



Gradu Amaierako Lana

Kimikako Gradua

OH-POP KUTSATZAILEEN

ANALISIA GERNUAN

Egilea:

Eider Gerekaetxebarria Bilbao

Zuzendariak:

Olatz Zuloaga Zubieta

© 2023, Eider Gerekaetxebarria Bilbao

GRADU AMAIERAKO LANA

KIMIKAKO GRADUA

OH-POP KUTSATZAILEEN ANALISIA GERNUAN

EIDER GEREKAETXEBARRIA BILBAO-EK AURKEZTUTAKO MEMORIA

MATRIKULAZIO- ETA DEFENTSA-DATA: 2023Ko Ekaineko deialdia

ZUZENDARIA: Olatz Zuloaga Zubieta

SAILA: Kimika Analitikoa

Aurkibidea

1. SARRERA	1
1.1 ESPOSOMA	1
1.2 KUTSATZAILE ORGANIKO IRAUNKORRAK	2
1.2.1 Hidrokarburo polizikliko aromatikoak (PAHak).....	4
1.2.2 Polibromodifenil eterrak (PBDEak)	5
1.2.3 Bifenilo polikloratuak (PCBak).....	6
1.3 KUTSATZAILE ORGANIKO IRAUNKORRAK GERNUAN: I/II-FASEKO METABOLITOAK..	7
1.4 KUTSATZAILE ORGANIKO IRAUNKORREN ANALISIA	8
1.4.1 Laginketa eta biltegiatzea	8
1.4.2 Hidrolisi entzimatikoa	9
1.4.3 Garbiketa.....	10
1.4.5 Analisia	12
2. HELBURUA	15
3. ATAL ESPERIMENTALA	16
3.1 ERREAKTIBOAK ETA MATERIALA	16
3.2 GERNU SINTETIKOA ETA GERNU LAGINAK	18
3.3. HIDROLISI ENTZIMATIKOA	18
3.3 GARBIKETA	18
a) Alderantzizko faseko fase solido bidezko erauzketa (RPSPE)	19
b) Likido-likido erauzketa (LLE)	19
c) Fase normaleko fase solido bidezko erauzketa (NPSPE).....	20
3.4 DERIBATIZAZIOA	20
3.5 ANALISIA	20
a) GC-MS bidezko analisia	20
b) LC-MS/MS bidezko analisia.....	21
3.6 BERRESPENA	22
a) LLE gehi NPSPE bidezko garbiketa eta GC-MS bidezko analisia.....	22
b) RPSPE bidezko garbiketa eta LC-MS/MS bidezko analisia	23
3.7 DATUEN TRATAMENDUA	24
4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	24

4.1 BANAKETA KROMATOGRAFIKOAREN ETA MASA-ESPEKTROMETRIAREN OPTIMIZAZIOA	24
4.1.1 GC-MS	24
4.1.2 LC-MS/MS	29
4.2 GARBIKETA-URRATSAREN OPTIMIZAZIOA	30
4.2.1 Alderantzizko faseko SPE	31
4.2.2 LLE	32
4.2.3 Fase normaleko SPE	34
4.2.4 Fase normaleko SPE eta LLEren arteko konparaketa.....	35
4.3 DERIBATIZAZIO-URRATSAREN OPTIMIZAZIOA	36
4.4 BERRESPENA	37
4.4.1 Hidrolisi entzimatika	37
4.4.2 Kuantifikazio muga instrumental eta prozeduralak.....	38
4.4.3 Etekin absolutua eta zuzendua	40
4.4.4 Errepikakortasun instrumentala eta prozedurala.....	43
5. ONDORIOAK	44
6. ESKER ONAK	45
7. BIBLIOGRAFIA	46
8. ERANSKINAK	I

1. SARRERA

1.1 ESPOSOMA

Jakina da gaixotasun askoren atzean, hala nola, minbizia, bihotz gutxiegitasuna, asma... ingurumen-faktore zein faktore genetikoak daudela, hainbat ikerketa epidemiologikoez frogatu baitute¹. Hala ere, faktore genetikoak oso ikertuak badaude ere, ingurumen-faktoreak ez dira hain modu zehatz eta sakonean aztertutak izan. Hori zuzenki erlazionatuta dago faktore horien analisiak egiteko dagoen tresneria urritasunarekin. Nolabait azken urteetan ingurumenarekiko esposizio neurtzeko erabili izan diren teknikak, galdetegiak, mapa geografikoak... ez dira nahikoak esposizio horren berri emateko eta hare gutxiago esposizio anitz aldi berean determinatzeko^{2,3}.

Azken urteetako joerak ikusita, esposoma kontzeptua definitu zuen Wild-ek izaki bizidun bat jaiotzen denetik eta hil arte jasotzen dituen ingurumen esposizio guztiak (fisikoak, kimikoak, biologikoak...) bezala^{4,5}. Kontzeptua hobeto definitzeko esposomaren barnean genetikoak ez diren hiru arlo bereiztu izan dira: (i) kanpo esposoma orokorra, (ii) kanpo esposoma espezifikoa eta (iii) barne esposoma. Kanpo esposoma orokorrari dagokionez, honek erreferentzia egiten dio eragin sozial, ekonomiko eta psikologikoei; hala nola, irakaskuntza-maila, estresa, egoera sozio-ekonomikoa, klimatologia, eta abarrei. Kanpo esposoma espezifikoa, aldiz, zehatzagoak diren faktoreei erreferentzia egiten die; hala nola, aurrera eramaten den dietari, tabako edo alkohol kontsumoari eta kutsatzaile kimiko zein fisikoen esposizioari^{1,2}. Oro har, esposoma mota hori izan da batez ere aztergai ikerketa epidemiologikoetan. Adibidez, tabako-kontsumoa birikietako minbiziarekin zuzenki erlazionatuta dagoela ikusi izan da, 60 urterekin, gaztetatik erretzaileak izandako % 16ak birikietako kantzerra garatzen baitu⁶. Azkenik, barne esposoma izango genuke, non metabolismo, heste-mikrobiota, hauntura, estres oxidatiboa... bezalako faktoreak kontuan hartzen diren. Beraz, aipatutako hiru arloak ondo definituta izatea ingurumen-faktoreek osasunean duten eragina identifikatzeko baliagarria izan daiteke^{2,3}.

Esposomaren kontzeptuak, beraz, etorkizunera begira ingurumen-faktoreek duten eragina aztertzeko bidea irekitzen du, guzti hori teknologia berrien garapenaren eskutik etorrita².

Kutsatzaile kimikoen esposizioa aztertzeko lagin biologikoen (odola, gernua, listua...) analisia beharrezkoa da. Haien artean gernua egokia izan daiteke zenbait abantaila dituelako, bolumen handien eskuragarritasuna eta kutsatzaileen edota euren metabolitoen kontzentrazio altuak, batez ere. Dena dela, ezaguna da beste desabantaila batzuk ere badituela, hain zuzen, matrizea nahiko zikina dela eta garbiketa-urratsak beharrezkoak direla. Odola ere lagin biologiko interesgarria da analitoak edo euren metabolitoak kontzentrazio oso altuetan daudelako, baina teknika inbaditzailea da, matrize oso konplexua, antikoagulatzaileak erabili behar dira eta lortu daitezkeen bolumenak murriztuagoak. Modu horretan odolaren erabilera nahiko txikiagoa da gernuaren ondoan. Beste matrize biologikoetarako (listua, ilea, plazenta...) garatutako metodoak oso murriztua, erreferentziako materialen urritasuna dira, besteak beste, euren erabilera murriztuaren adibide⁷.

1.2 KUTSATZAILE ORGANIKO IRAUNKORRAK

Aurretik aipatu den bezala, egunerokotasunean hainbat konposatu kimikorekin kontaktuan gaude eta horietako familia bat konposatu organiko iraunkorrak (POP, ingeleseko *Persistent Organic Pollutants* laburduratik) ditugu. POP konposatuek ezaugarri berezi batzuk dituzte, oso arriskutsuak bilakatzen dituztenak bai ingurunearentzako, bai gizakien osasunerako ere. Besteak beste hurrengoak aipa daitezke⁸:

i) Oso iraunkorrak dira eta urteak edota mendeak iraun dezakete aldaketa kimikoak jasan gabe ingurumenean edo bizidunetan. Hori arazo handia da; izan ere, hain iraunkorrak izanda, euren kontzentrazioak ekosisteman izugarri handitzen dira, bereziki itsas ekosisteman. Gainera, nahiz eta kutsadura non dagoen identifikatuta izan, euren eliminazioa nahiko zaila da, prozesu bortitzak erabili behar direlako^{8,9}.

ii) Oro har, hidrofoboak diren konposatuak dira, animalien gantzetan metatu eta kate trofikoan bioakumulatu eta biomagnifikatzeko joera dute. Biomagnifikazioa kate trofikoan zeharreko aurrekontzentrazioa izanik, gizakiotan kontzentrazio altuenak espero dira^{8,10}.

iii) Nahiko lurrunak dira eta, ondorioz, euren sakabanaketa handia da, izan atmosferan, izan itsasoan. Ezaugarri horren ondorioz, kutsadura puntuala izan beharrean, globala da, konponbidea zailagoa eta kalteak mundu mailakoak⁸. Azpimarratzekoa da POPak Artikoetan eta altitude handiko urrutiko zonaldeetan, hala nola, Alpeetan edo Pirinioetan aurkitu izan direla¹¹.

iv) Oso toxikoak dira, hainbat gaixotasun sor ditzakete eta kutsatzailearen arabera eraginak desberdinak dira. Adibidez, plagizida gisa 1945. urtean komertzializatu zen diklorodifeniltrikloroetanoa (DDT) gizakiongan nerbio-sistemako alterazioak eragiten ditu eta kartzinogeno gisa sailkatu du minbiziaren ikerkuntza nazioarteko agentziak (IARC-ak, ingelesezko *International Agency for Research on Cancer* delakoak)¹².

Esan bezala faktore guzti horiek POPak oso arriskutsuak izatea eragiten dute eta, ondorioz, irtenbide bat eman behar zaie⁸. Irtenbide hori bilatzeko asmotan 2001. urteko maiatzean Stockholm-eko hitzarmena idatzi zen Nazio Batuen ingurumenaren programaren barruan (UNEP, ingelesezko *United Nations Environment Programme* delakoak) eta 2004. urtean indarrean sartu zena. Espainia mailan urte horretako abuztuan sartu zen indarrean eta egun 92 herrialdeetan dago berretsita. Aipatzekoa da hitzarmen horrek kutsatzaile desberdinak, 12 zehazki, sailkatu zituela hiru taldetan, aldi berean konposatu horietarako onartzen ziren kontzentrazio maximoak ezarriz. A taldean euren erabilera edota produkzioa zuzenean eten behar diren konposatuak aurki daitezke eta euren adibide gisa plagizida diren aldrina edo klordanoa aurki daitezke. B taldean, ordea, produkzioa maila baxuetara mugatu eta posible izatekotan eliminatu behar diren konposatuak ditugu, DDT adibidez. Azkenik, C taldekoan iturri antropogenikoen bidez eta prozesu desberdinetan albo produktu gisa sortzen direnak. Ahal den neurrian, euren

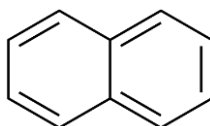
minimizazioa eta eliminazioa bideratzen da. Azken hauen adibide dira, dibenzo-p-dioxina polikloratuak (PCDDak) edo dibenzofurano polikloratuak (PCDFak)⁸.

Stockholm-eko hitzarmeneko 12 POPak hurrengoak dira: aldrina, endrina, klordanoa, DDT, dieldrina, heptakloroa, mirexa, toxafenoa, hexaklorobentzenoa (HCB) eta bifenilo polikloratuak (PCBak), PCDDak eta PCDFak¹³. 2004. urtetik hona beste 19 konposatu edo familia gehitu dira hitzarmenean, haien artean lindanoa (2009) eta azido perfluorooktanoikoa (2019)¹⁴.

Konposatu organiko iraunkorren artean badaude beste bi familia garrantzitsu, hidrokarburo poliziklikoak aromatikoak (PAHak) eta polibromodifenil eterrak (PBDEak). PBDE familiako 209 isomeroetatik Stockholm-eko hitzarmenean tetrabromodifenilo eterrak (TetraBDEak), pentabromodifenilo eterrak (PentaBDEak), hexabromodifenilo eterrak (HexaBDEak), heptabromodifenilo eterrak (HeptaBDEak) eta dekabromodifenilo eterra (BDE-209) sartuta daude 2009. urtetik aurrera. PAHak, aldiz, oraindik ez dira Stockholm-eko hitzarmenean gehituak izan, nahiz eta euren kontzentrazio maximoa bai dagoen erregulatuta (CE) N^o 850/2004 araudiaren arabera⁸.

1.2.1 Hidrokarburo polizikliko aromatikoak (PAHak)

Hidrokarburo polizikliko aromatikoak konposatu organikoen familia bat da, bi eraztun aromatiko edo gehiago fusionatuta dituztenak. Euren adibide sinpleena naftalenoarena da (ikus 1. irudia). Lau eraztuneko edo gutxiagoko PAHak arinak bezala sailkatzen diren bitartean, lautik gorakoak astunak bezala. Arinen toxikotasuna astunena baino txikiagoa izaten da eta, orohar, PAHak ez dira uretan ondo disolbatzen hidrofoboak baitira¹⁵.



1. irudia. Naftalenoaren egitura kimikoa.

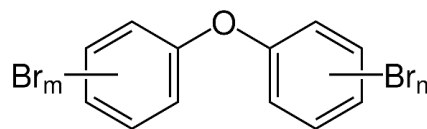
PAHen eraketa materia organikoaren errekontza osagabetik dator, hala nola, gasolina, petrolio edota tabakoren errekontzatik. Jatorria bi taldetan bana daiteke,

antropogenikoa edo naturala. Jatorri naturalekoak, hala nola, sumendi-erupzioak, baso-suteak... arbuigarriak dira. Aldiz, jatorri antropogenikoak geroz eta nabariagoak dira eta adibide argia gasolinaren/dieselaren errekuntzatik askatutako PAHak ditugu. Azken kutsadura hori batez ere hiriguneetan non kotxeen zirkulazioa handia den behatzen da. Konposatu hauen beste iturri batzuk hondakinen errausketa, plagiziden industria, ziklo konbinatuko zentralak... ditugu^{16,17}.

PAHen toxikotasuna jakina da, baina efektuak desberdinak izan daitezke konposatuaren, esposizio-bidearen edota esposizio-denboraren arabera. Esposizio labur baten ondorioz zefaleak, zorabioak eta arnas gutxiegitasuna aurki daitezke, besteak beste, eta esposizio kronikoak hepatotoxikotasuna, kartzinogenesisia edo teratogenesisia ekar dezakete^{15,18}.

1.2.2 Polibromodifenil eterrak (PBDEak)

Polibromodifenil eterrak konposatu organikoen familia bat da, zeinetan eter lotura baten bitartez bi fenilo lotzen diren. PBDE isomeroen arteko desberdintasuna bromo kopuruan eta eraztunean duten kokapenean datza (ikus 2. irudia)¹⁹.



2. irudia. PBDEn egitura molekular orokorra.

Konposatu hauen erabilera nagusia su-atzeratzaile gisa da eta polimeroetan gehigarri gisa aurkitzen dira. Ondoren, polimero horiek zirkuitu elektrikoetan, arropetan... erabiltzen dira. Su-atzeratzaile gehiago dauden arren, hala nola, fosforoan oinarritzen direnak, konposatu bromatu hauek dira gehien bat erabiltzen direnak nahiko merkeak direlako^{20,21}.

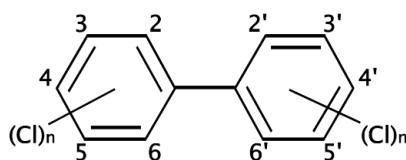
PBDEak oso sakabanatuta daude eta ohikoak dira itsas ekosistemetan aurkitzea. Ondorioz, gizakion esposizio-bide ohikoena aho bidezkoa da. Aipatzekoa da konposatu hauek disruptore endokrinoak (ECDak) direla, hau da, sistema hormonalean eragiten dituzte aldaketak eta gizakion sistema erreproduktibo eta immunologikoa aldatzen dutela. Zehazki hormona tiroideoari eragiten diotela ikusi

da. Horretaz aparte, kartzinogenoak direla ere ikertu da, ADN molekulara kobalentekei lotuz mutazioak eraginda²².

Aipatu beharrekoa da PBDEak metabolismo berezia izan ohi dutela, eter lotura oso erraz apurtzen delako hidrolisi bidez. Modu horretan gehien bat bromofenolak dira aztergai diren metabolitoak eta giza gorputzean aurki daitezkeenak²³.

1.2.3 Bifenilo polikloratuak (PCBak)

Bifenilo polikloratuak konposatu organikoak dira, bi fenilo funtzio-talde lotuta dituztenak eta horien zenbait hidrogeno atomoak kloro atomoez ordezkaturak dauden. (ikus 3. irudia). Kloro atomoen ordezkapenaren arabera 209 molekula ezberdin existitzen dira, PCBen familia osatzen dutenak²⁴.



3. irudia. PCBen egitura molekular orokorra.

PCBen ezaugarrien ondorioz, ez-sukoiak eta konstante dielektriko altuak, hainbat industria eta aplikazioetan erabiliak izan dira, besteak beste, isolatzaile dielektrikoetan, kondentsadore elektrikoetan, transformadoreen fluidoetan, tintetan, plastikoetan... Estimatzen da PCB nahasteen 1 miloi tona baino gehiago ekoiztu izan direla 1920. urtetik aurrera. 1980. urtetik aurrera euren kutsadura handia zela ikusita, erabilera debekatu egin zen hainbat herrialdetan. Nahiz eta egun oraindik badauden hainbat herrialde non euren erabilera ohikoa den²⁴.

Estatu Batuetako ingurumen babeserako agentziak (EPAk, ingelesezko *Environmental Protection Agency* delakoak) konfirmatu duen moduan, konposatu horiek kartzinogenoak eta teratogenikoak dira. Gainera ikusi da ama-esnean egon badaudela eta horrek umeen, zeintzuek sistema immunologikoa garatu gabea duten, koefiziente intelektualaren murriztea, sistema immunologikoaren depresioa eta azal gaixotasunak eragin ditzaketeela²⁵.

