

Control de calidad de residuos de biocidas en frutos de *Silybum marianum* L.

Quality control of organochlorine biocide residues in fructus from Silybum marianum L.

OBRESHKOVA D Y PENCHEVA I

Universidad Médica de Sofía, Facultad de Farmacia, Departamento de Química Farmacéutica, 2 «Dunav» str., 1000 Sofia, BULGARIA Correo electrónico: ivatibi@yahoo.com

RESUMEN

Los estudios analíticos de los biocidas organoclorados demuestran que su nivel de concentración en las raíces de plantas es mayor que la concentración en el suelo, y especialmente en las plantas medicinales utilizadas en las industrias farmacéutica y medicinal. Los fármacos búlgaros más utilizados (Carsil, Tribestan y Nivalin) contienen extractos de plantas y deben ser analizados de acuerdo con las directivas de la Comunidad Europea EEC/76/895 y EEC/90/642 1998;

Por ello, se ha estudiado el método de cromatografía de gases para la determinación cuantitativa de biocidas organoclorados (HCH e isómeros, DDT y metabolitos). Se han analizado conforme a las regulaciones de la Pharmacopoeia Europea materiales procedentes de plantas de distintas regiones de Bulgaria (frutos de *Silybum marianum*, L) y grageas de Carsil producidas por Sopharma Ltd. El método ha sido validado y se han estudiado parámetros analíticos de especificidad, linealidad, precisión, replicabilidad y rango.

PALABRAS CLAVE: Carsil. DDT. Frutos de *Silybum marianum*. L.. Cromatografía de gases. Biocidas organoclorados.

ABSTRACT

Analytical studies of organochlorine biocides show that their concentration in the plants (roots) is higher than in the ground and particularly in the medicinal plants used in the therapy and the pharmacy industry. The most favorite Bulgarian drugs (Carsil, Tribestan and Nivalin) contain plant extracts and they have to be analyzed in respect to European Community Directives EEC/76/895 and EEC/90/642 1998;

*In view of that the gas chromatography method for quantitative determination of organochlorine biocides (HCH and isomers, DDT and metabolites) was studied. Plant material from different regions of Bulgaria (fructus from *Silybum marianum*, L) and Carsil dragee produced by Sopharma Ltd. were analyzed in respect to European Pharmacopoeia regulations. The method was validated and analytical parameters specificity, linearity, precision, repeatability and range were studied.*

KEY WORDS: Carsil. DDT. Fructus from *Silybum marianum*. L.. Gas chromatography. Organochlorine biocides.

INTRODUCCIÓN

El uso de biocidas organoclorados es aún relativamente amplio en todo el mundo. Se caracterizan por un espectro de actividad que incluye a numerosos insectos, pero tienen una elevada persistencia y tendencia a ser bioacumulativos en la cadena alimentaria. En Bulga-

INTRODUCTION

The organochlorine biocides are still in relatively widespread use in the world. They are characterized with spectrum of activity including many insects but they have very long persistence and tendency to bioaccumulate along food chains. In Bulgaria the organo-

ria, el uso de biocidas organoclorados está prohibido desde 1990, pero su control y estudio analíticos siguen estando de actualidad por diversas razones:

- Los biocidas organoclorados se siguen utilizando en los países del entorno de Bulgaria (Rumanía);
- La desactivación de los biocidas es un proceso largo, y el grado de contaminación medioambiental demuestra que todavía se deben controlar.

Los compuestos del grupo de biocidas organoclorados utilizados con más frecuencia son los isómeros (α , γ) del HCH (hexaclorociclohexano), DDT (tricloroetano-bis (clorobenceno) y sus metabolitos DDE (dicloroetileno - bis(clorobenceno) y DDD (dicloroetano-bis(clorobenceno))^{7,14}. La concentración de biocidas organoclorados en las plantas (raíces) es superior a la del terreno³. Debido a ello, se debe realizar un control de calidad de los fármacos más utilizados en Bulgaria, Carsil, Tribestan y Nivalin de acuerdo a las directivas de la Comunidad Europea EEC/76/895 y EEC/90/642 1998.

