7	26.4
	MEHHP	11.8	31.1	51.4	80.2	112.7
	MEOHP	9.1	20.2	38.2	65.1	111.7
	5cx-MEPP	17.4	33.2	55.0	109.2	143.1
	2cx-MMHP	10.7	22.5	34.0	60.5	169.0
	MEHP	2.5	3.5	5.5	9.4	15.3
Sportsmen (n = 464)	MEHHP	10.9	15.8	27.3	44.3	76.0
	MEOHP	5.1	8.5	13.6	22.0	39.8
	5cx-MEPP	12.3	18.8	28.4	46.7	81.8
	2cx-MMHP	8.4	12.8	21.1	33.8	66.2
	MEHP	2.5	3.5	5.5	9.4	15.3

Please cite this article in press as: N. Monfort, et al., J. Chromatogr. B (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.030>

GModel

CHROMB181091-9

8

## ARTICLE IN PRESS

N. Monfort et al. / J. Chromatogr. B xxx (2012) xxx–xxx

Table 5

Threshold concentrations (99.9% reference limit) for the different DEHP metabolites in ng mL<sup>-1</sup> corresponding to common exposure to DEHP among sportive subjects.

Metabolite	ng mL <sup>-1</sup>
MEHHP	338.8
MEOHP	158.5
5cx-MEPP	331.1
2cx-MMHP	229.1

## 3.3. Threshold determination of phthalate metabolites

Taking into account the concentrations found in the sports related samples, threshold concentrations at 1:1000 risk for false positives (99.9% reference limit) were calculated for MEOHP, MEHHP, 5cx MEPP and 2cx MMHP (Table 5). The log-transformed values of the specific gravity adjusted concentrations of the DEHP metabolites obtained in samples from sportsmen ( $n=464$ ) were used to establish the reference limit values. For MEHP, the distribution of concentrations was not Gaussian, even after logarithmic transformation of the data, and the reference limits could not, therefore, be calculated [39]. The reference limits can be used as threshold concentrations to determine whether a high result may be suspicious for a transfusion process. The reference limits range from 158.5 to 338.8 ng mL<sup>-1</sup> for a risk of 1:1000. The reference limit for MEOHP is in accordance with the value proposed by Solymos et al. [34]. However, for MEHHP the value proposed in the previous study (193.0 ng mL<sup>-1</sup>) is lower than the value obtained with our data. This difference can be probably due to the different origin of the samples analysed in both studies.

The reference limits were evaluated using the concentrations detected in an experiment of autologous blood transfusion in 25 subjects performed by our group [31]. Concentrations of MEOHP the day of the reinfusion were higher than the reference limit in all subjects; for MEHHP and 5cx-MEPP, 92% and 88% of the samples, respectively, showed concentrations greater than their reference limit; and for 2cx-MMHP, only 32% of the subjects had concentrations greater than its reference limits. One day after blood reinfusion all metabolites were below the reference limit proposed, except 2cx-MMHP where 12% of the samples exceeded the reference limit. Therefore, MEHHP, MEOHP, and 5cx-MEPP can be used as markers of blood transfusion misuse during the first hours after the transfusion, while 2cx-MMHP could also be used to suspect beyond 24 h in some subjects. Substantial anecdotal information indicates that most athletes use transfusion for doping purposes just short time before competition and, in this situation, the detection window provided by DEHP metabolites measurement will be appropriate to suspect for blood doping.

The reference limits proposed for MEHHP and MEOHP were also compared with concentrations of these metabolites published in the literature obtained in samples from hospitalized patients subjected to blood transfusion [30,34]. The reference limits were appropriate to detect blood transfusion in most of the reported samples collected during the first 24 h after the transfusion [30,34] and also in some samples collected during 24–48 h after transfusion [30].

The possibility of reaching higher values of DEHP metabolites due to an uncontrolled exposure cannot be ruled out. For this reason, the threshold concentrations proposed were compared with concentrations of the metabolites obtained after longitudinal studies of individuals from a German cohort without special occupational exposure with a follow-up of several days [36]. The maximum concentrations detected for MEHHP and MEOHP along one week study were not higher than the reference limits proposed. However, maximum MEHHP concentrations described by Preau et al. in a study performed with an American cohort were higher

than 338 ng mL<sup>-1</sup> in some of the volunteers [45]. The difference may reflect a different lifestyle between the cohorts studied. For this reason, further investigations are still needed to clarify the origin of the increased DEHP exposures observed in some individuals not subjected to blood transfusion.