1.3 KUTSATZAILE ORGANIKO IRAUNKORRAK GERNUAN: I/II-FASEKO METABOLITOAK

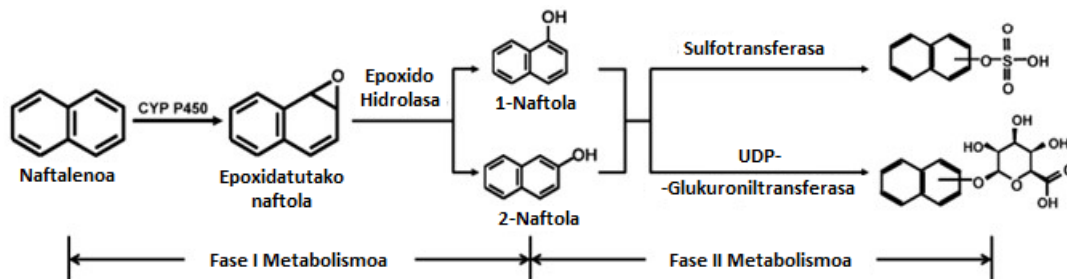
Kutsatzaile organiko iraunkorrekiko esposizioa ohikoa da eta esposizio hori bide ezberdinetakoa izan daiteke. Ohikoenak aho bidezkoa (dietaren bitartez) eta arnas bidezkoa dira (aire kutsadura). Baina badaude ere azal, begi edota bide parenteralarekiko esposizioak, horiek askoz neurri txikiagoan ematen badira ere²⁶. Gaur egun dakigu kutsatzaile horiekiko esposizioa beste bide batzuetatik ere eman daitekeela, hala nola, ama-esnearen eta plazentaren bidez. Azken esposizio horiek oso arriskutsuak dira; izan ere, kutsatzaileak fetura edo jaioberrira heltzen dira eta horiek oraindik sistema immunologikoa garatu gabe dutenez kalteak areagotu egite dira^{27,28}.

Behin konposatu kimikoa barneratuta, horien garraio eta sakabanaketa emango da, ohikoena sistema linfatiko edo odol sistemaren bidez. Ostean bi bide jarraitu dezake konposatu xenobiotikoak, metatzea (ehun adiposo edo osteozitoetan), edota metabolizatzea. Metabolismoari dagokionez, hainbat erreakzio gerta daitezke, bi fasetan bereiztu daitezkeenak.²⁹.

I. faseko metabolismoan konposatu xenobiotikoen, kasurako POP kutsatzaileen, hidrofilitatea handitzea da helburu. Oro har, POPak konposatu lipofilikoak dira, gorputza, aldiz, % 80an urez osotuta dago. Beraz, POPen garraioa edota eliminazioa faboratzeko lehenik polartasuna handitu behar da. Horretarako hainbat erreakzio ezberdin aurrera jarraitzen ditu gorputzak, hala nola, talde polarrekin funtzionalizatu (-OH, -SH...) edota metil taldeak kendu (-CH₃...), besteak beste. Dena dela helburua beti da konposatuaren polartasuna handitzea modu berean hidrosolugarriagoa izateko. Erreakzio horietaz arduratzen den entzima P450 zitokromoa da (CYP P450), erretikulu endoplasmatikoa aurkitzen dena^{29,30}.

II. faseko metabolismoaren helburua antzekoa da, hidrosolugarritasuna areagotu konposatu xenobiotikoen eliminazioa faboratzeko. Modu horretan konjugazio erreakzio baten bitartez aurretik funtzionalizatutako konposatuari, espezie endogeno bat lotzen zaio. Azken horien artean glutatona, sulfatoa, azetiloa edo azido

glukuronidoa daude, guztiak molekula polarrak. Eratzen diren bigarren faseko metabolito ohikoena glukuronidoak dira, hau da, azido glukuronidoarekin erreazionatuz sortzen direnak (ikusi 4. irudia)^{31,32}.



4. irudia. Naftaleno PAH-aren I eta II. faseko metabolismoaren eskema orokorra.

Azkenik irazketa gertatzen da eta biderik ohikoena gertatzen da. POPEi dagokionez, gertatzen I. eta II. faseko metabolitoak aurkituko dira kontzentrazio altuenean eta, ondorioz, kutsatzaile horiekiko esposoma aztertzekeo lagin oso interesgarria da²⁹.

1.4 KUTSATZAILE ORGANIKO IRAUNKORREN ANALISIA

1.4.1 Laginketa eta biltegitratzea

Analitoa eta matrizearen natura, bai laginketan, zein biltegitratzean kontuan hartu beharreko aldagaiak dira, azken analisian egon daitezkeen erroreen iturri izan baitaitezke. Horretarako, neurri egokiak jarri behar dira kutsadura ekidin eta analitoen egonkortasuna ziurtatzeko³³.

Gertuaren laginketari dagokionez, estrategia ezberdinak aurrera eramane daitezke, hala nola, laginketa puntuala edo 24 orduko laginketa. 24 orduko laginketa batean ohikoa da gertu batzea, adibidez 3 orduko. Prozedura hori nahiko deserosoa izan daiteke, batez ere lagin handiko ikerketen kasuan. Ondorioz, ohikoagoa izaten da laginketa puntuala aplikatzea, non orokorrean ordu zehatz batetako (goizaldekoa, gauekoa...) gertu lagintzen den. Populazio handiko ikerketetan ikusi den moduan, gomendagarriena da goizaldeko lehen gertu batzea, horretan konposatuen kontzentrazioa altuagoa baita³³⁻³⁵.

Biltegitratzeari erreferentzia eginda, kutsatzaile motaren arabera espezifiko da. POP kutsatzaileen kasuan nahikoa da gertu polipropilenoazko ontzietan batu eta

izozkailuan gordetzearekin, modu horretan konposatuen degradazioa ekiditen baita³³⁻³⁵.

1.4.2 Hidrolisi entzimatikoa

Konposatuen metabolismoa aztertzean ikusi izan da nola hauek I. eta II. Faseko erreakzioak jasaten dituztela, batez ere euren eliminazioa gerneru bidetik errazteko asmoarekin. POPEk I. faseko erreakzioak pairatzen dituzte, hidroxilazioa ohikoena izanda, eta behin hidroxilatuta glukuronizazioa eta neurri txikiago batean sulfatazioa. Parte bat glukuronido/sulfato bezala aurkituko denez, hidrolisi entzimatikoa beharrezkoa da kutsatzailearen kontzentrazioa osoa determinatzeko. Zehazki, II. faseko metabolismoan molekulari lotzen diren espezie endogenoak (azido glukuronido, sulfatoa...) hidrolizatzea eragingo da³⁶.

Hidrolisi mota desberdinak daude baina azidoak eta baseak dira gehien bat erabili izan direnak gaur egun arte; hidrolisi entzimatiakoaren aurrean. Hidrolisi azidoek eta basikoek badituzte abantailak hidrolisi entzimatiakoaren aurrean, oso bizkorrak baitira. Aldiz, ez dira bate ere espezifikokoak loturekiko eta, ondorioz, POP metabolitoen edozein lotura hidroliza dezakete eta albo-produktuak lortu. Hori gutxi balitz hidrolisi azido eta basikoen baldintza bortitzetan konposatuen degradazioa gerta daiteke³⁷. Horregatik 1. taulan ikus daitekeen moduan, egun geroz eta gehiago hidrolisi entzimatikoa da II. faseko metabolitoen hidrolisirako erabiltzen dena.

Hidrolisi entzimatikoa espezifikoa da. Kasurako β -glukuronidasa entzima erabiltzen da zeinak zehazki POP metabolitoetan glukuronidoaren lotura hidrolizatzen duen. Esan beharrezkoa da askotan β -glukuronidasaz aparte arilsulfatasa entzima ere gehitzen dela, esan bezala sulfato moduko metabolitoak ere aurki daitezkeelako. Hidrolisi entzimatiakoaren desabantaila bat inkubazio-denbora luzeak (2-12 ordu) dira. Gainera, aplikatu beharreko baldintzak ere oso zehatzak dira bestela entzimaren eraginkortasuna asko txikitu daitekeelako. Kasurako β -glukuronidasa entzimarako baldintza egokienak pH 4.5-5 bitartean eta 37 °C-ko tenperaturan dira. Aldiz, arilsulfatasaren kasuan pHa 6.2 eta tenperatura 37,5 °C koa da³⁸. Gerneruaren pH nahiko aldakorra da, 5-8 bitartean egon daiteke eta horregatik disoluzio indargetzaile

baten erabilera beharrezkoa da. Gehien erabiltzen dena, nahiz eta tanpoi bat ez izan, amonio azetatoa da (NH_4OAc) da, lurrunkorra izanik POP metabolitoen analisirako ezin hobea baita. Ohikoa da baita entzimaren aktibitatea gelditzeko tenperatura edo pH-aren aldaketa bortitz bat egitea³⁹ (ikus 1. taula).

1.4.3 Garbiketa

Gernuaren konplexutasuna dela eta, garbiketa-urratsa ohikoa da. Garbiketaren helburua analitoaren berreskurapen altuenak lortzea da, matrize-efektu minimoarekin. Helburu horretaz aparte, aurrekontzentrazioa ere helburuetako bat izan daiteke, batez ere analitoak traza-mailan egon badaude. Garbiketa-teknikaren aukeraketa hainbat faktoreren menpekoa da, analitoaren eta matrizearen izaera edota analisi-teknika teknikaren araberakoa, besteak beste³⁴.

Garbiketa-teknika ohikoena fase solidoko erauzketa (SPE, ingelesezko *Solid Phase Extraction*) da. Gernua ur-matrizea izanda, alderantzizko faseko SPE da ohikoena, 1. taulako hainbat ikerketetan ikus daitekeen moduan. Haien artean silikari lotutako C18-zko fase solidoko kartutxoak nabarmentzen dira, OASIS-HLB motatakoen aurrean. Beste tekniken artean, likido-likido erauzketa (LLE, ingelesezko *Liquid Liquid Extraction*) dago, zeina hidroxilatutako konposatu organiko iraunkorren (OH-POP, ingelesezko *Hidroxilated Persistent Organic Pollutants*) polartasuna ikusita alternatiba egokia eta erabilia den (ikus 1. taula). Aipatzekoa da bromofenolen (Br-Ph) kasuan fase normaleko SPE ere erabili izan dela, hau likido-likido erauzketa baten ostean³⁴

1. taula. Gernuko POPen analisirako zenbait lanetan aurkitutako lan-baldintzak.

Analitoak	Gernu- bolumena	Entzima (bolumena)	1 tanpoia	Temperatura/ denbora	Garbiketa	Deribatizazioa	Analisia	Erref.
OH-PAH	2 mL	β -glukuronidasa /Arilsulfatasa (20 μ L)	NH ₄ OAz (1 M, 2 mL)	37 °C 17 h	<u>LLE</u> : Pentano/Tolueno (80:20)	Sililazioa 10 μ L BSTFA 60°C 30 min	GC-MS	40
Br-Ph	4 mL	β -glukuronidasa	HCl (6 M, 1 mL)	80 °C 50 min	<u>LLE</u> : 2 x 4 mL Hexano/MTBE (80:20) <u>SPE</u> : Silika Garbiketa: 4 mL Hexano Eluzioa: 6 mL Azetona	Sililazioa 50 μ L BSTFA 40°C 20 min	GC- MS/MS	41
OH-PAH	2 mL	β -glukuronidasa (10 mg)	NH ₄ OAz (1 M, 1 mL)	37 °C 18 h	<u>LLE</u> : 2 x 5 mL Pentano	Sililazioa 10 μ L MSTFA 60°C 30 min	GC- IDHMRS	42
OH-PAH	2 mL	β -glukuronidasa /Arilsulfatasa (20 μ L)	HCl (0.1 M, 0.5 mL) NH ₄ OAz (1 M, 1.5 mL)	37 °C 16 h	<u>SLE</u> : Eluzioa: 5 mL DCM/Hexano (30:70) Berreratzea: 0.4 mL MeOH	-	LC-MS/MS	43
OH-PCB	200 μ L	β -glukuronidasa /Arilsulfatasa (5 μ L)	NH ₄ OAz (0.1 M, 200 μ L)	37 °C Gau osoa	<u>SPE</u> : Turboflow C18-XL Eluzioa: 3 mL MeOH:MiliQ (97:3)	-	LC-MS/MS	44
OH-PCB	5 mL	β -glukuronidasa /Arilsulfatasa	HCl (0.5 M, pH 5) NH ₄ OAz (0.5 M, 5 mL)	37 °C Gau osoa	<u>SPE</u> : Sep-Pak Plus C18 Garbiketa: 8 mL MiliQ Eluzioa: 8 mL MeOH	0.5 mL Dimetil sulfatoa + 3.5 mL 3N KOH/Etanol 70°C 1 h	HRGC- HRMS	45
OH-PAH	5 mL	β -glukuronidasa /Arilsulfatasa (10 μ L)	NH ₄ OAz (100 mM, 10 mL) HCl (4 M, pH 5)	37 °C 16-20 h	<u>SPE</u> : Bond Elut-C18, 500 mg Garbiketa: 10 mL MiliQ + 10 mL MeOH:MiliQ (1:4) Eluzioa: 7.5 mL Hexano:MeOH (100:0.7) Berreratzea: 100 μ L MeOH	-	LC-MS/MS	46

Laburdurak: Br-Ph: Bromofenolak; BSTFA: 2,2,2-trifluoro-*N*-(trimetilsililo)azetimida; DCM: Diklorometanoa; GC: gas-kromatografia; HRGC-HRMS: bereizmen altuko gas-kromatografia bereizmen altuko masa-espektrometria; IDHMRS: bereizmen altuko masa-espektrometria isotopoen diluzioarekin; LC: likido-kromatografia; LLE: likido-likido erauzketa; MeOH: metanol; MiliQ: Ur desionizatua; MSTFA: *N*-Trimetilsilil-*N*-metiltrifluoroazetamida; MS/MS: tandem masa-espektrometria; MTBE: Metil tert-butil eterra; NH₄OAz: amonio azetato; OH-PAH: Hidroxilatutako hidrokarburo polizikliko aromatiko; OH-PCB: Hidroxilatutako bifenilo polikloratuak; SLE: Likido-likido erauzketa euskarriarekin; SPE: fase solidoko erauzketa.

1.4.5 Analisia

Gernuan POPak OH-POP eta hauen glukuronidoak aurkitzen dira batez ere. Hidrolisi entzimatiakoaren ostean, II faseko glukuronido metabolitoak I faseko OH-POPetara eraldatu eta OH-POPak analizatzen dira azken erazietan. Kontuan hartuta dauden POP familia ugariak eta familia bakoitzean aurki daitezkeen isomero kopurua, banaketa kromatografikoa beharrezkoa da. Oro har, gas-kromatografia (GC, ingelesezko *Gas Chromatography*) konposatu organiko apolarren analisirako aproposagoa den bitartean, likido-kromatografia (LC, ingelesezko *Liquid Chromatography*) polaritate tarte zabalagoetan aplikagarriagoa da. Gas-kromatografiaren lan-esparrua mugatuagoa den arren, konposatuak lurrunkorrak eta termikoki egonkorak izan behar dira, bere bereizmena eta eraginkortasuna handiagoa da^{47,48}. 2. taulan ikus daitekeenez, bai LC bai GC erabili izan dira OH-POPen analisian.

LCaren bidezko aplikazioetan C18 motako zutabeak erabili dira oro har. Fase mugikorrari erreferentzia eginda, ur-purua zein amonio azetatotan indargetutako fase mugikorrak erabili ohi dira, nahiz eta baldintza azido edo basikoak ere erabili diren⁴⁷. Zenbait lanek amonio fluoruroaren (NH₄F) erabilera ere proposatu dute, molekulen ionizazioa faboratzen baitu gas-fasean eta, ondorioz, sentikortasuna handitzen baita⁴⁹. Fase mugikorraren osagai organikoari dagokionez metanola nagusitzen da, azetonitriloa ere erabiltzen bada ere.

Detektagailuei dagokienez, konposatu organikoen determinazioan fluoreszentsia edota ultramore-ikuskorreko detektagailuak erabiliak diren arren, masa-analizatzailea da gaur egun erabiliena (ikus 2. taula) elektroesprai ionizazioa-iturria (ESI, ingelesezko *Electrospray ionization*) modu negatiboan erabilita⁴⁷. Horren arrazoia konposatuen identifikazioan eskaintzen duen ziurtasun gehigarria da. 2. taulan ikus daitezkeen bezala tandem masa-analizatzaileak (MS/MS) eta euren artean kuadropolo hirukoitzeko (QqQ) masa-espektrometro dira erabiltzenak. Tandem masa-espektrometriak apurketa-espektroan lortzen diren apurketa selektiboagoekin lan

egitea ahalbidetzen du, horrek dakarren espezifikotasun eta sentikortasun igoerarekin⁵⁰.

2. taula. Zenbait ikerketetan erabilitako analisi teknika desberdinen laburpena.

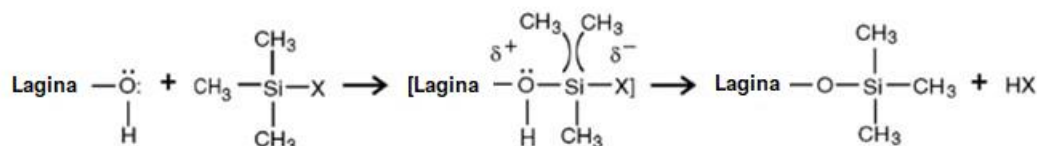
Analitoak	Injektorea	Zutabea	Fase mugikorra	Ionizazioa	Teknika	Erref.
OH-PAH	Splitless (270°C)	HP 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He gasa (0.9 mL/min)	EI (70 eV)	GC-MS	40
Br-Ph	-	HP 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He gasa (1 mL/min)	EI (70 eV)	GC- MS/MS	41
OH-PAH	Splitless (270°C)	DB 5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm)	He gasa (1 mL/min)	EI (50 eV)	GC- IDHMRS	42
OH-PAH	-	Eclipse-C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm)	A: MiliQ B: MeOH	ESI (-)	LC- MS/MS	43
OH-PCB	-	Kinetex PFP column (150 x 4.6 mm, 2.6 µm)	A: MiliQ B: MeOH	ESI (-)	LC- MS/MS	44
OH-PCB	-	Phenomenex Kinetex PS C18 (2.6 µm, 3x150 mm)	A: MiliQ (NH ₄ OAz 10 mM) B: AzN	ESI (-)	LC-HRMS	51
OH-PAH	-	Kinetex C18 column, (2.6 µm, 10x100 mm)	A: Milli-Q (% 0.1 NH ₄ OAz) B: MeOH	ESI (-)	LC- MS/MS	46

Laburdurak: ACN: Azetonitriloa; Br-Ph: Bromofenolak; EI: Elektroionizazioa; ESI: Elektroesprai ionizazioa; GC: Gas-kromatografia; HRMS: Bereizmen altuko masa-espektrometria; IDHMRS: Bereizmen altuko masa-espektrometria isotopoen diluzioarekin; ; LC: likido-kromatografia; MeOH: metanol; MiliQ: Ur desionizatua; MS/MS: tandem masa-espektrometria; MS: Masa-espektrometria; NH₄OAz: amonio azetato; OH-PAH: Hidroxilatutako hidrokarburo polizikliko aromatiko; OH-PCB: Hidroxilatutako bifenilo polikloratuak.