El HCH, el DDT y sus metabolitos en general tienen un efecto insecticida para la protección de las plantas, pero en la mayoría de los casos se han comunicado envenenamientos humanos. Los biocidas organoclorados son motivo de preocupación por sus propiedades perjudiciales para el sistema endocrino y por otras propiedades tóxicas^{5, 9}. Uno de los mayores riesgos potenciales de la exposición a los organoclorados es la aparición de cánceres de mama y ginecológicos^{6, 8, 10 y 11}.

A la vista de lo anterior, el objeto de este estudio es la determinación cuantitativa de diversos biocidas organoclorados mediante cromatografía de gases en los frutos de la planta medicinal *Silybum marianum*, L. y del fármaco búlgaro Carsil con acción hepatoprotectora, que contiene silymarin (mezcla flavonoide, aislada a partir de *Silybum marianum*, L.). Los análisis se realizaron de acuerdo a las directivas de la Comunidad Europea EEC/76/895 y EEC/90/642 y a la Pharmacopoeia Europea 2.8.13².

chlorine biocides are forbidden for use since 1990 but their analytical study and control are actual because of some reasons:

- Organochlorine biocides are in use in the countries around Bulgaria (Romania);
- Deactivation of biocides is a long-time process and their contamination in environmental show that they must still be under control.

The most commonly used compounds from organochlorine biocide group are HCH (hexachlorocyclohexane) isomers (α , γ), DDT (trichloroethane-bis(chlorobenzene) and its metabolites DDE (dichloroethylene - bis(chlorobenzene) and DDD (dichloroethane-bis(chlorobenzene))^{7,14}. The concentration of organochlorine biocides in the plants (roots) is higher than that in the ground³. Because of that the quality control of the most favorite Bulgarian drugs Carsil, Tribestan, Nivalin has to be done in respect to European Community Directives EEC/76/895 and EEC/90/642 1998.

HCH, DDT and metabolites in general have an insecticide effect during plant protection, but in the most of cases, human poisonings have been reported. Organochlorine biocides are of concern because they have endocrine disrupting and other toxic properties^{5, 9}. One of the most potential risks of organochlorine exposure is for breast and gynecological cancers^{6, 8, 10 and 11}.

In view of that the aim of this study is a quantitative determination of several organochlorine biocides by Gas chromatography in the fructus from the medicinal plant *Silybum marianum*, L. and Carsil Bulgarian drug with hepatoprotective action, containing silymarin (flavonoid mixture, isolated from *Silybum marianum*, L.). The analysis were done in respect to European Community Directives EEC/76/895 and EEC/90/642 and European Pharmacopoeia 2.8.13².

MATERIAL Y MÉTODOS

Material de la planta: Frutos de *Silybum marianum*, recolectados alrededor de las poblaciones de Iambol, Ispcrih, Plovdiv, Stara Zagora, Targovishte, Ruse, Novi Iskar, Pazardjik, Lovech, Silistra y Vidin.

Fármaco: Grageas de Carsil, Sopharma Ltd., lotes N° 2B0101, 8A0700, 410301.

Reactivos químicos: hexano, acetonitrilo, cloruro sódico, anhídrido de sulfato sódico, carbo medicinalis, éter etílico, éter de petróleo, óxido de aluminio estandarizado para análisis de adsorción cromatográfico de columna, Florisil (gel de sílice con carga de magnesio con un tamaño de partícula de 150 – 250 mm). Sustancias: γ -HCH, α -HCH, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT, 2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD. Todos los reactivos son de grado analítico.

4. Preparación de la muestra 1 (disolvente hexano):

Se extrajeron 5.0 g (cantidad exacta) de frutos de *Silybum marianum* (molido grueso) con 100.0 ml de hexano. La extracción se realizó en un matraz, agitándolo durante 30 minutos. La mezcla extraída se filtró y se separó el agua residual, que se eliminó mediante un embudo. Para secar por completo el material de la planta se utilizó anhídrido de sulfato sódico, y la muestra se dejó reposar durante 24 horas. A continuación, se filtró la mezcla y se concentró en vacío hasta obtener un volumen de 10.0 ml. El mismo procedimiento descrito se utilizó con el material de plantas procedentes de todos los lugares.