## 4. Conclusions

A methodology for the quantitation of five DEHP metabolites in urine has been developed and validated. The protocol developed is effective and it requires short time analysis due to its simple sample preparation and the use of UPLC as chromatographic separation technique which provides short total running times. The reliability of the method proposed makes it adequate as screening test to be applied in all urine samples in the antidoping control laboratories to suspect for blood transfusion practices.

Concentrations of DEHP metabolites in different population groups have been measured to obtain data that reflect the common environmental exposure. The concentrations found in normally exposed subjects (control group) and in sportsmen are usually low for all metabolites. Moreover, the basal concentrations obtained in the sportsmen group were used to establish threshold concentrations for four DEHP metabolites after common exposure.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from DIUE Generalitat de Catalunya (2009 SGR 492) and the World Antidoping Agency (Research Grant 06A6JS). Financial support from Consell Català de l'Esport (Generalitat de Catalunya) is also acknowledged. The background support of IMIM-Hospital del Mar is acknowledged. The authors thank the collaboration of Dr. M. Farré, E. Menoyo and M. Bosch for sample collection, Mr. S. Mojal for statistical analysis and to Pieter Van Renterghem for providing the RefVal program.

## References

- European Commission Opinion on Medical Devices Containing DEHP plasticized PVC; Neonates and Other Groups Possibly at Risk from DEHP Toxicity. Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices (SCMPMD), Brussels, 2002. Available at: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scmp/out43\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scmp/out43_en.pdf) (accessed June 2012).
- FDA Public Health Notification, PVC Devices Containing Plasticizer (DEHP). US Food and Drug Administration, Center of Devices and Radiological Health. Available at: <http://www.fda.gov/MedicalDevices/Safety/AlertsandNotices/PublicHealthNotifications/ucm062182.htm> (accessed June 2012).
- B. Horowitz, M.H. Stryker, A.A. Waldman, K.R. Woods, J.D. Cass, J. Drago. *Vox Sanguinis* 48 (1985) 150–155.
- J. Simmchen, R. Ventura, J. Segura. *Transfus. Med. Rev.* 26 (2012) 27–37.
- H.M. Koch, A.M. Calafat, Philos. *Trans. R. Soc. B* 364 (2009) 2063–2078.
- H. Frederiksen, N. Skakkebaek, A. Andersson, *Mol. Nutr. Food Res.* 51 (2007) 899–911.
- H. Fromme, G. Bolte, H.M. Koch, J. Angerer, S. Boehmer, H. Drexler, R. Mayer, B. Liebl. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 21–33.
- G. Lottrup, A.M. Anderson, H. Leffers, G.K. Mortensen, J. Toppari, N.E. Skakkebaek, K.M. Main. *Int. J. Androl.* 29 (2006) 172–180.
- C.R. Blystone, G.E. Kissling, J.B. Bishop, R.E. Chapin, G.W. Wolfe, P.M.D. Foster. *Toxicol. Sci.* 116 (2010) 640–646.
- G. Lattini, A. Verrotti, C. De Felice. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 4 (1) (2004) 37–40.
- H.M. Koch, R. Preuss, J. Angerer. *Int. J. Androl.* 29 (2006) 155–165.
- P.W. Albro, S.R. Lavenhar. *Drug Metab. Rev.* 21 (1989) 13–34.
- M.J. Silva, D.B. Barr, J.A. Reidy, R. Kato, N.A. Malek, C.C. Hodge, D. Hurtz, A.M. Calafat, L.L. Needham, J.W. Brock. *Arch. Toxicol.* 77 (2003) 561–567.
- H.M. Koch, H.M. Bolt, R. Preuss, J. Angerer. *Arch. Toxicol.* 79 (2005) 367–376.
- M.J. Silva, E. Samandar, J.L. Preau, L.L. Needham, A.M. Calafat. *Toxicology* 219 (2006) 22–32.
- H.M. Koch, B. Rossbach, H. Drexler, J. Angerer. *Environ. Res.* 93 (2003) 177–185.
- D.B. Barr, M.J. Silva, K. Kato, J.A. Reidy, N.A. Malek, D. Hurtz, M. Sadowski, L.L. Needham, A.M. Calafat. *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 1148–1151.
- K. Kato, M.J. Silva, J.A. Reidy, N.A. Malek, L.L. Needham, H. Nakazawa, D.B. Barr, A.M. Calafat. *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 327–330.
- M.J. Silva, J.A. Reidy, J.L. Preau, E. Samandar, L.L. Needham, A.M. Calafat. *Biomarkers* 11 (2006) 1–13.