Gas-kromatografiari dagokionez, teknika hau ere oso erabilia da batez ere likido-kromatografiaren aurrean abantaila handi bat duelako, hain zuzen, isomero posizionalen desberdintzea. Beraz, GCaren bitartez 1-naftol eta 2-naftol isomeroak banatuta kuantifikatu daitezkeen bitartean, LCaren bitartez bien kontzentrazio osoa soilik lor daiteke⁴⁸. Aldiz, badu desabantaila bat, hain zuzen ere, deribatizazioa. Deribatizazioaren helburua analitoen lurrunkortasuna areagotzea da, GCaren bitartez neurtzeko ezinbesteko baldintza delako eta, 1. taulan ikus daitezkeen moduan, GCren bideko banaketan oinarritutako ikerketa guztietan erabili da.

POPen I. faseko metabolito ohikoenak diren OH-POPen natura kontuan hartuta, GCan ohikoak diren polidimetilsiloxano (PDMS) zutabeetan erretentzio egokia izateko aurretik aipatutako deribatizazio-urratsa beharrezkoa da, nahiz eta, zenbait kasutan, analitoen erretentzia faboratzeko, % 5 fenilo funtzio-taldea duten kromatografia-zutabeak erabili^{52,53}.

Deribatizazio moten artean batez ere sililazioa gailentzen da, alkilazio edo azilazioen aurrean gernuko OH-POPen analisisan. Kontuan hartu behar da alkilazio- eta azilazio-erreakzioak erauzketa baino arinago ur-giroan ematen diren bitartean, sililazio-erreakzioak erauzketa ostean giro anhidroan gertatzen direla. Gernuaren matrizearen konplexutasuna ikusita, 1. taulan bildutako aplikazio guztietan sililazioa erabili da. Erreaktibo gisa 2,2,2-trifluoro-*N*-(trimetilsililo)azetimida (BSTFA) edo *N*-Trimetilsilil-*N*-metiltrifluoroazetamida (MSTFA) erabiltzen dira batez ere. 1. taulan ikusi daitekeen moduan BSTFA da erabiliena. Aipatzekoa da kasurako bien nahasteak ere komertzializatu erabiltzen direla. Kasu guztietan hidroxilatutako konposatuak izanda, helburua -OH funtzio taldearen deribatizazioa da (ikusi 5. irudia)⁵³.



5. irudia. Sililazio-erreakzio orokorra.

Deribatizazio-baldintza ohikoenak 40-70 °C-ko tenperaturak eta 20-60 min bitarteko denborak dira⁵³.

Azkenik, detektagailuari dagokionez, LCn bezala masa-analizatzailea da gehien bat erabiltzen dena, beste detektagailuekiko eskaintzen dituen abantailak direla eta. Gainera, MS/MS analizatzailea ohikoa da selektibitate eta sentikortasuna handitzeko⁵⁰. Ionizazio-iturri gisa elektroien talka bidezko ionizazioa erabiltzen da ohiko baldintzetan (70 eV)⁴⁸.

2. HELBURUA

Kutsatzaile organiko iraunkorretarako (POPetarako) mugak jarri diren arren, eta geroz eta estrategia gehiago euren eliminaziorako badaude ere, oraindik gaur egun ingurunean ohikoak diren kutsatzaileak dira. Gainera, kate trofikoan bioakumulatu eta biomagnifikatu egiten dira, dietaren eta arnasketaren bitartez gizakiongan helduz. Ondorioz, gizakion esposomaren parte dira, alderdi oso garrantzitsua gizakion osasunean, ikerketa epidemiologikoei frogatu duten bezala. Beraz, POPen kopuru eta euren arriskua kontuan hartuta, gizakiok horiekiko dugun esposizioa ezagutzea beharrezkoa dirudi eta gertu horretarako matrize aproposa da. Guzti hori kontuan hartuta, lan honen helburua da gertuan kutsatzaile organiko iraunkorren biomarkatzaile gisa joka dezaketen eratorri hidroxilatuek aztertzei analisirako metodo analitikoak optimizatu eta berrestea. Aztertutako konposatu organiko iraunkorren eratorri hidroxilatuen (OH-POP-en) familiak honako hauek izan dira: hidrokarburo polizikliko aromatikoaren eratorri hidroxilatua (OH-PAH-ak), bifenilo polikloratuen eratorri hidroxilatuek (OH-PCB-ak) eta difenil eter polibromatuen eratorriak diren bromofenolak (Br-Ph-ak).

Helburu orokor hori lortzeko, honako azpi-helburuek finkatu dira:

1. Aztergai diren OH-POPen likido- zein gas-kromatografiaren bidezko banaketa eta masa-espektrometriaren optimizazioa.
2. Erauzketa- eta garbiketa-urratsen optimizazioa.
3. Garatutako metodoen berrespena.

3. ATAL ESPERIMENTALA

3.1 ERREAKTIBOAK ETA MATERIALA

Likido- zein gas-kromatografia metodoaren garapenean hainbat ama-disoluzio erabili dira. Hidroxilatutako hidrokarburo aromatiko poliziklikoen (OH-PAH-en) artean, 1-naftola, 2-naftola, 1-hidroxifenantrenoa, 2-hidroxifenantrenoa, 3-hidroxifenantrenoa, 4-hidroxifenantrenoa, 9-hidroxifenantrenoak, 1-hidroxipirenoa, 2-hidroxifluorenoa eta 9-hidroxifluorenoa. Bromofenolen (Br-Ph-en) artean 3-bromofenola, 4-bromofenola, 2,4-dibromofenola, 2,5-dibromofenola, 2,6-dibromofenola eta 2,4,6-tribromofenola daude. Azkenik, aztertutako hidroxilatutako bifenilo polikloratuak (OH-PCB-ak) 4-hidroxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa, 4-hidroxi-2',3,5'-triklorobifeniloa, 4-hidroxi-4'-klorobifeniloa, 3-hidroxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa eta 4-hidroxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa izan dira. Horietaz aparte trazagarriak ere erabili izan dira; 1-[²H₇]-Naftola, 1-[²H₉]-Hidroxipirenoa, 2,6-Dibromo-[²H₃]-fenola, 2,4,6-Tribromo-[²H₂]-fenola eta 4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro-[¹³C₁₂] bifeniloa. Azkenik, 1-hidroxipireno β-D-glukuronidoa eta 2-naftol sulfatoa II faseko metabolitoak ere erabili dira. Guzti horien ezaugarriak eta datu fisiko-kimikoak eranskinetako 1E. taulan bildu dira, merkataritza-etxearekin batera. Solido zein likido puru gisa erositako konposatuen disoluzio estandar bakunak prestatu dira 3000 mg·Kg⁻¹ inguruko kontzentrazioetan, disolbatzaile gisa azetona (% 99.9, ChromAR HPLC, MACRON) erabiliz. Salbuespen modura, 2-naftil sulfatoa zeina dimetil sulfoxidotan (DMSO-tan, % 99.9, Honeywell) prestatu da azetonatan duen disolbakortasun eskasa dela eta. Horrez gain, tarteko disoluzio estandarrak ere prestatu dira 100 mg·Kg⁻¹ inguruko kontzentrazioetan. Beste zenbait disoluzio estandar 100 edo 50 mg·Kg⁻¹-ko kontzentrazioan prestatuta erosi dira (ikus 1E. taula). Aipatutako estandar horietatik abiatuz, analito guztien nahaste disoluzioak prestatu dira beharrezkoak diren kontzentrazio desberdinetan, esperimentuen beharrezkoen arabera. Prestatutako disoluzio guztiak -20 °C-an gorde dira.

Gernuaren hidrolisian baldintza optimoak ziurtatzeko beharrezkoa den amonio azetato disoluzioa (1 mol·L⁻¹, pH 5) prestatu da amoniako (NH₃, % 25 b/b, Panreac) eta azido azetiko (CH₃COOH, % 100, Supelco) errektiboetatik abiatuta. Horretaz

aparte, β -glucuronidasa/arylsulfatasa entzima (Helix Pomatia-atik lortua , Sigma-Aldrich) ere erabili da. Azkenik, hidrolisia gelditzeko fosfato ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 2) disoluzio indargetzailea prestatu da azido ortofosforiko (H_3PO_4 , % 85, Panreac) eta sodio hidroxido (NaOH , $\geq 98 \%$, Honeywell) errektiboetatik abiatuta.

Laginen erauzketa zein garbiketarako bi aurretratamendu desberdin egin dira. Alde batetik, likido-likido erauzketari (LLE-ari) dagokionez hurrengoak dira erabilitako disolbatzaileak: metil *tert*-butil eterra (MTBE, % 99.8, LAB-SCAN analytical sciences), hexanoa (% 95, ChromAR HPLC, MACRON), toluenoa (% 99.8, ChromAR HPLC, MACRON) eta isopropanola (IPA, % 99.8, LAB-SCAN analytical sciences). Bestetik, fase solido bidezko erauzketaren (SPEaren) kasuan beharrezko disolbatzaileak hurrengoak izan dira: hexanoa, azetona, metanol anhidroa (MeOH, ChromAR HPLC, MACRON), MiliQ ura (H_2O , $< 0.05 \mu\text{S}/\text{cm}$, Millipore 185, Millipore), DMSO eta pH 2-an doitutako fosfato tanpoia ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

LLE burutzeko falkonak (15 mL, Agilent Technologies) eta vortexa (Heidolph) erabili dira. Ondoren, bi faseen arteko interfase garbia lortu ez den kasuetan, zentrifugatzailea (Eppendorf, 5804R) erabili da. SPE burutzeko, Oasis HLB (6 mL, 200 mg, $30 \mu\text{m}$, Waters), silika (6 mL, 1 g, $55 \mu\text{m}$, phenomenex) zein Florisil (6 mL, 1g, $30 \mu\text{m}$, Sigma-Aldrich) kartutxoak erabili dira. Erauziak lurruntzeko nitrogenoa (N_2 , % 99.999, Air Liquide) TurboVap LV (Caliper) lurrungailuan erabili da. Likido-kromatografiatik (LCtik) analizatutako erauziak polipropilenoazko iragazkiekin ($0.22 \mu\text{m}$, Phenomenex) iragazi dira. Gainera, fase mugikor gisa, Milli-Q ura (UHPLC kalitatea) eta metanol optimoa (% 99.9, UHPLC-MS, Scharlab) erabili dira. Ionizazio-moduaren arabera A eta B botiletan % 0.1 HCOOH (pH 3, ionizazio positiboa) edo % 0.05 NH_4OH (pH 10, ionizazio negatiboa) gehitu dira. Gas-kromatografiatik (GCtik) analizatzen diren laginen kasuan, *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroazetamida-trimetilklorosilano (BSTFA-TMCS, 99:1, Sigma-Aldrich) errektiboa deribatizatzaile gisa erabili da. Bestalde, gas garriatzailea helioa izan da (He , %99,999).

Azkenik, gernu sintetikoa prestatzeko hurrengo errektiboak erabili dira; potasio kloruroa (KCl , % 99, Panreac), sodio kloruro (NaCl , % 99, Merck), urea (≥ 99 , Sigma-

Aldrich), azido zitrikoa (% 99, Merck), azido askorbikoa (% 99, Analar NORMAPUR), potasio fosfata (K₃PO₄, ≥ % 98, Sigma-Aldrich), kreatinina (anhidroa, ≥ % 98, Sigma-Aldrich), sodio hidroxidoa, sodio bikarbonatoa (NaHCO₃, ≥ % 99, Merck) eta azido sulfurikoa (H₂SO₄, % 95, Merck).

3.2 GERNU SINTETIKOA ETA GERNU LAGINAK

Likido- zein gas-kromatografiaren bidezko metodoaren berrespena egiteko gernu sintetikoa erabili da. Hurrengo errektiboak erabili dira: 3.8 g potasio kloruro, 8.5 g sodio kloruro, 24.5 g urea, 1.03 g azido zitriko, 0.34 g azido askorbiko, 1.18 g potasio fosfato, 1.4 g kreatinina, 0.64 g sodio hidroxido, 0.47 g sodio bikarbonato eta 0.28 mL azido sulfuriko. Errektibo nahastea 500 mL Milli-Q uretan disolbatu da, ondo irabiatuta 60 minutuz⁵⁴.

Erauzketa- eta garbiketa-urratsak optimizatzeko, bolondresengandik lortutako gernu-lagin errealak erabili dira. Horretarako 10 gernuak erabili dira. Lagin errealak UPV/EHUaren etika eta agente biologiko eta genetikoki eraldatutako organismoekin lan egiteko batzordeek onartutako protokoloen arabera (CEISH-UPV/EHU, BOPV 32, 17/2/2014 M10 2021 124 eta CEIAB-UPV/EHU, BOPV 32, 14/2/14, M30 2021 158) kudeatu dira. Laginak izozkailuan - 20 °C-ra gorde dira euren analisis aurrera eraman den arte.

3.3. HIDROLISI ENTZIMATIKOA

1 mL gernuri 20 µL β-glukuronidasa entzima eta 200 µL NH₄OAz disoluzioa (1 mol·L⁻¹, pH=5) gehitu dira. Ostean, labean 37 °C-ra sartu eta gau osoan zehar mantendu dira laginak. Ondoren, hidrolisi entzimatikoa eten da 2 mL fosfatoko tanpoiarekin (0.5 mol·L⁻¹, pH=2).

3.3 GARBIKETA

Erauzketa- eta garbiketa-urratsak optimizatu dira lan honetan; horretarako, LLE eta SPE teknikak aurrera eraman dira. Hurrengoak dira aurrera eramandako protokolo ezberdinak.

a) Alderantzizko faseko fase solido bidezko erauzketa (RPSPE)

Garbiketarako lehen protokolo honetan hidrolisi entzimatikotik lortutako hidrolizatua edo hidrolizatu gabeko 1 mL gernu 200 mg-ko Oasis-HLB kartutxoaren bidez garbitu da aurretiaz ikerketa-taldean optimizatutako protokoloa erabilia⁵⁵. Hidrolizatu gabeko gernuaren kasuan 2 mL fosfatoko tanpoi ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=2) gehitu zaizkio, ingurune baldintzak hidrolizatutako laginen bezalakoak izateko. Aktibazioa aurrera eramateko, 5 mL MeOH:azetona (50:50 bolumenetan) gehitu da Oasis-HLB kartutxora. Segituan eta fase solidoa orekatzeko asmoarekin, 5 mL fosfato tanpoia ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 2) gehitu eta, ostean, gernu-lagin hidrolizatua edo hidrolizatu gabea kargatu da. Garbiketarako 5 mL Mili-Q:MeOH (95:5 bolumenetan) erabili da eta kartutxoa ponpa baten laguntzaz ondo lehortzen utzi da. Azkenik, 5 mL MeOH:Azetona (50:50 bolumenetan) erabiliz eluzioa aurrera eraman da eta erauziak silinizatutako saio-hodietan batu dira. Erauziei 50 μL DMSO gehitu zaizkie lurrunketa moteltzeko eta erauziak guztiz lurruntzen utzi dira N_2 korrontean eta $40 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra dagoen ur-bainua duen Turbovap lurrungailuan, 10 psi-ko presio maximoan. Erauziak DMSO tantarekin geratu ostean, 150 μL Mili-Q:MeOH (2:1 bolumenetan) gehitu, vortex-ean irabiatu eta berreratutako laginaren masa pisatu da.

b) Likido-likido erauzketa (LLE)

Garbiketarako bigarren protokolo honetan hidrolisi entzimatikotik lortutako erauziak edo 2 mL fosfato tanpoiarekin ($0.5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH=2) egokitutako 1 mL gernu hidrolizatu gabeak erauzteko bi disolbatzaile ezberdin erabili dira: hexanoa:MTBE (80:20 bolumenetan) eta hexanoa:tolueno (80:20 bolumenetan). Disolbatzailea edozein dela, hidrolisi entzimatikotik lortutako hidrolizatua edo hidrolizatu gabeko gernu indargetua bi aldiz erauzi da erauzketa bakoitzean 3 mL disolbatzaile garbi erabilia. Erauziak konbinatu eta euren gainean 1 mL IPA gehitu da lurrunketa moteltzeko. Erauzia 0.5 mL ingurura arte lurrundu da nitrogenoa erabilia baina ur gabeko TurboVap lurrungailuan $40 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra eta 10 psi-ko presio maximoan. Lurrungailuaren bainuari ura kendu behar zaio, garbiketa-protokolo horretatik lortutako erauziak aurrerago baldintza anhidrotan deribatizatuko direlako.

c) Fase normaleko fase solido bidezko erauzketa (NPSPE)

Zenbait esperimintutan LLEtik lortutako erauziei NPSPE bidezko garbiketa ezarri zaie. Bi kartutxo mota probatu dira, Florisil eta silika, baina urrats guztiak (egokitzea, karga eta eluzioa) modu berdinean eraman dira aurrera. Kartutxoak 5 mL hexanotan egokitu eta, ondoren, laginaren 500 µL-ak kargatu dira. Ondoren, kartutxoak 5 mL hexanotan garbitu eta, azkenik, analitoak 5 mL azetonatan eluitu dira. Eluatoari 1 mL metanol gehitu zaio lurrunketa moteltzeko. Hain zuzen, eluatoa 1 mL ingurura arte nitrogenotan lurrundu da berriz ere ur gabeko TurboVap lurrungailuan eta 40 °C-ra eta 10 psi-ko presio maximoan. Ostean, kromatografia-bialetara transferitu da eluato kontzentratua eta bertan lehorrera eraman da lagina.