5. Preparación de la muestra 2 (disolvente acetonitrilo):

Se extrajeron 5.0 g (cantidad exacta) de frutos de *Silybum marianum* (molido grueso) con 50,0 ml de acetonitrilo. La extracción se realizó en un matraz, agitando durante 30 minutos. La mezcla extraída se filtró a través de anhídrido de sulfato sódico. La solución de muestra obtenida se trató con solución de cloruro sódico en éter de petróleo (20 g de cloruro sódico en éter de petróleo q.s.). La muestra se dejó reposar durante 24 horas y se separó el acetonitrilo del éter de petróleo mediante un embudo. La solución de acetonitrilo filtrada se concentró al vacío hasta obte-

MATERIAL AND METHODS

1. Plant material: Fructus from *Silybum marianum*, collected around the towns Iambol, Ispcrih, Plovdiv, Stara Zagora, Targovishte, Ruse, Novi Iskar, Pazardjik, Lovech, Silistra, Vidin.

2. Drug: Carsil dragee, Sopharma Ltd., batch N 2B0101, 8A0700, 410301.

3. Chemical reagents: Hexane, Acetonitrile, Sodium chloride, Sodium sulfate anhydrate, Carbo medicinalis, Ethyl ether, Petroleum ether, Aluminium oxide standartized for column chromatographic adsorption analysis, Florisil (magnesia-loaded silicagel with particle size 150 – 250 mm). Substances: γ -HCH, α -HCH, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT, 2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD. All reagents are analytical grade quality.

4. Preparing of Sample 1 (solvent hexane):

5.0 g (accurately weighed quantity) from fructus of *Silybum marianum* (coarsely powdered) were extracted with 100.0 ml hexane. The extraction was performed in flask by shaking for 30 min. The extracted mixture was filtered and the residue water was separated and eliminated trough funnel. For completely drying of the plant material, the Sodium sulfate anhydrate was used and the sample was staying for 24 hours. After that the mixture was filtered and concentrated under vacuum to volume – 10.0 ml. The prescribed procedure was used for the plant material from all places.

5. Preparing of Sample 2 (solvent acetonitrile):

5.0 g (accurately weighed quantity) from fructus of *Silybum marianum* (coarsely powdered) were extracted with 50.0 ml acetonitrile. The extraction was performed in flask by shaking for 30 min. The extracted mixture was filtered trough Sodium sulfate anhydrate. Obtained sample solution was treated with solution of Sodium chloride in petroleum ether (20 g Sodium chloride in petroleum ether – q.s.). The sample was staying for 24 hours and the acetonitrile was separate from petroleum ether with funnel. The filtered acetonitrile solution was concentrated under vacuum to volume – 10.0 ml. The prescribed procedure was used for the plant material from all places.

ner un volumen de 10.0 ml. El mismo procedimiento descrito se utilizó con el material de plantas procedentes de todos los lugares.

6. Preparación de la solución de referencia:

La mezcla estándar utilizada como solución de referencia incluye siete biocidas. En la Tabla 1 se indican las sustancias estándar, sus concentraciones y tiempos de retención, registrados mediante el método de cromatografía de gases (columna OV17).

6. Preparing of reference solution:

The standard mixture used as reference solution includes seven biocides. On Table 1 are given standard substances, their concentrations and retention times, found by gas-chromatographic method (column – OV17).

TABLA 1. GC análisis de biocidas organoclorados.

TABLE 1. GC analysis of organochlorine biocides.

Componentes <i>Component</i>	Concentracion (mg/kg) <i>Concentration (mg/kg)</i>	t_R (min) t_R (min)
α -HCH	0.05	3. 55
γ -HCH	0.05	2. 85
2,4'-DDT	1.00	11. 79
4,4'-DDT	1.00	14. 95
2,4'-DDE	1.00	20. 49
4,4'-DDE	1.00	22. 64
DDD	1.00	26. 51

7. Purificación de las muestras.

7.1. Rendimiento de la cromatografía de columna:

- con adsorbente óxido de aluminio:

Antes de utilizar el óxido de aluminio, se lavó con hexano y se calentó a 100 °C durante 4 horas. A continuación, se dejó enfriar y se desactivó con 3.0 ml de agua fresca destilada.

En la columna (0.1 m x 15 mm) se introdujeron un trozo de algodón desengrasado, 10.0 ml de hexano, 2.0 g de óxido de aluminio y 1.0 g de anhídrido de sulfato sódico. La capa de adsorción preparada se lavó con 10.0 ml de hexano y se elucionaron las muestras. La mezcla eluyente estaba formada por 1 volumen de benceno y 9 volúmenes de hexano.