GModel

CHROMB181091-9

## ARTICLE IN PRESS

N. Monfort et al. / J. Chromatogr. B xxx (2012) xxx–xxx

9

- 533 [20] A.M. Calafat, L.L. Needham, M.J. Silva, G. Lambert, *Pediatrics* 113 (2004) 429–434. 537
- 534 [21] C. Pan, T. Hanaoka, M. Yoshimura, S. Zhang, P. Wang, H. Tsukino, K. Inoue, 535 H. Nakazawa, S. Tsugane, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1643–1648. 536
- 537 [22] R. Preuss, H. Koch, J. Angerer, *J. Chromatogr. B* 816 (2005) 269–280. 538
- 539 [23] K. Kato, M.J. Silva, L.L. Needham, A.M. Calafat, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. 540 Biomed. Life Sci.* 814 (2005) 355–360. 541
- 542 [24] M.J. Silva, E. Samanfar, J.L. Preau, J.A. Reidy, L.L. Needham, A.M. Calafat, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 860 (2007) 106–112. 543
- 544 [25] B.C. Blount, K.E. Milgram, M.J. Silva, N.A. Malek, J.A. Reidy, L.L. Needham, J.W. 545 Brock, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4127–4134. 546
- 547 [26] H.M. Koch, L.M. Gonzalez-Reche, J. Angerer, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. 548 Biomed. Life Sci.* 784 (2003) 169–182. 549
- 550 [27] P.A. Arndt, B.M. Kumpel, *Am. J. Hematol.* 83 (2008) 657–667. 551
- 552 [28] S. Giraud, N. Robinson, P. Mangin, M. Saugy, *Forensic Sci. Int.* 179 (2008) 553 23–33. 554
- 555 [29] K. Inoue, M. Kawaguchi, R. Yamanaka, T. Highchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa, 556 *J. Clin. Chim. Acta* 358 (2005) 159–166. 557
- 558 [30] N. Monfort, R. Ventura, A. Latorre, V. Belalcázar, M. López, J. Segura, *Transfusion 559 (Paris)* 50 (2010) 145–149. 560
- 561 [31] N. Monfort, R. Ventura, P. Platen, T. Hinrichs, K. Brixius, W. Schänzer, M. Thevis, 562 H. Geyer, J. Segura, *Transfusion (Paris)* 52 (2012) 647–657. 563
- 564 [32] N. Monfort, R. Ventura, P. Platen, T. Hinrichs, K. Brixius, W. Schänzer, M. Thevis, 565 H. Geyer, J. Segura, *Transfusion (Paris)* 52 (3) (2012) 680–681. 566
- 567 [33] J. Segura, N. Monfort, R. Ventura, *Drug Test. Anal.* (2012), 568 <http://dx.doi.org/10.1002/dita.405>. 569
- 570 [34] E. Solymos, S. Guddat, H. Geyer, U. Flenker, A. Thomas, J. Segura, R. Ventura, P. 571 Platen, M. Schulte-Mattler, M. Thevis, W. Schänzer, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 572 (2011) 517–528. 573
- 574 [35] E. Solymos, S. Guddat, H. Geyer, U. Flenker, A. Thomas, J. Segura, R. Ventura, P. 575 Platen, M. Schulte-Mattler, M. Thevis, W. Schänzer, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 576 (2) (2011) 579–580. 577
- 578 [36] E. Solymos, S. Guddat, H. Geyer, A. Thomas, M. Thevis, W. Schänzer, *Drug Test. 579 Anal.* 3 (2011) 892–895. 580
- 581 [37] T. Brooks, C.W. Keevil, *J. Lett. Appl. Microbiol.* 24 (1997) 203–206. 582
- 583 [38] World Anti-doping Agency, *International Standards for Laboratories, WADA, 584 Montreal, 2011*. 585
- 586 [39] H.E. Solberg, *Comput. Methods Programs Biomed.* 48 (3) (1995) 247–256. 587
- 588 [40] M. Wittassek, G.A. Wiesmuller, H.M. Koch, R. Eckard, L. Dobler, J. Müller, J. 589 Angerer, C. Schluter, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210 (2007) 319–333. 590
- 591 [41] H. Frederiksen, N. Jørgensen, A.M. Andersson, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 592 400–410. 593
- 594 [42] J.A. Colacino, H. Robert, A. Schecter, *Environ. Health Perspect.* 118 (7) (2010) 595 998–1003. 596
- 597 [43] Y. Guo, Q. Wu, K. Kannan, *Environ. Int.* 37 (2011) 893–898. 598
- 599 [44] H. Frederiksen, L. Aaksgaede, K. Sørensen, N.E. Skakkebaek, A. Juul, A.M. Ander- 600 sson, *Environ Res.* 111 (2011) 656–663. 601
- 602 [45] J.L. Preau, L.Y. Wong, M.J. Silva, L.L. Needham, A.M. Calafat, *Environ. Health 603 Perspect.* 118 (2010) 1748–1754. 604