3.4 DERIBATIZAZIOA

Deribatizazioa bakarrik izango da beharrezkoa baldin eta laginak GCtik analizatuko diren. Kasurako LLE bakuna ala LLE gehi NPSPE egiten diren protokoloen kasuan. Kasuan kasuko lortutako azken erauziak kromatografiako ontzitxoetara pasatu eta, bertan, guztiz lehortzen utzi eta sililatzaile gisa jokatzen duen BSTFA-TMCS (99:1) deribatizatzailea gehitu da. Deribatizatzailearen eta ko-disolbatzaile bezala erabili den hexanoaren bolumenak optimizatu dira. Aztertutako deribatizatzaile- eta hexano-bolumenak hurrengoak dira, hurrenez hurren: 150 µL + 0, 125 µL + 25 µL, 100 µL + 50 µL, 75 µL + 75 µL, 50 µL + 100 µL eta 25 µL + 125 µL. Ondoren, deribatizazioa labean aurrera eraman da 50 °C-an 30 minutuz.

3.5 ANALISIA

a) GC-MS bidezko analisia

Deribatizatutako erauzien analisia gas-kromatografia-masa-espektrometria (GC-MS) erabiliz egin da. Erabilitako gas-kromatografoak (Agilent Technologies 7890A) injektore automatikoa (Agilent Technologies 7683B) du eta Agilent Technologies 5975C inert XL MSD masa-espektrometroari hibridatuta dago.

Lortutako erauzien 2 µL gas-kromatografoan injektatu dira banaketa gabeko moduan 270 °C-ra. Erabilitako zutabe kapilarra HP-5MS motatakoa (30 m x 250 µm x 0.25 µm)

izan da. Helioaren fluxua $1.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ konstantean mantendu eta analitoen banaketa emateko erabilitako temperatura-programa optimoa hurrengoa izan da: $80 \text{ }^\circ\text{C}$ (0.5 min), ondoren $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ malda $215 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra arte, non 5 minutuko isoterma ezarri den, ostean $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ maldarekin $300 \text{ }^\circ\text{C}$ -ra berotu arte eta 10 minutuz mantenduta temperatura horretan. Kromatograma osoaren iraupena 35.5 minutukoa izan da. Masa-espektrometroak elektroita erabili du ionizazio-iturri gisa 70 eV -etara eta interfasea $320 \text{ }^\circ\text{C}$ -an mantendu da. Masa-espektroen interpretaziorako NIST (2017) liburutegia erabili da.

Lortutako datuen tratamenduarako bi programa erabili dira, *MassHunter GCMS translator* (Agilent) datuen itzulpena egiteko eta, ondoren, *MassHunter Quantitative Analysis 10.0* (Agilent) emaitzen tratamendu kuantitatiborako.

b) LC-MS/MS bidezko analisia

Deribatizatu gabeko erauzien analisia likido-kromatografia-kuadropolo hirukoitzeko masa-espektrometria (LC-MS/MS) bidez aurrera eraman da. Erabilitako ponpa binariodun likido-kromatografoa ultraeraginkortasuneko Agilent 1290 Infinity II izan da 6430 Triple Quad (Agilent) tandem masa-espektrometroari lotuta. Horretaz gain, ekipoak fase mugikorrerako desgasifikatzailea eta injektore automatikoa ere baditu.

Lortutako erauzien $5 \mu\text{L}$ injektatu dira UltraCore Super C18 UHPLC (Avantor, Symta) aurrezutabea duen ACE UltraCore 2.5 SuperC18 ($2.1 \text{ mm} \times 100 \text{ mm}$, $2.5 \mu\text{m}$) zutabe kromatografikoan. Banaketa $0.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ -ko fluxuarekin egin da $35 \text{ }^\circ\text{C}$ -an. Fase mugikorrari dagokionez, A botilan Milli-Q ura eta B botilan, metanol optimoa erabili dira. Analitoen banaketa optimoa lortzeko hurrengoa da egindako gradientearen pH azidoan: fase mugikorraren % 20 B izatetik % 45 B izatera pasatu da 1.5 minututan. Ostean, fase mugikorraren konposizioa % 60 B-ra igo da 3.5 minututan eta berriz hortik % 90 B-era 7 minututan. Ondoren, % 90 B-an mantendu da beste 7 minutuz. Azkenik, hasierako konposizioa jaitsi da, hain zuzen % 20 B-ra 3 minututan. Azken konposizio horretan 3 minutuz mantendu da zutabearen berorekatzea bermatzeko. pH basikoari dagokion gradiente optimoa hurrengoa da: fase mugikorraren % 10 B minutu batez mantendu da. Gero, % 30 B izatera pasatu da 1 minututan. Ostean, fase

mugikorraren konposizioa % 50 B-ra igo da 2.5 minututan eta berriz hortik % 55 B-era 1.5 minututan. Ondoren % 60 B-ra igo da 2 minututan eta % 90 B-ra 3 minututan. Azken konposizio horretan 8 minutuz mantendu da. Azkenik, hasierako konposizioara jaitsi da, hain zuzen, % 10 B 3 minututan. Azken konposizio horretan 3 minutuz mantendu da zutabearen berorekatzea bermatzeko.

Detekzioan erabilitako ionizazio-iturria elektroesprai (ESI) izan da. Kasu honetan kapilarraren boltaia 3000 V-koa izan da, ionizazio negatibo zein positiboan. Disolbatzailea desolbatatzeko nitrogenoa erabili da 12 L·min⁻¹-eko lehortze-fluxuarekin. Azkenik, gasaren tenperatura 350 °C eta lainoztatze-presioa 30 psi izan dira.

Analisa Dynamic MRM (DMRM, ingelesezko *Dynamic Multiple Reaction Monitoring*) eskuratzeko moduan eraman da aurrera. Kuantifikaziorako pH bakoitzean eraturako DMRM metodoak 4.1.2 ataleko 5. eta 6. taulan ageri dira. Taula horietan aztertutako konposatuen erretentzio denborak (RT), ioi aitzindariak (m/z), ioi-produktuak (m/z), fragmentazio-boltaia, kolisio-energia eta ESI ionizazio-modua agertzen dira. Posible izan den kasuetan ioi-produktu bat baino gehiago jarraitu da, ugariena kuantifikaziorako eta besteak kualifikaziorako.

Lortutako datuen tratamendua, *MassHunter Workstation Software (Quantitative Analysis for QqQ, Version 10.0, Agilent)* programa erabiliz egin da.

3.6 BERRESPENA

a) LLE gehi NPSPE bidezko garbiketa eta GC-MS bidezko analisia

Analitoen kuantifikaziorako 13 kalibratio-puntuko kanpo kalibratua prestatu da. Beheko muga gisa kuantifikazio-muga instrumentalak (KM_{inst}) eta goi muga gisa 1000 ng·g⁻¹-ko kontzentrazioa jarri dira, kasu batzuetan goi muga baxuagoa izan bada ere, 500 ng·g⁻¹-koa. Kuantifikazio-muga instrumentalak kalkulatzeko kalibratuko puntu baxuenak, 0.01 ng·g⁻¹, 0.1 ng·g⁻¹, 1 ng·g⁻¹, 5 ng·g⁻¹, 10 ng·g⁻¹, 15 ng·g⁻¹, 20 ng·g⁻¹ eta 50 ng·g⁻¹, hiru aldiz injektatu dira. Prozeduraren kuantifikazio-mugei (KM_{proz}) dagokienez, KM_{inst} eta etekin absolutuak erabili dira (ikus aurrerago etekin absolutuen definizioa).

Kanpo kalibratuaz gain, matrizera doitzen den kalibratu bat ere eraiki da, 8 kalibrazio-puntukoa eta $0.01 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ behe muga eta $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ goi muga tartean.

Etekinak kalkulatzeko, lagin dopatuak gernu sintetikoan prestatu dira maila bakarrean analito guztietarako ($30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ean) Br-Ph-en kasuan izan ezik. Kasu horretan, sentikortasuna nabarmenki baxuagoa denez, $90 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ean dopatu dira. Aipatzekoa da 30 eta $90 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko kontzentrazioak gernuko hasierako kontzentrazioak direla. Prozeduraren errepikakortasunari dagokionez, lagin dopatuaren hiru erreplika egin dira. Gainera, hiru prozedura-zuri ere egin dira, prozesuaren kutsadura ezagutzeko. Lagin guztietan, dopatu zein zuri, trazagarriak (ikus trazagarrien zerrenda eranskinetako 1E. taulan) gehitu dira $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -eko kontzentrazioan gernuan. Berrespen guztia lagin hidrolizatuekin eta hidrolizatu gabekoekin egin da.

b) RPSPE bidezko garbiketa eta LC-MS/MS bidezko analisia

LC-MS/MS analisiari dagokionez, berrespina pH azido zein basikoan egin da. Analitoen kuantifikazioa egiteko 12 puntuko kanpo kalibratua prestatu da beheko muga gisa KM_{inst} eta goi muga gisa $500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko kontzentrazioa jarri delarik. Kuantifikazio-muga instrumentalak kalkulatzeko kalibratuko puntu baxuenak, $0.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $0.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $2.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $15 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ eta $25 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, hiru aldiz injektatu dira.

Berreskurapenaren kalkulua egiteko hiru mailatan ($1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ eta $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) dopatutako gernu sintetikoa erabili da. Prozeduraren errepikakortasuna determinatzeko, dopaketa maila bakoitzaren hiru erreplika egin dira. Horretaz aparte, hiru prozedura-zuri ere prestatu dira, prozesuko kutsaduraren ideia izan eta zuzenketa egiteko. Horretaz aparte, lagin guztietan trazagarriak gehitu dira, $15 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -eko kontzentrazioan. Berrespen guztia bikoiztuta egin da, bai hidrolizatutako zein hidrolizatu gabeko laginetan.

3.7 DATUEN TRATAMENDUA

KM_{inst} hurrengo bi irizpideak betetzen dituen kalibrazio-puntu baxuena bezala definitu da⁵⁶: 1) neurketa errepikatuen batz besteko kontzentrazioaren % errore sistematikoa (% EE) txikiago edo berdin % 35 izatea eta 2) desbideratze estandar erlatiboa (% DEE) txikiago edo berdin % 35 izatea. % EE eta % DEE 1. eta 2. ekuazioetan definitu dira, hurrenez hurren.

$$EE (\%) = \frac{\text{Bataz besteko kontzentrazioa}_{esp} - \text{Benetako kontzentrazioa}}{\text{Benetako kontzentrazioa}} \cdot 100 \quad (1. \text{ ekuazioa})$$

$$DEE (\%) = \frac{\text{Kontzentrazioen desbideratze estandarra}}{\text{Kontzentrazioen batzbestekoa}} \cdot 100 \quad (2. \text{ ekuazioa})$$

KM_{proz} KM_{inst} eta prozesu osoaren berreskurapena kontuan hartuta kalkulatu da.

Erauzketa prozesuen etekinen berreskurapenak 3. ekuazioaren arabera kalkulatu dira eta garbiketa-urratsen osteko matrize-efektua 4. ekuazioaren arabera. Azkenik, trazagarrien bidez zuzendutako etekinak kalkulatzeko 5. ekuazioa erabili da.

$$\text{Berreskurapena} (\%) = \frac{\text{Lortutako kontzentrazioa}}{\text{Benetako kontzentrazioa}} \cdot 100 \quad (3. \text{ ekuazioa})$$

$$\text{Matrize Efektua} (\%) = \left(\frac{\text{Seinalea matrizea}}{\text{Seinalea disolbatzaile puru}} - 1 \right) \cdot 100 \quad (4. \text{ ekuazioa})$$

$$\text{Berreskurapen zuzedua} (\%) = \frac{\text{Analitoaren berreskurapena}}{\text{Trazagarriaren berreskurapena}} \cdot 100 \quad (5. \text{ ekuazioa})$$

4. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

4.1 BANAKETA KROMATOGRAFIKOAREN ETA MASA-ESPEKTROMETRIAREN

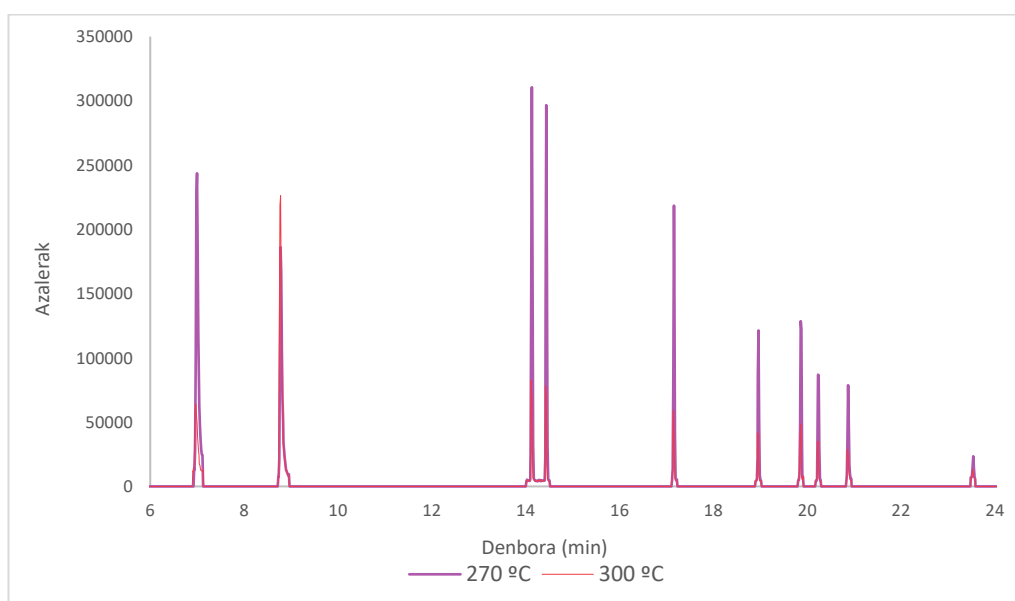
OPTIMIZAZIOA

4.1.1 GC-MS

Hasteko, intereseko analitoen jarraipen egokia egin ahal izateko gas-kromatografiako banaketaren optimizazioa egin da. Izan ere, baldintza kromatografikoen menpekoa izango da kromatogramaren bereizmena (R_s) eta, ondorioz, ez soilik analisi-denbora baizik eta analitoen detekzio- eta kuantifikazio-mugak ere. Atal honetan optimizatutako baldintzak hurrengoak dira: Injekzio-tenperatura, laborearen hasierako

temperatura eta temperatura-gradientea. Ondoren, behin baldintza kromatografikoak zehaztuta, detekzioaren optimizazioan aukeratutako ioien monitorizazio (SIM edo ingelesezko *selected ion monitoring* delako) metodoa eratu da. Proba guztia horiek OH-PAH, OH-PCB eta Br-Ph guztiak (ikus eranskinetako 1E taula) erabiliz egin dira 15 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ kontzentrazioan eta analitoak deribatizatu ostean. Salbuespen modura injekzio-temperatura, OH-PAH-ekin bakarrik optimizatu den.

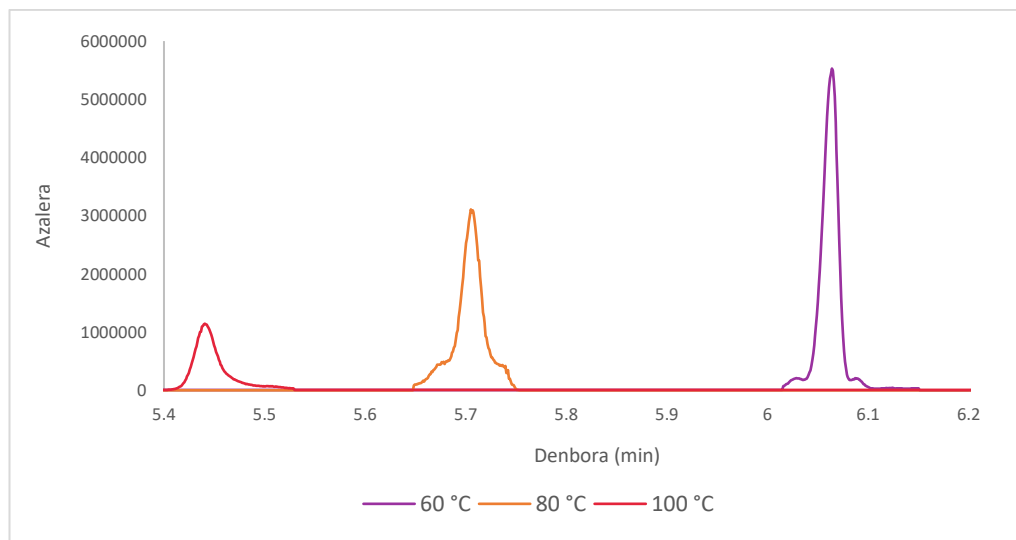
Injekzio-temperaturari dagokionez, 270 °C eta 300 °C temperaturak aztertu eta 6. irudian gainjarritako kromatogramak bildu ditugu.



6. irudia. 270 °C eta 300 °C injekzioko-temperaturetara lortutako OH-PAH-en kromatograma gainjarriak.

6.irudian ikusi daitekeen moduan, orohar, injekzioko-temperatura 300 °C-ra igota, azalaren murrizketa nabarmena dago eta joera hori kromatograma osoan zehar eman da. Jaitsiera horren arrazoia analitoen degradazioa gertatu izana temperatura altutan izan daiteke. Dena dela, argi dago injekzio-temperatura optimoa 270 °C dela.

Labearen hasierako temperaturari dagokionez, 60 °C eta 100 °C probatu dira eta 3-bromofenolaren kasuan lortutako emaitzak 7. irudiko kromatograman ikusi daitezke, eluitzen duen lehen konposatua izanik, labaren hasierako temperaturak eragin handiena izango baitu.