7. Purification of samples.

7.1. Performance of the column chromatography:

- with adsorbent Aluminium oxide:

Before using the Aluminium oxide was washed with hexane and heated at 100 °C for 4 hours. After that it was allowed to cool and deactivated with 3.0 ml fresh distilled water.

To column (0.1 m x 15 mm) were introduced a piece of defatted cotton, 10.0 ml hexane, 2.0 g Aluminium oxide and 1.0 g Sodium sulfate anhydrate. The prepared adsorption layer was washed with 10.0 ml hexane and the samples were eluted. The eluent mixture was 1 volume benzene to 9 volumes hexane.

- with adsorbent Florisil: Before using the Florisil was washed with acetonitrile and heated

- *con adsorbente Florisil*: Antes de utilizar el Florisil, se lavó con acetonitrilo y se calentó a 300 °C durante 2 horas. A continuación, se dejó enfriar y se desactivó con 3.0 ml de agua fresca destilada.

Se introdujeron en la columna (0.1 m x 15 mm) un trozo de algodón desengrasado y 2.0 g de Florisil. El Florisil se utilizó en forma de suspensión en éter para producir la capa de adsorción. A continuación, se lavó la columna con 5.0 ml de éter y se añadieron 0.5 g de anhídrido de sulfato sódico. La mezcla eluyente fue de éter etílico: éter de petróleo en las siguientes proporciones: 3:47 v/v; 7:43 v/v y 25:25 v/v.

En los casos en los que las mezclas de extracción contenían constituyentes de color, se añadieron 0.5 g de carbo medicinalis antes de añadir el anhídrido de sulfato sódico.

8. Análisis cuantitativo

Para realizar el procedimiento de cromatografía de gases se utilizaron:

8.1. Sistema cromatográfico:

Cromatógrafo PERKIN-ELMER 8700 equipado con columna 3% OV Chromosorb WBE – 50 m x 0.32 mm i.d., con un espesor de película de 0.25 mm y un detector de captura de electrones (ECD).

8.2. Condiciones cromatográficas:

Para la columna: temperatura de la columna 140 °C, temperatura del puerto del inyector 200 °C, temperatura del detector 250 °C, tiempo iso 20 min.

Se registraron los tiempos relativos detectados y se compararon con los de la mezcla estándar, y el contenido de cada pesticida se calculó mediante las áreas pico (Tabla 1).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se validó el método cuantitativo de cromatografía de gases para biocidas organoclorados, y se estudiaron los criterios de especificidad, linealidad, precisión, replicabilidad y rango. Los resultados obtenidos por este método fueron satisfactorios, y se utilizó para el control cuantitativo de materiales de plantas procedentes de los lugares de Bulgaria indicados y de grageas de Carsil (Tabla 2).

at 300 °C for 2 hours. After that it was allowed to cool and deactivated with 3.0 ml fresh distilled water.

To column (0.1 m x 15 mm) were introduced a piece of defatted cotton and 2.0 g Florisil. The Florisil was used like suspension in ether to produce adsorption layer. After that the column was washed with 5.0 ml ether and 0.5 g Sodium sulfate anhydrate was added. The eluent mixture was ethyl ether : petroleum ether – 3:47 v/v; 7:43 v/v and 25:25 v/v.

In the cases when the extraction mixtures contain color constituents 0.5 g Carbo medicinalis was added before Sodium sulfate anhydrate.

8. Quantitative analysis

The gas-chromatographic procedure was carried out using:

8.1. Chromatographic system:

The gas chromatograph PERKIN-ELMER 8700 was used equipped with column 3% OV Chromosorb WBE – 50 m x 0.32 mm i.d. and film thickness 0.25 mm and an electron-capture detector (ECD).

8.2. Chromatographic conditions:

For column: column's temperature 140 °C, injector port's temperature 200 °C, detector's temperature 250 °C, iso-time – 20 min.

The relative times was found and compared with standard mixture and the content of each pesticide was calculated using peak areas – Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

The quantitative gas chromatography method for organochlorine biocides was validated and the criteria specificity, linearity, precision, repeatability and range were studied. The results obtained by this method were satisfied and we used it for quantitative control of plant materials from the indicated places in Bulgaria and Carsil dragee (Table 2).

TABLA 2. Análisis de las muestras.**TABLE 2.** Analysis of real samples.