Please cite this article in press as: N. Monfort, et al., *J. Chromatogr. B* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.09.030>



N. Monfort<sup>1,2</sup>, R. Ventura<sup>1,2</sup>, A. Latorre<sup>1</sup>, V. Belalcazar<sup>1</sup>, M. López<sup>1</sup>, J. Segura<sup>1,2</sup>

## **Phthalate exposure: new clue to suspect illicit blood transfusion**

1 Bioanalysis and Analytical Services Research Group, Neuropsychopharmacology Research Program, IMIM-Hospital del Mar, Barcelona (Spain).

2 Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, (Spain).

### **Abstract**

Humans are exposed to di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), a plasticizer used in polyvinyl chloride (PVC) products. DEHP is also present in bags used in blood transfusions, subsequently patients submitted to blood transfusions for medical reasons or athletes using blood doping are exposed to this chemical, for which some toxic effects are known.

DEHP is metabolized and its metabolites are excreted in urine, and the metabolites have been used as markers of DEHP exposure. In the first step of this study, an analytical methodology to measure three DEHP metabolites in urine has been developed.

In a second step, the concentration of DEHP metabolites were evaluated in different population groups: healthy volunteers, patients receiving blood transfusions, hospitalized patients receiving medical care involving plastic materials, and, athletes.

The results indicated significantly higher concentrations of DEHP metabolites in subjects submitted to blood transfusion in comparison to the other population groups. These differences suggest that DEHP metabolites could be selective markers of the blood transfusion misuse. This selective and rapid methodology could be applied as screening test in urine in the antidoping control laboratories to suspect those prohibited practices.

### **Introduction**

The use of blood transfusion in sports is widely used and it is forbidden by the World Antidoping Agency. Nevertheless, the detection of these practices is limited by the need of blood sampling and the limitations of present methodologies. Thus, no method is available at present for the laboratory detection of the autologous blood transfusion [1,2].

Phthalates are used as plasticizers in polyvinyl chloride (PVC) plastic materials and humans can be exposed to DEHP through different products [3,4]. The blood bags used to store blood for fusion contain this plasticizer; therefore transfused subjects are additionally exposed to it [5].

DEHP is metabolized to mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), mono-(2-ethyl-5-hydroxy-hexyl)phthalate (OH-MEHP), and mono-(2-ethyl-5-oxo-hexyl)phthalate (OXO-MEHP), and those metabolites are excreted in urine as glucuronide conjugates [6,7].

In this paper, the use of DEHP metabolites as markers of blood transfusion misuse has been evaluated.

## **Experimental**

### **Subjects**

Urinary concentrations of DEHP metabolites were evaluated in different populations groups: healthy subjects (Group 1, n=30, reflecting common environmental DEHP exposure); hospitalized patients exposed to different medical treatments involving plastic materials but not subjected to blood transfusions (Group 2, n=39); and hospitalized transfused subjects (Group 3, n=25). In groups 2 and 3, samples were collected for the periods from 0 to 24h and from 24 to 48h after the last exposition. Stored urine samples from actual doping control programs were also tested (Group 4, n=127).

### **Measurement of DEHP metabolites**

Quantitative determination of MEHP, OH-MEHP, and OXO-MEHP in urine was performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS).