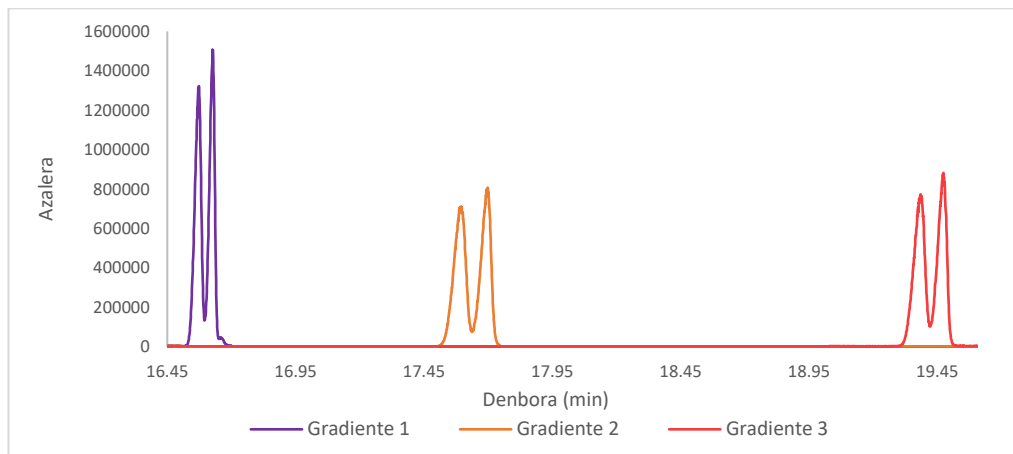
7. irudia. 100 °C eta 60 °C-ko labearen hasierako tenperaturetara lortutako kromatogramak 3-bromofenolerako.

Labearen hasierako tenperatura aldagai garrantzitsua da; izan ere, analitoen fokatze on baten giltzarria baita banaketa gabeko injekzioetan. Horrek batez ere goiz eluitzen duten analitoei eragingo die, hala nola, 3-bromofenolaren kasuan. Tenperatura jaisterakoan (60 °C), erretentzio-denborak luzatu egiten dira, baina modu berean, analitoen fokatzea zutabearen hobe da, gailur kromatografiko estuagoak lortuz eta eraginkortasuna (N) handituz. Bi aldagaiak kontuan hartuta balio optimoa bitarteko tenperatura dela pentsatu da, hain zuzen, 80 °C. Alde batetik eraginkortasuna hobetuko delako 60 °C-koarekiko eta bestetik kromatogramaren luzera ez da gehiegi handituko.

Temperatura-gradienteei dagokionez, hiru desberdin frogatu dira, batez ere koeluitzen duten 1-hidroxifenantrenoren eta 3-hidroxifenantrenoaren banaketa faboratzeko. Probatutako gradientean 3. taulan bildu ditugu eta 1-hidroxifenantreno eta 3-hidroxifenantrenorako lortutako kromatogramak 8. irudian.

3. taula. Frogatutako 3 gradiente ezberdinen zehaztasunak.

Gradiente 1			Gradiente 2			Gradiente 3		
Ranpa (°C/min)	T (°C)	Isoterma (min)	Ranpa (°C/min)	T (°C)	Isoterma (min)	Ranpa (°C/min)	T (°C)	Isoterma (min)
	80	0.5		80	0.5		80	0.5
10	310	10	10	215	5	10	200	5
			10	310	10	10	310	10



8. irudia. 1-Hidroxifenantrenoren eta 3-hidroxifenantrenoaren kromatograma gainjarriak.

8. irudian ikus daitekeen moduan, 1-hidroxifenantrenoaren eta 3-hidroxifenantrenoaren banaketa hobetzeko gradienteen gehitutako isotermei gailurren atzeratzea eta zabaltzea soilik ekarriko dutenez, jatorrizko 1. gradienteak hartu dugu optimotzat.

Behin banaketa optimizatuta sentikortasuna hobetzeko, SIM metodoa eraiki da. Horretarako, SCAN moduan lortutako kromatogramak hartu eta leiho bakoitzeko neurtutako ioiak zehaztu dira, leiho bakoitzean analito bakoitzerako ioi kuantifikagarria (Q) eta kualifikagarria (q) aukeratu dira eta analito bakoitzaren erretentzio-denbora (RT) zehaztu da. 4. taulan SIM metodo optimoaren zehaztasunak ikus daitezke.

4. taula. SIM metodoaren baldintza optimoak.

Familia	Analitoa	RT	Q	q	Lehioa (min)
Br-Ph	3-Bromofenola	7.19	229	246	6.50-8.50
Br-Ph	4-Bromofenola	7.49	229	246	
Br-Ph	2,5-Dibromofenola	9.92	309	324	8.50-10.15
Trazagarri	2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola	10.05	312	327	
Br-Ph	2,6-Dibromofenola	10.08	309	324	10.15-10.40
Trazagarri	1-[² H ₇]-Naftola	10.23	208	223	
OH-PAH	1-Naftola	10.26	201	216	
Br-Ph	2,4-Dibromofenola	10.28	309	324	10.40-12.00
OH-PAH	2-Naftola	10.57	201	216	
Br-Ph	2,4,6-Tribromofenola	12.90	387	404	12.00-13.10
Trazagarri	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	12.90	389	406	
OH-PAH	9-Hidroxifluorenoa	13.23	165	254	13.10-15.50
OH-PAH	2-Hidroxifluorenoa	15.12	254	239	
OH-PCB	4-Hidroxi-4'-klorobifeniloa	15.20	276	261	
OH-PAH	4-Hidroxifenantrenoa	16.38	266	251	16.10-18.50
OH-PAH	9-Hidroxifenantrenoa	17.04	266	251	
OH-PAH	1- Hidroxifenantrenoa	17.58	266	251	
OH-PAH	3- Hidroxifenantrenoa	17.69	266	251	
OH-PAH	2- Hidroxifenantrenoa	18.29	266	251	
OH-PCB	4-Hidroxi-2',3,5'-triklorobifenioala	18.77	329	346	
OH-PCB	4-Hidroxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa	22.43	399	414	22.00-22.80
Trazagarri	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	23.19	299	284	22.8-23.50
OH-PAH	1-Hidroxipirenoa	23.24	290	275	
Trazagarri	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	23.72	411	426	23.50-24.00
OH-PCB	4-Hidroxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa	24.35	399	414	24.00-25.00
OH-PCB	3-Hidroxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa	24.47	433	448	

Laburdurak: Br-Ph: Bromofenolak; OH-PAH: Hidroxilatutako hidrokarbuo polizikliko aromatikoak; OH-PCB: Hidroxilatutako bifenilo polikloratuak; Q: ioi kuantifikatzailea; q: ioi kualifikatzailea; RT: Erretentzio-denbora.

4.1.2 LC-MS/MS

LC-MS/MS metodoaren kasuan analisia lan-taldearen aurreko lan-baldintzetan oinarrituta egon da⁵⁷ eta lan honetan DMRM metodoa eraikitzeke gure analitoen inguruan beharrezkoa den informazioa (ioi aitzindaria, apurketa-ioiak, erretentzio-denbora, apurketa-boltaia talka-energia) lortu dira ingurune azidotan (pH=3) zein basikotan (pH=10) (ikus 5. eta 6. taulak, hurrenez hurren) Optimizer (Agilent) software-aren bitartez. Apurketa-ioien kasuan lehena kuantifikatzaile (Q) bezala erabili da eta bigarrena kualifikatzaile (q) gisa. Aipatu beharrezkoa da LC bidezko analisian isomero posizionalen banaketa ezinezkoa dela. Ondorioz, naftolen, fenantrolen edota bromofenolen arteko bereizketa ezinezkoa izan da eta horien kontzentrazioak isomeroen batura bezala eman da. Hain zuzen ere, hori da LC duen desabantaila nagusia GCren aurrean. Kontrara, LC-ren bidez glukuronido eta sulfato metabolitoak jarrai daitezke, horien analisi zuzena GCtik ezinezkoa izanda ezin baitaitezke deribatizatu eta euren kuantifikazioa diferentziaz kalkulatu behar da.

5. taula. Fase mugikor azidoan (pH=3) erretentzio-denborak, jarraitutako trantsizioak (m/z), apurketa- boltaia (V), talka-energia (eV) eta ionizazio-modua.

Analitoa	RT (min)	Ioi aitzindaria (m/z)	Apurketa-ioiak (m/z)	Apurketa-boltaia (V)	Talka-energia (eV)	Ionizazio-modua
Naftolak	5.6	145	127	75	17	Positiboa
OH-pirenoa	10.2	217.1	189.1	150	37	Negatiboa
OH-fluorenoak	8.5	183	98/165	75	17/21	Positiboa
Bromofenolak	5.3	171	79	90	21	Negatiboa
Tribromofenol	9.8	327	79	135	29	Negatiboa
PentaPCB	13.2	339	303	135	21	Negatiboa
TriPCB	11.2	271	235	120	17	Negatiboa
MonoPCB	2.0	205	85	75	13	Positiboa
HexaPCB	13.7	373	337	120	25	Negatiboa
1-[² H ₇]-Naftola	5.9	152	133	105	21	Positiboa
1-[² H ₉]-Hidroxi-pirenoa	10.0	226.1	198.1	150	37	Negatiboa

Laburdurak: HexaPCB: 3-Hidroxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa; m/z: Masa karga erlazioa; MonoPCB; 4-Hidroxi-4'-klorobifeniloa; PentaPCB: 4-Hidroxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa eta 4-Hidroxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa; RT: Erretentzio-denbora; TriPCB: 4-Hidroxi-2',3,5'-triklorobifeniloa.

6. taula. Fase mugikor basikoan (pH=10) erretentzio-denborak, jarraitutako trantsizioak (m/z), apurketa- boltaia (V), talka-energia (eV) eta ionizazio-modua.

Analitoa	RT (min)	loi aitzindaria (m/z)	Apurketa- ioiak (m/z)	Apurketa- boltaia (V)	Talka-energia (eV)	Ionizazio- modua
Naftolak	6.7	143.1	115/41.1	135	29/37	Negatiboa
Fenantrolak	10.4	193.1	165.1	150	33	Negatiboa
OH-pirenoa	10.8	217.1	189.1	135	37	Negatiboa
OH-fluorenoak		181	153	135	21	Negatiboa
Bromofenolak	5.0	171	79	90	21	Negatiboa
Dibromofenolak	4.5	249	79	105	25	Negatiboa
Tribromofenol	5.7	327	79	135	37	Negatiboa
PentaPCB	10.8	339	303	120	21	Negatiboa
TriPCB	9.8	271	235	135	17	Negatiboa
MonoPCB	10.8	203	117	120	37	Negatiboa
HexaPCB	11.0	373	337	135	25	Negatiboa
1-[² H ₇]-Naftola	6.8	150.1	122.1/42	150	29/41	Negatiboa
1-[² H ₉]-Hidroxi-pirenoa	10.7	226.1	198.2	135	41	Negatiboa
2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola	3.2	252	79	120	45	Negatiboa
2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	12.0	329	79	90	37	Negatiboa
1-Hidroxi-pireno β-D-glukuronido	5.8	394	217/113	120	45/9	Negatiboa
2-Naftil sulfatoa	3.9	223	143	105	17	Negatiboa

Laburdurak: HexaPCB: 3-Hidroxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa; m/z: Masa karga erlazioa; MonoPCB; 4-Hidroxi-4'-klorobifeniloa; PentaPCB: 4-Hidroxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa eta 4-Hidroxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa; RT: Erretentzio-denbora; TriPCB: 4-Hidroxi-2',3,5'-triklorobifeniloa.

5 eta 6.taulak aztertuz, baldintza basikoetan analito edo analito familia gehiago determinatu daitezke azidoan baino, hala nola, 2-naftil sulfatoa, 1-hidroxi-pireno β-D-glukuronido, fenantrolak... Printzipioz basikotik determinatu ezin diren OH-fluorenoak azidotik determinatu daitezke, hau da azidoaren abantaila nagusia.

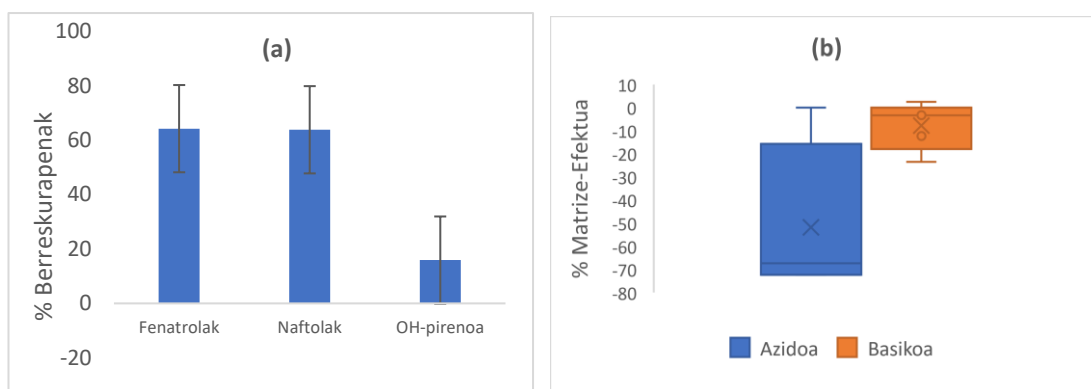
4.2 GARBIKETA-URRATSAREN OPTIMIZAZIOA

Garbiketa-urratsaren optimizazioa boluntarioengandik jasotako gernu errealarekin egin da eta ez gernu sintetikoarekin benetako matrizeak sor ditzakeen arazoei aurre egiteko. Boluntario bakarraren gernua hartu beharrean, 5 boluntarioen gernuaren *pool* lagina erabili da, boluntarioz boluntario egon daitezkeen desberdintasunak kontuan hartzeko.

4.2.1 Alderantzizko faseko SPE

OH-POPak gernuan analizatzeko aztertu den lehen garbiketa-urratsa Oasis-HLB oinarritutako alderantzizko faseko SPE izan da, lan-taldeak 200 konposatu baino gehiago analizatzeko duen metodoa baita⁵⁵. Lehen probak OH-PAHeekin bakarrik eraman dira aurrera eta lortutako erazkiak bai LC-MS/MS bai GC-MS bidez neurtu dira. Garbiketa-urratsaren etekinaz gain detekzioan dagoen matrize-efektua ere kontuan hartzeko gernu errearen *pool* alikuota desberdinak erauzketa aurretiaz (n=3) eta erauzketa ostean (n=3) dopatu dira azken erazkian 250 ng·g⁻¹ kontzentrazioa.

9(a). eta 9(b). irudietan berreskurapenak (%-tan eta barra-diagrama bezala) eta LC-MS/MS-aren bidez lortutako matrize-efektua (%-tan eta kutxa-diagrama bezala) bildu ditugu hurrenez hurren.



9. irudia. Alderantzizko faseko SPE egitean LC-MS/Msetik neurtuta lortutako (a) berreskurapenen (%-tan) barra-diagrama eta (b) matrize-efektua (%-tan) pH azido zein basikotan kutxa-diagrama bezala.

% Berreskurapenei erreferentzia eginda 9(a) irudian ikusi daitekeen moduan naftolak eta fenantrolak dira berreskurapen handienak dituztenak, hain zuzen %65 inguru. Aldiz OH-pirenorako nabarmenki jaisten da (%16). OH-fluorenoa ezin da determinatu bere sentikortasun eskasa dela eta bai azido zein basikotik. Matrize-efektuari dagokionez, argi dago giro azidoan neurtutako matrize-efektua askoz handiagoa dela, hain zuzen ere, matrize-efektu negatiboak izanik. Ingurune basikoan, aldiz, matrize-efektua oso txikia da, ia % 0-ra hurbilduta. Guzti hori kontuan hartuta, baldintza

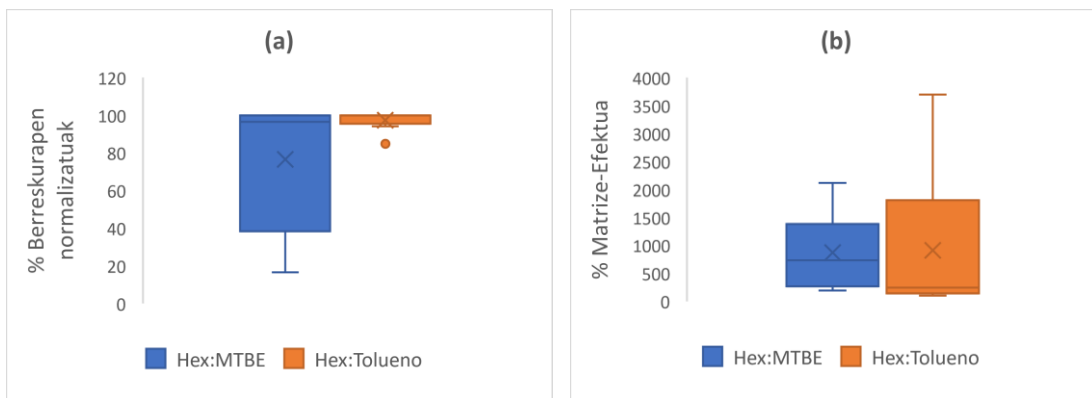
egokiena ingurune basikoa dirudien arren, berrespena bi pH-etan aurrera eraman da lan honetako beste familia biak (OH-PCB-ak ta BR-PH-ak) ere kontuan hartzeko.

Aipatzekoa da GC-MS bitartez neurtutako laginetan analitoak ez direla detektatu gernu errealak erabiltzen direnean. Bai disoluzio estandarrak, bai gernu sintetikotik lortutako erauziak deribatizatu eta GC-MS-tik neurtzen direnean, analitoak detekta daitezkeen bitartean, boluntarioen *pool* laginean ez. LC eta GC analisisien arteko desberdintasun bakarra deribatizazio-urratsa denez, gure hipotesia da Oasis HLB-aren bidezko garbiketan eliminatzen ez den interferentziaren batek deribatizatzailea kontsumitzen duela. Hori dela eta, albo proba batzuk egin dira deribatizatzaile bolumenak handituz, 150 μ L deribatizatzaile maximo bateraino, baina emaitza berdina izan da. Horren aurrean eta bibliografiara jota, fase normaleko SPE eta LLE erauzketa soila alternatiba gisa proposatu dira GC-MS analisiaren kasuan^{40,41}.