Lugar de la Muestra <i>Sample places</i>	t_R (min) t_R (min)	Cantidad (mg/kg) <i>Quantity (mg/kg)</i>	Limites (Eur. Phar.) (mg/kg) <i>Limits (Eur. Phar.) (mg/kg)</i>
α -HCH			
Pazarjik	2.94	0.003	0.3
Isperih	2.88	0.02	0.3
Stara Zagora	2.78	0.002	0.3
γ -HCH			
Targovishte	3.6	0.003	0.6
Ruse	3.64	0.1	0.6
Pazarjik	3.57	0.07	0.6
Lovech	3.49	0.02	0.6
Isperih	3.49	1	0.6
2,4'-DDE			
Pazarjik	11.85	0.1	1.0

Validación del método de cromatografía de gases (GC)

Se validaron la especificidad, linealidad, precisión, replicabilidad y rango del método de GC desarrollado para la determinación de residuos biocidas organoclorados.

— Método para el α - hexaclorociclohexano (α -HCH)

Para el estudio de la especificidad se sometieron a análisis de GC la solución estándar y la solución placebo, y se compararon los datos. No había picos en el cromatograma obtenido con esta solución.

Para la investigación se prepararon soluciones lineales con aumento de concentración en el intervalo de concentración de 0.0051-0.198 mg/ml. Los resultados fueron: pendiente: 2331.1117 ± 51.71387 , corte: 12.01903 ± 9.58683 y el coeficiente de correlación es 0.99779.

La exactitud se estudió sobre la base de la desviación estándar calculada (SD) y la desviación estándar relativa (RSD) de los resulta-

Validation of the GC methods

The developed GC method for determination of organochlorine biocide residues was validated in respect to specificity, linearity, precision, repeatability and range.

— Method for α - hexachlorocyclohexane (α -HCH)

For the studying of specificity the standard solution and the placebo solution were putted into GC analysis and the data were compared. There were no peaks on the chromatogram obtained with this solution.

For the investigation of linearity solutions with increasing of concentration were prepared in the concentration interval 0.0051-0.198 mg/ml. The results were: slope - 2331.1117 ± 51.71387 , cut -12.01903 ± 9.58683 and the correlation coefficient is 0.99779.

The accuracy was studied on the base of the calculated standard deviation (SD) and relative standard deviation (RSD) of results obtained from model mixtures containing active substance in different ratios. Every sam-

dos obtenidos a partir de mezclas modelo con distinto contenido de sustancia activa. Cada muestra se analizó tres veces. La tolerancia estaba en el intervalo -16 % ~ +9 % y la RSD era de 2.5 %.

— Método para el γ - hexaclorociclohexano (γ -HCH)

Para el estudio de la especificidad se sometieron a análisis de GC la solución estándar y la solución placebo, y se compararon los datos. La solución placebo no ha sido detectada en estas condiciones.

Para la investigación se prepararon soluciones lineales con aumento de concentración en el intervalo de concentración de 0,005-0,151 mg/ml. Los parámetros son: la pendiente es 4744.9547 ± 76.469 , el corte es 0.76147 ± 13.66085 y r es 0.9976. El intervalo de confianza de la SD y la RSD fue de 8.61, 4.21 y 2.63, respectivamente.

Procedimiento de extracción

Para la extracción y purificación de los residuos de biocidas organoclorados se utilizaron dos métodos: con adsorbente óxido de aluminio y disolvente hexano y adsorbente Florisil. El primer método se basó en el método estándar ISO 6468 utilizado para la determinación de biocidas organoclorados en agua. El óxido de aluminio es muy adecuado para la separación de compuestos con distintos grupos funcionales, pero se consiguió una mayor selectividad con Florisil. Este método se utilizó para los materiales de las plantas y la formulación farmacológica. La comparación entre los resultados obtenidos con distintos disolventes demuestra que la única diferencia significativa existente entre parámetros analíticos es la selectividad. Al realizar la identificación y la cuantificación es necesario probar este parámetro cada vez.

Análisis de muestras reales

Se encontraron restos de biocidas organoclorados en frutos de *Silybum marianum* L. recolectados en las regiones del norte de l país (Isparih, Targovishte, Ruse). Se detectó y determinó la presencia de residuos de los bio-

ple was analyzed three times. The tolerance was in the interval -16 % ~ +9 % and the RSD is 2.5 %.