To 1 mL of urine samples, the internal standards (MEHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub> and OXO-MEHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Andover, MA, USA) were spiked, and the pH was adjusted to 6.5 with ammonium acetate buffer (250µL). After enzymatic hydrolysis with beta-glucuronidase, samples were acidified with 0.67 M phosphate buffer pH 2 (2 mL) and extracted with 8 mL of ethyl acetate for 20 min. The organic layers were evaporated to dryness under nitrogen stream and finally, the extracts were reconstituted with 100 µL of a mixture of deionized water:acetonitrile (80:20,v/v) and aliquots of 5 µL were analyzed by UPLC-MS/MS.

Chromatographic separation was carried out on a Waters Acquity UPLC system using an Acquity BEH C<sub>18</sub> column (100 mm x 2.1 mm i.d., 1.7 µm particle size) (Waters Corporation, Milford, MA) with a mobile phase consisted of a mixture of water and acetonitrile with 0.01% formic and a gradient elution. The UPLC system was coupled to a Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer (Micromass, Waters Corp.) with an electrospray ionization source working in positive ionization mode and using argon and nitrogen gas as collision and desolvation gas, respectively. The following selective precursor and product ion transitions were monitored: 279>149, 293>127, 295>167, 283>153, and 297>127 for MEHP,

OXO-MEHP, OH-MEHP, MEHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, and MEOHP<sup>13</sup>C<sub>4</sub>, respectively. The mass spectrometric parameters cone voltage and collision energy, were optimized for each compound to maximize the signal detected.

### Results

The method developed was validated. The extraction recoveries were all higher than 80% and the limits of quantitation were less than 5ng/mL for all the metabolites. A good linearity was obtained for the method. The intra-day and intermediate precision were estimated by using two quality control samples at two concentration levels (a low and a high control). The intra-day precision (expressed as the relative standard deviation,RSD, of three replicates) was less than 10 and 25% for the high and low control, respectively. The RSD obtained for the intermediate precision was less than 25% for all the metabolites.

To evaluate the exposition of the general population, samples of Group 1 were analyzed. The samples of Group 2 and 3 were tested to determine the DEHP metabolites concentrations after different medical treatments. Concentration of DEHP metabolites in samples of Groups 1, 2 and 3 are shown in the **Figure 1**. Samples corresponding to Group 1 had concentration below 50 ng/mL but an important increase of these levels was observed in urine samples of transfused subjects, Group 3, with concentrations around 200 ng/mL. In the case of samples of Group 2, the concentrations were statistically different from those of transfused patients ( $p<0.001$ ) but not from the samples of healthy subjects ( $p>0.001$ ). The concentration of MEHP in urine samples of Group 3 collected up to 2 days after blood transfusion showed remarkable differences as compared to samples of Group 1 and 2. In the case of OH-MEHP and OXO-MEHP significant higher concentrations have been detected in transfused subjects in samples collected from 0 to 24 h after the transfusion. Consequently, the accumulation of DEHP metabolites in the urine of transfused subjects was significantly higher than in the other groups. In **Figure 2** typical chromatograms obtained are presented and the different concentration of DEHP metabolites in samples of non-transfused and transfused subjects can be observed.

The results of the analyses of athlete's samples indicate similar DEHP metabolites concentrations to those of the Group 1 and 2 samples, except for four samples (A,B,C,D in **Figure 3**) which appear as far-outliers in the boxplot figure.

### Discussion

The work shows the potential use of DEHP metabolites as markers of DEHP exposure as a consequence of a blood transfusion process because high levels of DEHP metabolites appear in urine after this kind of invasive treatment. The athletes samples analyzed corroborate low levels of DEHP metabolites in urine of that characteristic population. When high concentrations are observed in an athlete's samples after the analysis here proposed (for example, subjects A,B,C,D in Figure 3) they could be regarded as a consequence of a potential blood transfusion process and a follow up of the case would be needed by more specific methods.

In conclusion, this approach opens the door to a suitable easy tool to suspect blood transfusion either autologous or homologous in athletes, using a cheap and simple sample preparation and analysis. This screening methodology may be applied to all urine samples submitted to doping control in any accredited laboratory.