4.2.2 LLE

Arestian esan bezala, GC-MS analisiaren kasuan, Oasis HLB ez da garbiketa-urrats egokia izan eta, bibliografian oinarrituta^{40,42}, LLE aztertu dugu. Lehen hurbilketan, OH-PAHak analito gisa, erabiliko den disolbatzailearen izaera optimizatu da. Hain zuzen, hexano:toluenoa (50:50 b/b)⁴⁰ edo hexano:MTBE (50:50 b/b)⁴¹. Bi disolbatzaile nahasteen kasuan hexanoa erabili da, analito apolarrenak erauzteko. Ondoren, polartasun igotzeko tolueno eta MTBE disolbatzaileak gehitu dira. Modu horretan MTBE (LogP 1.2), zeina toluenoa (LogP 2.5) baino pixka bat polarragoa den, polartasun gehigarri horrek erauzketan izan dezakeen eragina aztertu nahi izan da. Esperimentuak boluntarioen *pool* alikuotekin aurrera eraman dira, 250 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ kontzentrazioan dopatuta, bai LLE aurretiaz eta ostean, etekinak eta matrize-efektua kalkulatu ahal izateko.

Nahaste bakoitzarekin lortutako berreskurapen normalizatuen eta matrize-efektuen kutxa-diagramak 10(a) eta 10(b) irudietan bildu ditugu.



10. irudia. Hexano:tolueno (50:50, b/b) eta hexano:MTBE (50:50, b/b) disolbatzaile-nahasteekin lortutako (a) berreskurapen normalizatuaren (%-tan) eta (b) matrize-efektuaren (%-tan) kutxa-diagramak.

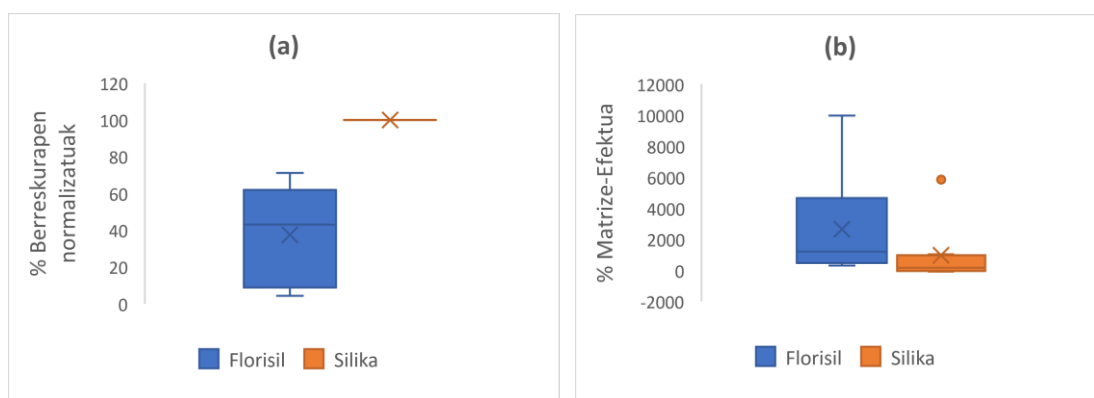
Berreskurapenei dagokionez (ikus 10(a). irudia), agerikoa da hexano:toluenoarekin lortutako etekinak orotara hobeak direla analito guztietarako. Hexano:MTBE nahastearen kasuan, ordea, zenbait konposatuentzarako berreskurapenak bereziki txikiak dira, hain zuzen ere, 1- eta 2-naftoletarako, zeinen berreskurapenak % 20 ingurukoak diren. Alde horretatik hexano:tolueno (50:50, b/b) nahastea egokiagoa da. Matrize-efektuari erreferentzia eginda (ikus 10(b). irudia), izugarri altua den matrize-efektu positiboa lortu da, % 2500-200 bitartekoa, erazle bietarako. Hexano:tolueno nahastearen kasuan naftolak dira salbuespena, euren matrize-efektua % 3000-ra heltzen den bitartean, beste konposatu guztietarako ez baita % 500-eko matrize-efektua gainditzen. Hexano:MTBE nahastearen kasuan, aldiz, goi muga ez da hain altua (% 2000 1-naftolarako), baina batez bestean analito guztietarako matrize-efektu altuagoa lortzen da, % 1000 ingurukoa. Esan beharra dago, matrize-efektua kasu guztietan positiboa dela eta, hori, abantaila bat izan daitekeela detekzio- eta kuantifikazio-mugei begiratuta, beti ere matrize-efektu hori zuzentzeko gai bagara.

Esandako guztia kontuan hartuta, hexano:tolueno (50:50, b/b) aukeratu dugu erazle egokiena bezala.

4.2.3 Fase normaleko SPE

Bibliografiaren arabera⁴¹ fase normaleko SPE ere alternatiba gisa kontsidera daiteke OH-POPak gernuan analizatzeko. Kontuan hartu behar da fase normaleko SPE egiteko, aurretiaz gernuaren LLE aurrera eraman behar dela fase normaleko kartutxoetan kargatzen den laginaren polaritatea txikitzeko. Gure kasuan, aurreko atalean aukeratutako hexano:toluenoaren bidezko LLE. OH-PAHak analito gisa erabilia kartutxoaren izaera optimizatu da eta, hain zuzen, silikazko eta Florisilezko kartutxoak aztertu dira. Esperimentuak boluntarioen *pool* alikuotekin aurrera eraman dira aurrekoan bezala, 250 ng·g⁻¹ kontzentrazioan dopatuta, bai SPE aurretiaz eta ostean.

11. irudian lortutako berreskurapenen eta matrize-efektuen emaitzak bildu ditugu kutxa-diagrama bezala.



11. irudia. Fase normaleko SPEean, Florisil eta silika kartutxoekin lortutako (a) berreskurapenen (%-tan) eta (b) matrize-efektuen (%-tan) kutxa-diagramak.

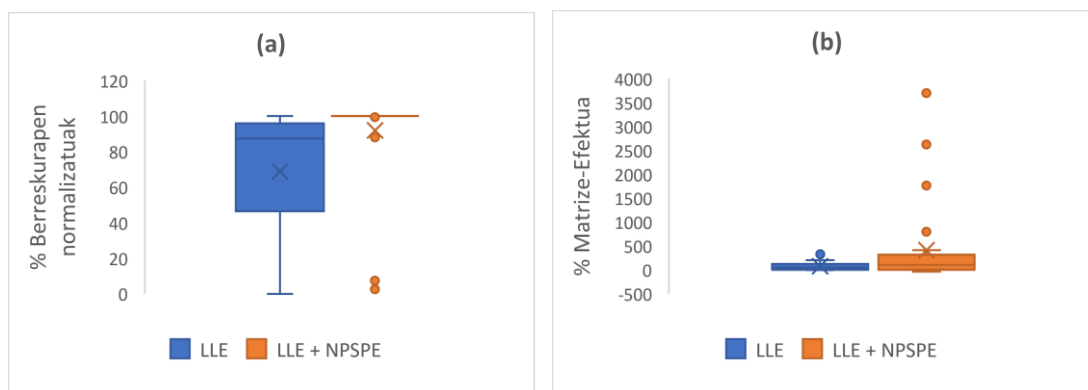
11(a) irudiari erreparatuta, argi eta garbi ikus daiteke silikazko kartutxoekin lortutako berreskurapen normalizatuak egokienak direla. Alde horretatik silikazko kartutxoaren erabilera florisilezkoen aurrean guztiz logikoa dirudi. Gainera matrize-efektuari erreparatuta (ikus 11(b) irudia), aipatzekoa da matrize-efektu positiboak nahiko altuak direla kartutxo bietan, baina silikazko kartutxoak erabilia balioak % 1000-0 bitartean dauden bitartean, Florisilezko kartutxoak erabiltzen badira askoz altuagoak direla, % 10000-1000 bitartekoak. 2-Naftola da salbuespena, zeinak silikazko kartutxoa erabilia ere % 6000 inguruko matrize-efektua duen. Aipatutako guztia

kontuan hartuta, argi eta garbi silikazko kartutxoek berreskurapen altuagoak eta matrize-efektu txikiagoak erakutsi dutenez, silika aukeratu da optimo bezala.

4.2.4 Fase normaleko SPE eta LLEren arteko konparaketa

Behin LLE eta fase normaleko SPEren baldintza optimoak determinatuta, bi garbiketaturratsen arteko konparaketa egin da. Atal honetan beste bi familiekin, OH-PCB eta Br-Ph, ere lan egin da ikuspegi orokorra kontuan hartzeko. Aurrekoetan bezala egin da lan, hain zuzen, esperimentuak genuaren *pool* alikuotekin, 250 ng·g⁻¹ kontzentrazioan dopatuta, SPE eta LLE aurretik eta ostean.

12. irudian lortutako berreskurapen normalizatuen eta matrize-efektuaren emaitzen kutxa-diagramak bildu ditugu.



12. irudia. LLE eta LLE+fase normaleko SPEan lortutako (a) berreskurapen normalizatuen (%-tan) eta (b) matrize-efektuen (%-tan) kutxa-diagramak.

12(a) irudian ikus daitekeen moduan, LLE + fase normaleko SPE bidezko garbiketaren berreskurapen normalizatu gehienak % 100-tik hurbil daude, salbuespena 1-hidroxipirenoa (% 2) eta 1-[²H₉]-Hidroxipirenoa (% 7). Gainera hau OH-POP guztietara hedatzen da. LLE soilaren berreskurapenak ere oso onak badira, % 80-100 bitartean analito gehienetarako, arazoa bromofenol eta dibromofenol isomeroekin dator, hain zuzen, euren berreskurapenak nuloak baitira LLE-aren bitartez. Arazoa ez da LLE erauzketa, hori balitz LLE+fase normaleko SPE egiterakoan ere ez baitgenituzke detektatuko. Gure hipotesia da, konposatu horien erauzketa ematen den arren, lurrunkorrenak izanda nitrogenoaren bidez lehorrera eramaten direnean, galdu egiten direla. Egia da LLE+NPSPE egiten denean, baita LLE erauzketa osteko erauziak

500 µL lurruntzen direla, baina ez lehorrera eta hor egon daiteke gakoa. Matrize-efektuari erreferentzia eginda (ikus 12(b). irudia), matrize-efektu minimoak LLE soilarena da, hain zuzen ere, fase normaleko SPE erabiltzen denean matrize-efektu handia duten zenbait konposatu nabarmentzen baitira, 2-naftola eta 9-hidroxi fluorenoa batik bat.

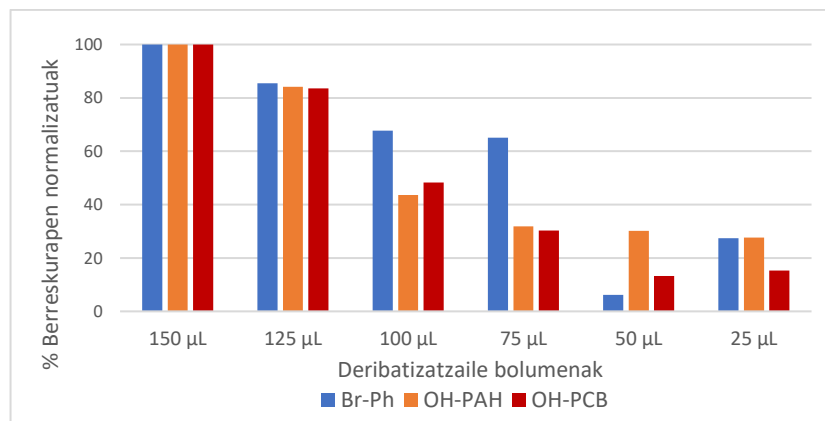
Dena dela eta OH-POP familia gehiagotara heltzeko, beharrezkoa da LLE eta fase normaleko SPE konbinatzea bromo- eta dibromofenolak ez galtzeko eta hori izango da GC-MS analisiaren kasuan erabiliko den garbiketa-urrats konbinatua.

4.3 DERIBATIZAZIO-URRATSAREN OPTIMIZAZIOA

LLE+fase normaleko SPE garbiketa GC-MS-tik analizatuko diren laginen garbiketa-urratsa optimizatutzat hartuta, deribatizazio-urratsaren optimizazioa egin da eta bi parametro optimizatu dira: i) ko-disolbatzaile egokiena eta ii) ko-disolbatzailearen eta deribatizatzailearen bolumenak.

Lehenik eta behin ko-disolbatzailearen natura aztertu da eta, deribatizatzaileaz gain, tolueno, etil azetato eta hexano disolbatzaileak aztertu dira ko-disolbatzaile gisa. Toluenoari dagokionez, kromatogramak oso zikinak dira, interferentzia asko eta seinale altuekin ikusten baitira. Etil azetatoaren kasuan, interferentzia kopurua askoz txikiagoa bada ere, interferentzia gutxien hexanoarekin lortu dira. Gainera, hexanoak errepikakortasun onenak erakutsi ditu analito guztietarako. Beraz ko-disolbatzaile optimo bezala hexanoa aukeratu da.

Behin ko-disolbatzailea aukeratura, deribatizatzaile:ko-disolbatzaile ratio desberdinak aztertu dira. Deribatizatzaile bolumena optimizatzeke, gernu errealean *pool* bat prestatu da eta horretan analitoen dopaketa egin da, hain zuzen, azken erauzian 200 ng·g⁻¹ kontzentrazioa izateko. Gernu *pool* dopatuarekin metodo guztia aurrera eraman da eta lortutako kontzentrazioak kontzentrazio bereko erreferentzia batekiko konparatu dira berreskurapena kalkulatzeko. Emaitzak 13. irudian bildu dira.



13. irudia. Deribatizatzaile bolumen ezberdinak erabilia lortzen diren berreskurapen normalizatuak familia bakoitzeko.

13. irudian beha daitekeen bezala, zenbat eta deribatizatzailearen bolumena handiagoa izan, seinale altuagoak lortzen dira. Egia bada ere 150 µL-rekin seinalerik onenak lortzen direla, ikusita 125 µL-rekin lortutako seinalea jada egokiak direla (% 20ko galera soilik 150 µL-rekiko erkatuta), uste dugu ez dela beharrezkoa deribatizatzaile-bolumena are gehiago handitzea. Izan ere, deribatizatzaileak injektorea, zutabe kromatografikoa eta masa-analizatzailea zikintzeaz aparte, garestia da. Ondorioz, konpromiso batetara helduta optimotzat 125 µL deribatizatzaile gehi 25 µL hexano hartu da.

4.4 BERRESPENA

4.4.1 Hidrolisi entzimatikoa

Hidrolisi entzimatiakoaren etekina ezagutzeko LC-MS/MS bidez 1-hidroxipireno β-D-glukuronidoa eta 2-naftol sulfatoa diren 2. mailako metabolitoak erabili dira. Lortutako hidrolisi entzimatiakoaren etekinak 1-hidroxipireno β-D-glukuronidorako %100 ± 1 eta 2-naftol sulfatorako %100 ± 3 izan dira, etekina hiru kontzentrazio mailetan (1 ng·g⁻¹, 10 ng·g⁻¹, 30 ng·g⁻¹) lortutako batezbestekoa bezala eta desbideratzea hiru kontzentrazioen desbideratze estandar bezala definituta. Ikus daitekeen moduan, hidrolisi entzimatikoa guztiz kuantitatiboa dela frogatu dugu.

4.4.2 Kuantifikazio-muga instrumental eta prozeduralak

a) LLE gehi NPSPE bidezko garbiketa eta GC-MS bidezko analisisia

3.6(a). atalean aipatu bezala, lehenik eta behin 13 kalibratio-puntuko kanpo kalibratua prestatu da eta kuantifikazio-muga instrumentalak kalkulatzeko kalibratuko puntu baxuenak erabili dira (ikus 3.6 atala). Behin kuantifikazio-muga instrumentalak kalkulatu, kanpo kalibratuen beheko muga gisa kuantifikazio-muga instrumentalak (KM_{inst}) eta goi muga gisa 1000 eta 800 $ng \cdot g^{-1}$ -ko kontzentrazio tartean jarri da. Kasu guztietan 0.9900-tik gorako korrelazio-koefizienteak (r^2) lortu dira.

Lortutako KM_{inst} analito zein trazagarrietarako eranskinetako 2E. taulan agertzen dira. Orohar, joerak familia berean ikus daitezke. Kasurako KM_{inst} onenak dituztenak OH-PCBak dira, zeinen KM_{inst} handiena 3.25 $ng \cdot g^{-1}$ -ekoa den, hainbat konposaturen kuantifikazio-mugak 1 $ng \cdot g^{-1}$ -tik behera daudelarik. Ondoren, OH-PAHak daude 3 $ng \cdot g^{-1}$ inguruko kuantifikazio-muga instrumentalekin, 1- eta 2-naftolak salbu, 11 eta 6 $ng \cdot g^{-1}$ mailako kuantifikazio-muga instrumentalekin, hurrenez hurren. Azkenik, Br-Ph-en kasuan KM_{inst} 10-15 $ng \cdot g^{-1}$ bitartekoak dira, salbuespen modura 2,6-dibromofenolarena zeinak $>50 ng \cdot g^{-1}$ -ko KM_{inst} duen.