— Methods for γ -hexachlorocyclohexane (γ -HCH)

For the studying of specificity the standard solution and the placebo solution were putted into GC analysis and the data were compared. The placebo solution has not been detected at these conditions.

Several solutions with increasing concentrations were prepared and analyzed for the investigation of linearity. Linearity range is in the interval 0.005 - 0.151 mg/ml. The parameters are: slope 4744.9547 ± 76.469 , and cut - 0.76147 ± 13.66085 and r is 0.9976. The RSD is 2.63%.

Extraction procedure

For extraction and purification of organochlorine biocide residues two methods were used – with adsorbent aluminium oxide and solvent hexane and with adsorbent florisil. The first method is based on the ISO 6468 method used for quantitative determination of organochlorine biocides in water. Aluminium oxide is very suitable for separation of compounds with different functional groups, but the higher selectivity was achieved with florisil. This method was used for plant materials and the drug formulation. The comparison between results obtained with different solvents shows that between analytical parameters there is no significant difference except selectivity. It's necessary to prove this parameter every time when we make identification and quantitation.

Analysis of real samples

The organochlorine biocide residues were found in fructus from *Silybum marianum* L. collected from the North regions of country (Isparih, Targovishte, Ruse). The residues from organochlorine biocides α -HCH, γ -HCH and 2,4'-DDT were found and determined. All results are under limits, except γ -HCH in samples from Isparih place (Table 2). In the plant material collected from South regions of country

cidas organoclorados α -HCH, γ -HCH y 2,4'-DDT. Todos los resultados se encuentran por debajo de los límites, excepto γ -HCH en muestras de la región de Ispirih. En el material de plantas recolectadas en las regiones del sur del país también se encontraron residuos de biocidas organoclorados, aunque en cantidades más pequeñas.

Para esta investigación se utilizaron los límites y criterios de la Pharmacopoeia Europea. Es muy necesario introducir los límites de residuos biocidas organoclorados en Bulgaria en el control de calidad de fármacos y plantas medicinales según las directivas de la Comunidad Europea. Esto será de gran utilidad, debido a los riesgos químicos no deseados y a la elevada toxicidad de los biocidas.

the residues from organochlorine biocides were also found but in smaller amounts.

For the purposes of this investigation we used the limits and criteria from European Pharmacopoeia. It is very necessary during the quality control of drugs and medicinal plants in respect to European Community Directives to introduce the limits for organochlorine biocide residues for Bulgaria. This will be very useful because of unwanted chemical risk and high toxicity of biocides.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Drumev D. Veterinarna Pharmacologia. Sofia. Medicina i Fizkultura 1975; 578 - 581.
2. European Pharmacopoeia, Appendix X/L. Pesticide Residues (Method 2.8.13.) European Community Directives EEC/76/895 and EEC/90/642 1998.
3. Lal R, Laxena D. Accumulation, metabolism and effects of organochlorine insecticides on microorganisms. Microbiol Rev 1982; 46: 95 - 127.
4. Karajov Y. Veterinarno higijenni aspekti na zamarsevaneto na okolnata sreda. Sofia ZEMIZDAT 1979; 40-49.
5. Ray D. Handbook of Pesticide Toxicology in: Hayes W and Laws E. San Diego Academic Press 1991; 2.
6. Safe S, Zacharewski T. Organochlorine exposure and risk for breast cancer. Etiology of Breast and Gynecological cancers 1997; 133-145.
7. Siegmund O. The Merck Veterinary Manual, A Handbook of Diagnosis and Therapy for the Veterinarian, in: Fraser CM (Ed). N. J. USA, Merck & Co, Inc. Rahway 1979; 998 - 1003.
8. Snedeker S. Pesticides and breast cancer risk: A review of DDT, DDE and Dieldrin, Environmental Health Perspectives 2001; 109: 35-47.
9. Terry F, Falconer R. Using Enantiomers to trace Pesticide Emission. Environmental Sci Technol 1999; 33 (9): 206-209.
10. Wolff M et al. Risk of breast cancer and organochlorine exposure. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 2000; 9: 271-277.
11. Wolff M et al. Hormonally active environmental exposures and their relationship to risk for reproductive cancer among women. Women and Cancer 1998; 1: 820.