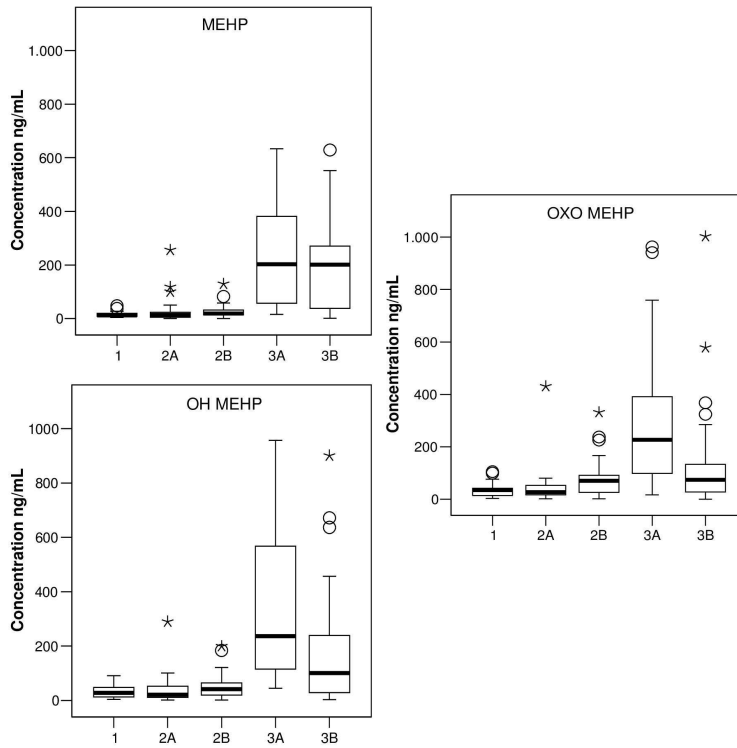
Given that DEHP is widely used worldwide as plasticizer and different sources of DEHP exposure could increase the DEHP metabolites in urine [8,9], it could be useful to incorporate the basal concentrations of urinary DEHP metabolites into the individual athlete biological passport in order to detect sudden and unexplained increases of DEHP metabolites.

### References

- [1]. Prommer N, Sottas PE, Scoch C, Schumacher YO, Schmidt W. (2008) Total hemoglobin mass--a new parameter to detect blood doping? *Med Sci Sports Exerc*; **40**: 2112-8.
- [2]. Morjeberg J, Belhage B, Rasmussen AB, Damsgaard R, Ashenden MJ, Dziegel MH. (2008) Changes in red blood cell volume, plasma volume, and total blood volume after autologous blood collections. *Transfusion*; **48**: 1524-6.
- [3]. FDA Public Health Notification. Safety assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) released from polyvinyl chloride (PVC) medical devices, US Food and Drug Administration, Center of Devices and Radiological Health, Rockville, MD (2001) <http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf> (access date 06.11.2008).
- [4]. European Commission Health & Consumer Protection DG Brussels. The safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk. European Commission, Brussels (2008) [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/risk\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/risk_en.htm). (access date 06.11.2008).
- [5]. Inoue K, Kawaguchi M, Yamanaka R, Highchi T, Ito R, et al. (2005) Evaluation and analysis of exposure levels of di-(2-ethylhexyl)phthalate from blood bags. *Clin Chim Acta*, **358**: 159-66.
- [6]. Blount B, Silva M, Caudill S, Needham L, Pirkle J, Sampson E, et al. (2000) Levels of Seven Urinary Phthalate Metabolites in a Human Reference Population. *Environ Health Perspect*; **108**: 979-81.
- [7]. Fromme H, Bolte G, Koch H, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, et al. (2007) Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int. J. Hyg. Environ.-Health*; **210**: 21-33.

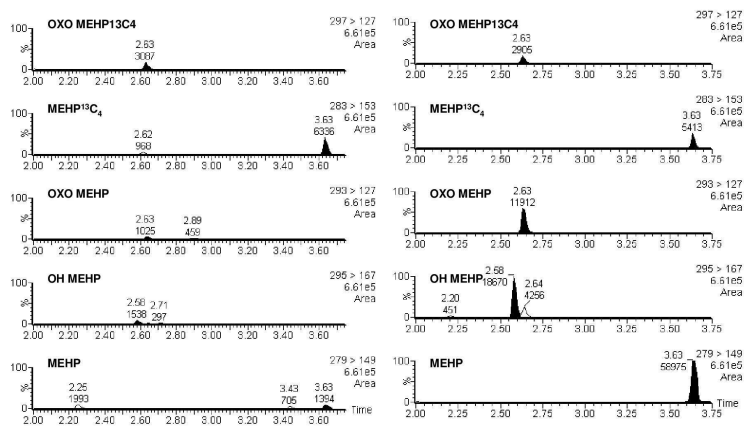
- [8]. Blount B, Silva M, Caudill S, Needham L, Pirkle J, Sampson E, et al. Levels of Seven Urinary Phthalate Metabolites in a Human Reference Population. (2000) *Environ Health Perspect*; **108**: 979-81.
- [9]. Fromme H, Bolte G, Koch H, Angerer J, Boehmer S, Drexler H, et al. (2007) Occurrence and daily variation of phthalate metabolites in the urine of an adult population. *Int. J. Hyg. Environ.-Health*; **210**: 21-33.