Beste alde batetik, KM_{proz} -ak kalkulatu dira KM_{inst} -etik abiatuta eta berreskurapen absolutuak kontuan hartuta (berreskurapenak 30 $ng \cdot g^{-1}$ dopatuak eta hidrolizatuta), emaitzak eranskinetako 2E. taulan ageri dira. Adibidez, lortutako kuantifikazio-muga prozeduralak OH-PAH-etarako (0.3-3.7 $ng \cdot g^{-1}$ bitartekoak) bibliografiarekin konparatzen badira (2-60 $ng \cdot g^{-1}$ bitarteko)⁵⁸, garatutako metodo analitiko oso sentikorra dela ondoriozta daiteke. Br-Ph-en kasuan, aldiz, lortutako balioa 2-15 $ng \cdot g^{-1}$ -koa izan da. Aldiz, bibliografian lortutako balioak 3 aldiz zarata/seinalea bezala definituta, 0.0001-0.02 $ng \cdot g^{-1}$ -koak izan dira⁴¹. Beraz, gure kuantifikazio-mugak altuagoak badira ere, bibliografiako lan horretan erabilitako irizpidea nahiko lausoagoa dela esan dezakegu eta, ondorioz, Br-Ph-etarako lan honetan garatutako metodoa sentikorra dela baieztatu daiteke. Azkenik, OH-PCBak daude, lortutako balioak garatutako metodo analitikoarekin 1.2-6 $ng \cdot g^{-1}$ -koak izan dira. Bibliografian

aurkitutako detekzio-limiteak $0.01-0.1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ mailakoak izan dira, 3 aldiz zarata bezala definituta⁵⁹. Br-Ph-en kasuan bezala, kontuan hartuta kuantifikazio-limiteak altuagoak direla, metodoaren sentikortasuna berma daiteke. Orohar, esan daiteke garatutako metodo analitiko OH-POP-etarako sentikorra dela.

b) RPSPE bidezko garbiketa eta LC-MS/MS bidezko analisia

3.6(b). atalean deskribatu den moduan, 12 kalibrazio-puntuko kanpo kalibratua prestatu da. Horretatik kuantifikazio-muga instrumentalak kalkulatzeko, berriz, kalibratuko puntu baxuenak erabili dira (ikus 3.7 atala). Kanpo kalibratuen beheko muga gisa kuantifikazio-muga instrumentalak (KM_{inst}) eta goi muga gisa $300-500 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko kontzentrazioa jarri da, linealitatea bermatzeko. Salbuespen modura, naftil sulfatoa zeinak $700 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko goi muga arte linealitatea erakusten duen baldintza basikoetan. Baldintza azido zein basikotan neurtuta 0.9900 -tik gorako r^2 -ak lortu dira.

Lortutako KM_{inst} analito zein trazagarrietarako baldintza azido eta basikoetan eranskinetako 3E. taulan agertzen dira. Beti bezala familia osoko kontzentrazio gisa eman dira, isomeroen banaketa ezinezkoa delako. Orohar, joera familia berean beha daiteke. Kasu honetan KM_{inst} hoberenak dituztenak OH-PAHak dira, $0.1-2 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ bitarteko balioekin. Ostean, Br-Ph-ak aurki daitezke, KM_{inst} pixka bat altuagoak dituzte, $2-4 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ bueltako kuantifikazio-muga instrumentalekin. Azkenik, OH-PCB-en KM_{inst} -ak $5-22 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ bitartekoak dira. Esan beharra dago aipatutako balio guztiak baldintza basikoetan direla, oro har, baldintza azidoetan askoz okerragoak baitira. Eraitza logikoa dirudi, izan ere, konposatu fenolikoak dira aztergai eta horien joera normalena protoi baten galera da, hain zuzen, baldintza basikoetan ematen dena.

Bestalde KM_{proz} -ak kalkulatu dira GC-MS-aren kasuan bezala, KM_{inst} -etatik abiatuta eta berreskurapen absolutuak aintzat hartuta (ikus eranskinetako 3E. taula), bai giro azidotan, bai basikotan. Berreskurapen absolutua $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko kontzentrazioan eta hidrolizatutako lagin dopatuena bezala hartu da. Glukuronido eta sulfatoaren kasuan salbu, kasu horietan hidrolizatu gabeko berreskurapenak erabili dira, hidrolizatutakoan galtzen baitira. Lortutako kuantifikazio-muga prozeduralak OH-PCB-en kasuan, $0.4-1.3 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ izan dira, bibliografiakoak baino altuagoak ($0.01-0.19$

ng·g⁻¹)⁴⁴. Kasu horretan bibliografian hartutako irizpidea 5 aldiz zarataren/seinale erlazioa izan da, gure lanean baino lausoagoa. OH-PAH-en kasuan 0.008-0.2 ng·g⁻¹ bitarteko KM_{proz}-ak lortu ditugu, bibliografiakoak baino hobeak (0.2-1 ng·g⁻¹)⁴³. Azkenik Br-Ph-ak daude 0.3-0.4 ng·g⁻¹ kuantifikazio-muga prozeduralekin. Bibliografiarekin konparatuta, detekzio-muga prozeduralak 0.008-0.16 ng·g⁻¹ bitartean dituzte⁶⁰. Aipatutako guztiak baldintza basikoetan izan ohi dira, hain zuzen baldintza egokiena. Orohar, GC-MS analisisian heldutako ondorio berdina; metodoa OH-POPetarako sentikorra da.

Edonola ere, nahiz eta metodo sentikorra izan, OH-fluorenoa, PentaPCB, 2,4,6-tribromo-[²H₂]-fenola eta 4-hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³C₁₂] bifeniloa ezin izan dira ez baldintza azidotan ezta basikoetan ere kuantifikatu.

4.4.3 Etekin absolutua eta zuzendua

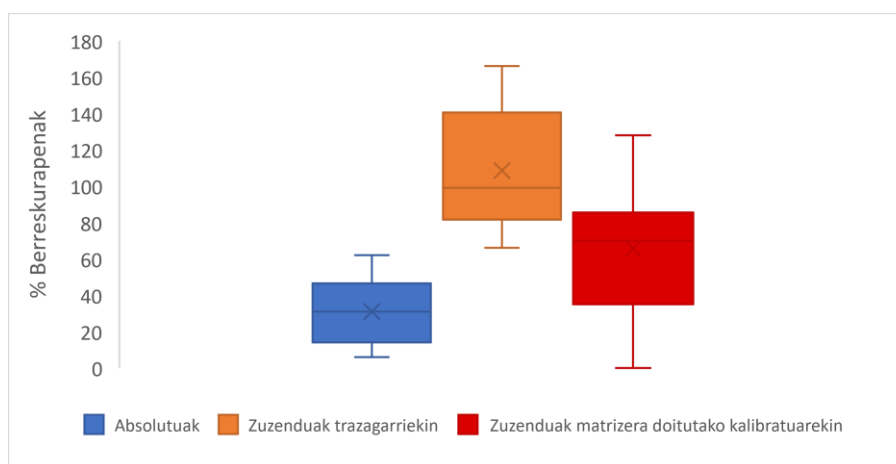
a) LLE gehi NPSPE bidezko garbiketa eta GC-MS bidezko analisia

GC-MS bidezko berrespena kontzentrazio maila bakarrean egin da, hain zuzen 30 ng·g⁻¹ dopatuta (n=3), eta hidrolizatuta. 4.4.1 atalean ikusi den moduan hidrolisia guztiz kuantitatiboa dela frogatu delako. Eranskinetako 4E. taulan analito bakoitzaren berreskurapen absolutuak eta % DEE-ak agertzen dira. Horrez gain, berreskurapen zuzenduak eta horien % DEE ere kalkulatu dira trazagarriekin. Trazagarria aukeratzeko berreskurapen zuzendua % 65-% 135 bitartean onartu da, % DEE < % 40 ontzat hartuta. 4E. taula aztertzen baldin bada, ikus daiteke zenbait analitoen etekin zuzenduak > % 135 direla. Horren arrazoia da erabilitako trazagarrien artean ez dagoela bat ere ez % 50-90 bitarteko berreskurapenak dituen eta, ondorioz, berreskurapen horiek dituzten analitoak ezin dira modu egokian zuzendu. Ondorioz, argi dago trazagarri gehiago beharrezkoak direla, batez ere berreskurapen tarte hori (% 50-90) zuzentzeko. Harritzekoa da ere 1-[²H₇]-naftola trazagarriak ez dituela ez 1-naftola ezta 2-naftola zuzentzen.

Analito guztietarako trazagarri egokiak egongo ez direlakoan, baita dopatu eta prozedura osoa pairatzen duen kalibratu bat prestatu da (ingelezesko *matrix matched calibration* delakoa), 8 puntukoa, hain zuzen. Ondoren, matrizeari doitutako

kalibratu hau erabiliz zuzenean berreskurapen zuzenduak lortu eta emaitzak eranskinetako 4E. taulan bildu dira. Emaitza horiek aztertzen badira, ikus daitekeena da analito gehienetarako berreskurapenak % 65-135 bitartean eta DEE < % 40 daudela. Modu horretan matrizerara doitzen den kalibratua erabiliz metodo zehatza lortu dugu. Salbuespen modura berreskurapen absolutua <% 15 dituzten konposatuak ditugu, batez ere OH-PCB-ak eta 1-hidroxipirenoa. Konposatu horien berreskurapena hain da txikia kuantifikazio-mugetatik oso gertu dagoela. Etorkizunera begira, konposatu horien berreskurapenak handitzea egin beharreko lanetako bat izango da. Azkenik 2,6-dibromofenola ezin izan dugu matrizeari doitutako kalibratuetatik kalkulatu zuri arazoak medio.

Balioen konparaketa egiteko, 14. Irudian kutxa diagrama bezala adierazita berreskurapen absolutuak (%-tan), zuzenduak trazagarriekin (%-tan) eta matrizearekiko zuzenduak (%-tan) aurki daitezke.



14. irudia. Berreskurapen absolutu (%-tan), zuzenduak trazagarriekiko (%-tan) eta matrizearekiko zuzenduan (%-tan), 21 OH-POPetarako.

14. irudia aztertzen bada, ikus daiteke bai trazagarriekin bai matrizerara doitzen den kalibratua erabilia lortzen diren berreskurapenak % 100-etik eta, ondorioz, balio zehatzetik, hurbilago daudela berreskurapen absolutuen ondoan. Beraz, esan daiteke bai trazagarri, zein matrizerara doitutako kalibratuak erabilia, metodoa analitoetarako zehatzagoa izatea ahalbidetzen dutela. Trazagarri eta matrizerara doitzen den kalibratuak konparatzen badira, trazagarriekin berreskurapenak %100-tik hurbilago

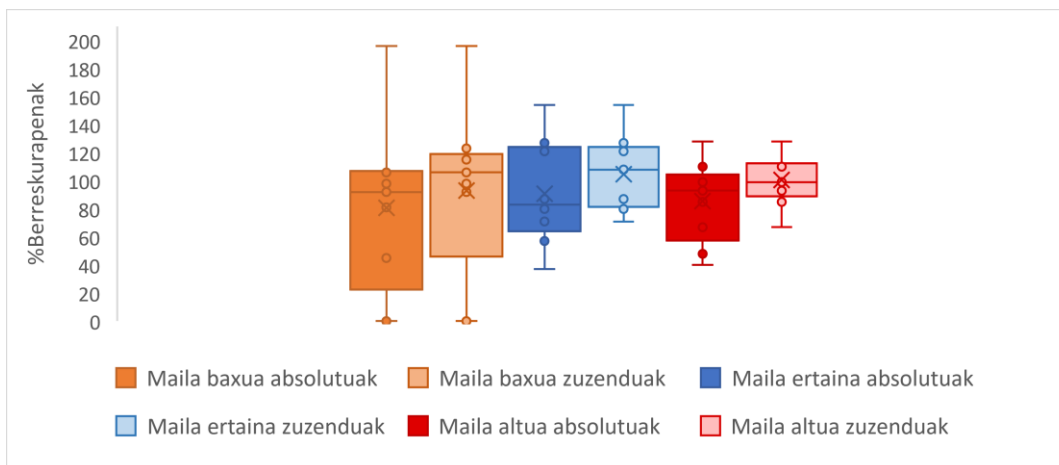
daude matrizerara doitzen den kalibratuarekin baino baina, horren arrazoia etekin oso baxuak izan dituzten analitoen etekin zuzenduetan dago. Edonola ere, erosoagoa da trazagarri egokiak erabiltzea matrizeari doitutako kalibratuak eraikitzea baino.

b) RPSPE bidezko garbiketa eta LC-MS/MS bidezko analisisia

LC-MS/MS bidezko berrespena hiru kontzentrazio mailatan egin da; $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ dopatuta, hain zuzen ($n=3$) hidrolizatutako laginak erabiliz. Analito bakoitzaren baldintza optimoetan egin da neurketa (ionizazio positiboa edo negatiboa), baina beti ere giro basikotan. Eranskinetako 5E., 6E. eta 7E. tauletan berreskurapen absolutuak dagokion DEE-ekin batera agertzen dira maila bakoitzeko, hurrenez hurren. Berreskurapen zuzenduak eta horien DEE-ak ere kalkulatu dira trazagarriak erabiliz. Trazagarriaren egokitasuna bermatzeko aurrekoan bezalako irizpideak hartu izan dira: 1) berreskurapen zuzendua % 65-% 135 bitartean egotea eta 2) DEE < % 40 izatea.

Emaitzen artean aipagarria da hiru trazagarrietatik bik baino ez dutela analitoak zuzentzen, hain zuzen, $1\text{-}[^2\text{H}_7]$ -naftolak eta $2,6\text{-dibromo-}[^2\text{H}_3]$ -fenolak. Horiek gainera bakarrik balio dute beraien homologoak diren analitoak zuzentzeko edozein delarik kontzentrazio maila, 1-naftola eta $2,6\text{-dibromofenola}$ hurrenez hurren. Aldiz, $1\text{-}[^2\text{H}_9]$ -hidroxipirenoak ez du, 1-hidroxipirenoa zuzentzen. Beraz, beste analito guztietarako ez da trazagarri egokirik aurkitu eta etorkizunera begira trazagarri gehiago probatzea beharrezkoa da. Nahiz eta egia esan metodoa zehatza den analito gehienetarako trazagarriak erabili gabe, beti da komenigarria trazagarri bat izatea, metodoan egon daitezkeen arazo puntualak zuzentzeko.

Kontzentrazio-mailak konparatzeko, hurrengo kutxa-diagraman berreskurapen absolutuak eta zuzenduak hiru mailatan agertzen dira (ikus 15. Irudia).



15. irudia. Berreskurapen absolutuen kutxa-diagramak (%-tan), hiru kontzentrazio mailatan (baxua $1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$; ertaina $10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ eta altua $30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 21 OH-POPetarako.

15. irudia aztertzen bada, lehenik eta behin ikusten dena da hiru kontzentrazio mailatan batz bestez berreskurapen absolutuak %100-tik oso hurbil daudela. Esan bezala trazagarririk erabili gabe ere, metodoa analitoetarako zehatza da. Gainera, zenbat eta kontzentrazioa altuagoa izan berreskurapen absolutuen desbideratzea txikiagoa da. Hau logikoa dirudi, izan ere, zenbat eta kontzentrazioa altuagoa izan kuantifikazio-mugetatik aldenduago baitgaude eta neurketaren errorea txikiagoa da. Gainera, balio absolutuak zuzenduekin konparatuta, orohar kutxa-diagramak estuagoak dira, analito gehiagoren etekinak balio zehatzetik gertuago dauden adierazle. Azkenik, esan daiteke balio zuzenduekin berreskurapenen arteko desbideratzea txikitu egiten dela kontzentrazio maila guztietan.

4.4.4 Errepikakortasun instrumentala eta prozedurala

a) LLE gehi NPSPE bidezko garbiketa eta GC-MS bidezko analisisa

Instrumentazioaren errepikakortasunari dagokionez (DDE_{inst}), $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko kontzentrazio duen kanpo kalibratuko puntuaren hiru neurketak kontuan hartu dira. Modu horretan DDE_{inst} kasu guztietan % 5 baino txikiagoa izan da, errepikakortasun instrumentala analito guztietarako bermatu daitekeelarik.

Prozeduraren errepikakortasunari dagokionez (DEE_{proz}), dopatutako laginen DEE bezala hartu da (ikus 4E. taula). Orohar, analito guztietarako prozesuaren

errepikakortasun berma daiteke; izan ere, $DEE < \% 35$ izan ohi da. Salbuespen modura 2,6-dibromofenola zeinak $\% 40$ -ko desbideratze estandar erlatiboa duen.

b) RPSPE bidezko garbiketa eta LC-MS/MS bidezko analisia

DDE_{inst} kasu honetan $25 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ -ko kontzentrazio duen kanpo kalibratuko puntuaren hiru neurketak kontuan hartu dira analito bakoitzerako optimoa den pH-an. DDE_{inst} kasu guztietan $\% 30$ baino txikiagoa izan da, errepikakortasun instrumentala analito guztietarako bermatu daitekeelarik.

DEE_{proz} balioari dagokionez, dopatutako laginen DEE -a hartu da (ikus 5E., 6E. eta 7E. taulak). 5E-7E taulak aztertzen badira, edozein izanda kontzentrazio maila, analito guztien errepikakortasuna ona da ($< \% 35$). Orohar, aipatzekoa da errepikakortasun txarrena duena HexaPCB izan ohi dela.

5. ONDORIOAK

Gradu amaierako lan honetan gisa gernuan OH-POP-ak determinatzeko metodo analitiko bi garatu eta berretsi dira, hain zuzen GC-MS eta LC-MS/MS bidez neurketak eginda. Horretarako, garbiketa-, deribatizazio-, banaketa- eta analisi-urratsak GC-MS bidez zein garbiketa- eta analisi-urratsak LC-MS/MS bidez optimizatu dira. Laginaren tratamendurako bi prozedura garatu behar izan dira Oasis HLB kartutxoetan oinarritutako gernuaren garbiketa ez delako nahikoa izan GC-MS analisiak beharrezkoa duen sililazio erreakzioa modu egokian gauzatzeko.

GC-MS bidezko analisiari dagokionez, metodo analitikoa OH-POP-ekiko sentikorra dela ondorioztatu da KM_{proz} -ak bibliografiarekin konparatuta. Gainera errepikakortasuna aztertzen bada, errepikakortasun instrumentala ($DEE < 6$) eta prozedurala ($DEE < 35$) bermatu izan dira.

GC-MS bidezko analisisian, ikusi izan da analito gehienetarako trazagarri egokiak daudela, salbuespen modura $\% 50-90$ bitarteko berreskurapenak dituztenak. Ondorioz, etorkizunera begira trazagarri gehiago erosi eta horien egokitasuna bermatu behar da, batez ere berreskurapen tarte hori ($\% 50-90$) zuzentzeko. Gainera, OH-PCB-ek eta OH-pirenoak erakusten duten berreskurapen baxuak hobetzen saiatu

behar da. Hexanotan egiten den garbiketa-urratsean ez-polarragoak diren analitoen galerak dauden ala ez azter daiteke, adibidez.

Azkenik, GC-MS bidezko analisiarekin bukatzeko, berrespena gernu errealekin egitea komenigarria izango litzateke, matrize errealak duen eragina aztertzeko. Berrespen mailak jaistea ere komeniko litzateke, metodoaren zehaztasuna kuantifikazio muga prozeduraletatik hurbilago aztertzeko.