**Figure 1. Concentration of DEHP metabolites in urine samples: 1 (healthy subjects), 2A (hospitalized but not transfused subjects, 0 to 24 hours), 2B (hospitalized but not transfused subjects, 24 to 48 hours), 3A (transfused subjects, 0 to 24 hours), 3B (transfused subjects, 24 to 48 hours).** High concentrations in one subject corresponding to 3535 ng/mL, 5174 ng/mL and 2362 ng/mL (MEHP, OH-MEHP and OXO-MEHP, respectively) and one value of another subject (1972 ng/mL for OH-MEHP) are not shown in 3A and 3B respectively.

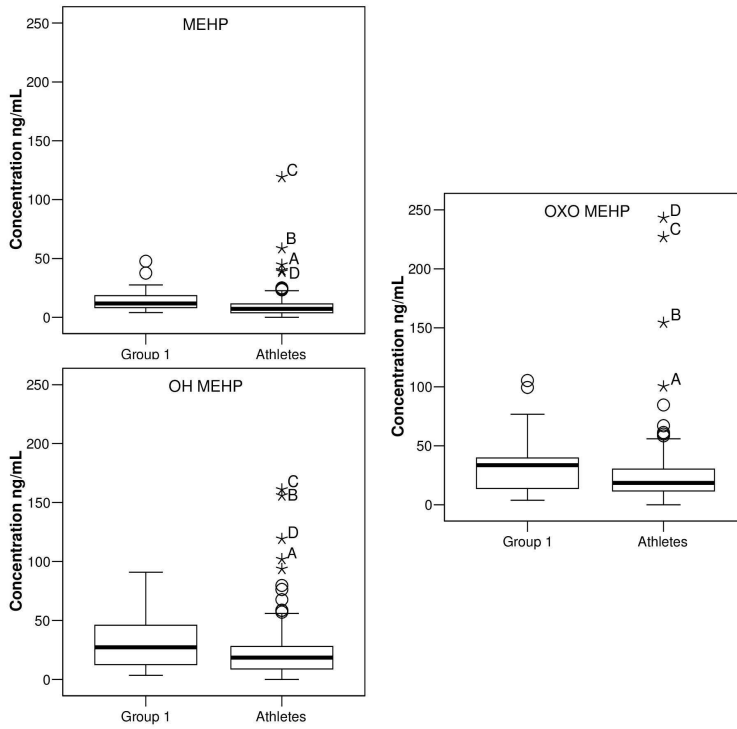




**Figure 2.** Chromatograms of a blank sample corresponding to a healthy subject (left) and chromatograms of a typical urine sample of a transfused subject (right).



**Figure 3. Concentrations of DEHP metabolites in urine samples of athletes compared with healthy subjects (Group 1). Four subjects (A,B, C and D) in the athletes group presented outlier results in rewspect the full sportive population studied.**



Segura J, Monfort N, Ventura R. [Detection methods for autologous blood doping](#). Drug Test Anal. 2012 Nov; 4(11):876-881.

## Review

### Detection methods for autologous blood doping

J. Segura, N. Monfort and R. Ventura



The development of methodologies able to detect blood doping in athletes is one of the current main challenges of the antidoping control laboratories. Different approaches and the more recent strategies based in the measurement of markers in blood and urine are reviewed.

## Annex II

World Anti-doping Agency. [The world anti-doping code. The 2012 prohibited list international standard.](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf) [monografia a Internet]. 2012 [accès 19 de febrer de 2013]. Disponible a: [http://www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited-list/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf)



## **Annex III**

Part d'aquest treball ha estat guardonat amb el XIII Premio Nacional de Investigación en Medicina del Deporte 2010 atorgat per la Universitat d'Oviedo.