LC-MS/MS bidezko analisiari erreferentzia eginda, metodo analitikoa OH-POP-etarako nahiko sentikorra dela esan daiteke, bibliografiarekin konparatuta. Errepikakortasun instrumentala ($DEE < 30$) eta prozedurala ($DEE < 35$) bermatu izan dira.

LC-MS/MS bidezko analisisian metodoaren zehaztasuna bermatzeko, trazagarriak erabili dira. Analito askok metodo zehatzak izan badituzte ere hiru kontzentrazio mailetan, trazagarri egokien falta azpimarratzekoa da. Modu horretan heldutako ondorioa da trazagarri gehiago erostea eta hauen egokitasuna bermatzea.

Bukatzeko, GC-MS eta LC-MS/MS bidezko analisisien abantailak eta desabantailak azpimarratu nahi ditugu. GC-MS analisisian analito guztiak determinatu ahal izan dira, isomero posizionalak desberdinduta. Aldiz, metodo analitikoa luze samarra da. LC-MS/MS analisisian garbiketa-prozesua laburragoa bada ere, kontrara isomero posizionalak ezin dira bereiztu. Gainera bi analito familia zuzenean ezin izan dira determinatu ere ez (OH-fluorenoak eta PentaPCB), ez giro azidotik ezta basikotik ere.

6. ESKER ONAK

Gradu amaierako lan hau Espainiako Zientzia eta Berrikuntza Ministeritzako PID2020-117686RB-C31 proiektuaren eta Eusko Jaurlaritzako talde kontsolidatuaren IT1446-22 proiektuaren finantzazioa izan du.

Gainera lan honetan zuzendaria izan den Olatz Zuloagari eskerrak ematea gustatuko litzaidake, emandako laguntza eta aholkuengatik. Ahaztu gabe, UPV/EHU-ko Zientzia eta Teknologia fakultateko Kimika Analitika saileko beste kide guztiei, aipatzeko Mikel Musatadi doktoregaia, Maitane Olivares irakaslea eta Leire Mijangos doktora.

7. BIBLIOGRAFIA

- (1) Romero Placeres, M.; Álvarez Toste, M.; Álvarez Pérez, A. Los Factores Ambientales Como Determinantes Del Estado de Salud de La Población. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología* **2007**, *45* (2), 0–0.
- (2) Vrijheid, M. The Exposome: A New Paradigm to Study the Impact of Environment on Health. *Thorax* **2014**, *69* (9), 876–878. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2013-204949>.
- (3) Wild, C. P. The Exposome: From Concept to Utility. *Int. J. Epidemiol.* **2012**, *41* (1), 24–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>.
- (4) Wild, C. P. Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **2005**, *14* (8), 1847–1850. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>.
- (5) Vineis, P.; Robinson, O.; Chadeau-Hyam, M.; Dehghan, A.; Mudway, I.; Dagnino, S. What Is New in the Exposome? *Environment International* **2020**, *143*, 105887. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105887>.
- (6) Zinser, J. W. Tabaquismo y cáncer de pulmón. *Salud Publica Mex* **2019**, *61* (3, may-jun), 303. <https://doi.org/10.21149/10088>.
- (7) Gil, F.; Hernández, A. F. Toxicological Importance of Human Biomonitoring of Metallic and Metalloid Elements in Different Biological Samples. *Food and Chemical Toxicology* **2015**, *80*, 287–297. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.03.025>.
- (8) Actualizacion2019pnadecop_tcm30-508025.Pdf. https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/actualizacion2019pnadecop_tcm30-508025.pdf (accessed 2023-02-05).
- (9) Ashraf, M. A. Persistent Organic Pollutants (POPs): A Global Issue, a Global Challenge. *Environ Sci Pollut Res* **2017**, *24* (5), 4223–4227. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5225-9>.
- (10) Zenker, A.; Cicero, M. R.; Prestinaci, F.; Bottoni, P.; Carere, M. Bioaccumulation and Biomagnification Potential of Pharmaceuticals with a Focus to the Aquatic Environment. *Journal of Environmental Management* **2014**, *133*, 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.12.017>.
- (11) Kallenborn, R. Persistent Organic Pollutants (POPs) as Environmental Risk Factors in Remote High-Altitude Ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2006**, *63* (1), 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.02.016>.
- (12) Qing Li, Q.; Loganath, A.; Seng Chong, Y.; Tan, J.; Philip Obbard, J. Persistent Organic Pollutants and Adverse Health Effects in Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2006**, *69* (21), 1987–2005. <https://doi.org/10.1080/15287390600751447>.
- (13) Los 12 COP iniciales. <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx> (accessed 2023-02-17).
- (14) Convention, S. *Information on the 16 chemicals added to the Stockholm Convention*. BRSM eas. <http://chm.pops.int/?tabid=2511> (accessed 2023-02-17).

- (15) *Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review.*
<https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/23311843.2017.1339841?needAccess=true&role=button> (accessed 2023-02-18).
- (16) Patel, A. B.; Shaikh, S.; Jain, K. R.; Desai, C.; Madamwar, D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Toxicity, and Remediation Approaches. *Frontiers in Microbiology* **2020**, *11*.
- (17) Srogi, K. Monitoring of Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *Environ Chem Lett* **2007**, *5* (4), 169–195. <https://doi.org/10.1007/s10311-007-0095-0>.
- (18) Zubizarreta Solá, A.; Martínez Menéndez, J.; Rivas Pérez, P.; Gómez Iglesias, S.; Sanz Borrás, A.; Zubizarreta Solá, A.; Martínez Menéndez, J.; Rivas Pérez, P.; Gómez Iglesias, S.; Sanz Borrás, A. Revisión de La Literatura Sobre Efectos Nocivos de La Exposición Laboral a Hidrocarburos En Trabajadores En Ambiente Externo. *Medicina y Seguridad del Trabajo* **2018**, *64* (252), 271–294.
- (19) Siddiqi, M. A.; Laessig, R. H.; Reed, K. D. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants-Old Diseases. *Clinical Medicine & Research* **2003**, *1* (4), 281–290. <https://doi.org/10.3121/cmr.1.4.281>.
- (20) McDonald, T. A. A Perspective on the Potential Health Risks of PBDEs. *Chemosphere* **2002**, *46* (5), 745–755. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00239-9).
- (21) Rahman, F.; Langford, K. H.; Scrimshaw, M. D.; Lester, J. N. Polybrominated Diphenyl Ether ž PBDE/ FLame Retardants. **2001**.
- (22) Wu, Z.; He, C.; Han, W.; Song, J.; Li, H.; Zhang, Y.; Jing, X.; Wu, W. Exposure Pathways, Levels and Toxicity of Polybrominated Diphenyl Ethers in Humans: A Review. *Environmental Research* **2020**, *187*, 109531. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109531>.
- (23) Stapleton, H. M.; Eagle, S.; Anthopolos, R.; Wolkin, A.; Miranda, M. L. Associations between Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants, Phenolic Metabolites, and Thyroid Hormones during Pregnancy. *Environ Health Perspect* **2011**, *119* (10), 1454–1459. <https://doi.org/10.1289/ehp.1003235>.
- (24) Rocca, C. L.; Mantovani, A. From Environment to Food: The Case of Pcb.
- (25) *Bifenilo policlorado: descripción general | Temas de ScienceDirect.*
<https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/polychlorinated-biphenyl> (accessed 2023-02-19).
- (26) David O. Carpenter. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Routes of Exposure and Effects on Human Health. *Reviews on Environmental Health* **2006**, *21* (1), 1–24. <https://doi.org/10.1515/REVEH.2006.21.1.1>.
- (27) Aerts, R.; Van Overmeire, I.; Colles, A.; Andjelković, M.; Malarvannan, G.; Poma, G.; Den Hond, E.; Van de Mieroop, E.; Dewolf, M.-C.; Charlet, F.; Van Nieuwenhuysse, A.; Van Looco, J.; Covaci, A. Determinants of Persistent Organic Pollutant (POP) Concentrations in Human Breast Milk of a Cross-Sectional Sample of Primiparous Mothers in Belgium. *Environment International* **2019**, *131*, 104979. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104979>.

- (28) Vizcaino, E.; Grimalt, J. O.; Fernández-Somoano, A.; Tardon, A. Transport of Persistent Organic Pollutants across the Human Placenta. *Environment International* **2014**, *65*, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.01.004>.
- (29) Xu, C.; Li, C. Y.-T.; Kong, A.-N. T. Induction of Phase I, II and III Drug Metabolism/Transport by Xenobiotics. *Arch Pharm Res* **2005**, *28* (3), 249–268. <https://doi.org/10.1007/BF02977789>.
- (30) Anzenbacher, P.; Anzenbacherová, E. Cytochromes P450 and Metabolism of Xenobiotics: *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58* (5), 737–747. <https://doi.org/10.1007/PL00000897>.
- (31) Kaivosaari, S.; Finel, M.; Koskinen, M. N-Glucuronidation of Drugs and Other Xenobiotics by Human and Animal UDP-Glucuronosyltransferases. *Xenobiotica* **2011**, *41* (8), 652–669. <https://doi.org/10.3109/00498254.2011.563327>.
- (32) Seideg, Ård J.; Ekstr, öm G. The Role of Human Glutathione Transferases and Epoxide Hydrolases in the Metabolism of Xenobiotics. *Environmental Health Perspectives* **1997**, *105* (suppl 4), 791–799. <https://doi.org/10.1289/ehp.105-1470052>.
- (33) Cornelis, R.; Heinzow, B.; Herber, R. F. M.; Molin Christensen, J.; Poulsen, O. M.; Sabbioni, E.; Templeton, D. M.; Thomassen, Y.; Vahter, M.; Vesterberg, O. Sample Collection Guidelines for Trace Elements in Blood and Urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **1996**, *10* (2), 103–127. [https://doi.org/10.1016/S0946-672X\(96\)80018-6](https://doi.org/10.1016/S0946-672X(96)80018-6).
- (34) Fernández-Peralbo, M. A.; Luque de Castro, M. D. Preparation of Urine Samples Prior to Targeted or Untargeted Metabolomics Mass-Spectrometry Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *41*, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.011>.
- (35) Analytical Procedures Used in Examining Human Urine Samples. *Pol. J. Environ. Stud.* *12* (5), 503–521.
- (36) Dwivedi, P.; Zhou, X.; Powell, T. G.; Calafat, A. M.; Ye, X. Impact of Enzymatic Hydrolysis on the Quantification of Total Urinary Concentrations of Chemical Biomarkers. *Chemosphere* **2018**, *199*, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.177>.
- (37) Sakai, T.; Araki, T.; Ushio, K.; Takeuchi, Y.; Ikeya, Y. [Effect of hydrolysis conditions on the determination of urinary 2,5-hexanedione in workers exposed or not exposed to N-hexane]. *Sangyo Igaku* **1992**, *34* (5), 440–447. <https://doi.org/10.1539/joh1959.34.440>.
- (38) 415150.Pdf. <https://www.interchim.fr/ft/4/415150.pdf> (accessed 2023-04-16).
- (39) Taylor, J. I.; Grace, P. B.; Bingham, S. A. Optimization of Conditions for the Enzymatic Hydrolysis of Phytoestrogen Conjugates in Urine and Plasma. *Anal Biochem* **2005**, *341* (2), 220–229. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2005.03.053>.
- (40) Díaz de León-Martínez, L.; Flores-Ramírez, R.; Rodríguez-Aguilar, M.; Berumen-Rodríguez, A.; Pérez-Vázquez, F. J.; Díaz-Barriga, F. Analysis of Urinary Metabolites of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Precarious Workers of Highly Exposed Occupational Scenarios in Mexico. *Environ Sci Pollut Res* **2021**, *28* (18), 23087–23098. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-12413-y>.
- (41) Feng, C.; Xu, Q.; Jin, Y.; Lin, Y.; Qiu, X.; Lu, D.; Wang, G. Determination of Urinary Bromophenols (BrPs) as Potential Biomarkers for Human Exposure to Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) Using Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (GC-MS/MS). *Journal of Chromatography B* **2016**, *1022*, 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.03.041>.

- (42) Li, Z.; Romanoff, L. C.; Trinidad, D. A.; Hussain, N.; Jones, R. S.; Porter, E. N.; Patterson, D. G.; Sjödin, A. Measurement of Urinary Monohydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Using Automated Liquid–Liquid Extraction and Gas Chromatography/Isotope Dilution High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2006**, *78* (16), 5744–5751. <https://doi.org/10.1021/ac0606094>.
- (43) Shang, T.; Zhao, L.-J.; Li, P.; Zeng, X.-Y.; Yu, Z.-Q. Determination of Ten Kinds of Monohydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Urine by Supported Liquid Extraction Followed by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2019**, *47* (6), 876–882. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(19\)61165-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(19)61165-5).
- (44) Quinete, N.; Esser, A.; Kraus, T.; Schettgen, T. Determination of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls (OH-PCBs) in Human Urine in a Highly Occupationally Exposed German Cohort: New Prospects for Urinary Biomarkers of PCB Exposure. *Environment International* **2016**, *97*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.028>.
- (45) Haga, Y.; Suzuki, M.; Matsumura, C.; Okuno, T.; Tsurukawa, M.; Fujimori, K.; Kannan, N.; Weber, R.; Nakano, T. Monitoring OH-PCBs in PCB Transport Worker’s Urine as a Non-Invasive Exposure Assessment Tool. *Environ Sci Pollut Res* **2018**, *25* (17), 16446–16454. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1927-0>.
- (46) Ramsauer, B.; Sterz, K.; Hagedorn, H.-W.; Engl, J.; Scherer, G.; McEwan, M.; Errington, G.; Shepperd, J.; Cheung, F. A Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for the Determination of Phenolic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (OH-PAH) in Urine of Non-Smokers and Smokers. *Anal Bioanal Chem* **2011**, *399* (2), 877–889. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4355-7>.
- (47) Snyder, L. R.; Kirkland, J. J.; Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*; John Wiley & Sons, 2011.
- (48) Forgács, E.; Cserhádi, T. 9 - Gas Chromatography. In *Food Authenticity and Traceability*; Lees, M., Ed.; Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; Woodhead Publishing, 2003; pp 197–217. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.197>.
- (49) Lee, K. M.; Han, S. M.; Lee, H.-J.; Kang, M.; Jeong, T. Y.; Son, J.; Min, H.; Cha, S.; Oh, H. B.; Oh, W. K.; Lee, J. Influence of Mobile Phase Composition on the Analytical Sensitivity of LC–ESI–MS/MS for the Concurrent Analysis of Bisphenols, Parabens, Chlorophenols, Benzophenones, and Alkylphenols. *Environmental Research* **2023**, *221*, 115305. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115305>.
- (50) Díaz-Cruz, M. S.; López de Alda, M. J.; López, R.; Barceló, D. Determination of Estrogens and Progestogens by Mass Spectrometric Techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS). *Journal of Mass Spectrometry* **2003**, *38* (9), 917–923. <https://doi.org/10.1002/jms.529>.
- (51) Khabazbashi, S.; Engelhardt, J.; Möckel, C.; Weiss, J.; Krueve, A. Estimation of the Concentrations of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls in Human Serum Using Ionization Efficiency Prediction for Electrospray. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (25), 7451–7460. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04096-2>.
- (52) Little, J. L. Artifacts in Trimethylsilyl Derivatization Reactions and Ways to Avoid Them. *Journal of Chromatography A* **1999**, *844* (1), 1–22. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00267-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00267-8).

- (53) Mohd, M. A. *Advanced Gas Chromatography: Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*; BoD – Books on Demand, 2012.
- (54) Ramos, M. J. G.; Heffernan, A. L.; Toms, L. M. L.; Calafat, A. M.; Ye, X.; Hobson, P.; Broomhall, S.; Mueller, J. F. Concentrations of Phthalates and DINCH Metabolites in Pooled Urine from Queensland, Australia. *Environ Int* **2016**, *88*, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.12.016>.
- (55) Musatadi, M.; Caballero, C.; Mijangos, L.; Prieto, A.; Olivares, M.; Zuloaga, O. From Target Analysis to Suspect and Non-Target Screening of Endocrine-Disrupting Compounds in Human Urine. *Anal Bioanal Chem* **2022**, *414* (23), 6855–6869. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04250-w>.
- (56) González, O.; Alonso, R. M. Chapter 6 - Validation of Bioanalytical Chromatographic Methods for the Quantification of Drugs in Biological Fluids. In *Handbook of Analytical Separations*; Hempel, G., Ed.; Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics; Elsevier Science B.V., 2020; Vol. 7, pp 115–134. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64066-6.00006-X>.
- (57) Musatadi, M.; González-Gaya, B.; Irazola, M.; Prieto, A.; Etxebarria, N.; Olivares, M.; Zuloaga, O. Multi-Target Analysis and Suspect Screening of Xenobiotics in Milk by UHPLC-HRMS/MS. *Separations* **2021**, *8* (2), 14. <https://doi.org/10.3390/separations8020014>.
- (58) García-García, S.; Matilla-González, H.; Peña, J.; del Nogal Sánchez, M.; Casas-Ferreira, A. M.; Pérez Pavón, J. L. Determination of Hydroxy Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Urine Using Automated Microextraction by Packed Sorbent and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Int J Environ Res Public Health* **2022**, *19* (20), 13089. <https://doi.org/10.3390/ijerph192013089>.
- (59) Hong, J. E.; Pyo, H.; Park, S.-J.; Lee, W. Solid-Phase Microextraction with on-Fiber Derivatization for the Determination of Hydroxy-Polychlorinated Biphenyl Compounds in Urine. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *539* (1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.02.065>.
- (60) Lin, M.; Ma, S.; Yu, Y.; Li, G.; Mai, B.; An, T. Simultaneous Determination of Multiple Classes of Phenolic Compounds in Human Urine: Insight into Metabolic Biomarkers of Occupational Exposure to E-Waste. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2020**, *7* (5), 323–329. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00187>.

8. ERANSKINAK

1E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP konposatuen zein trazagarrien ezaugarriak eta datu fisiko-kimikoak.

2E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP zein trazagarrien KM_{inst} eta KM_{proz} , GC-MS bidez neurtuta.

3E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP zein trazagarrien KM_{inst} eta KM_{proz} , LC-MS/MS bidez neurtuta.

4E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP-en (GC-MS bidez) berreskurapen absolutu (%tan), zuzenduak (%tan) trazagarriekin eta zuzenduak (%tan) matrizerara doitzen den kalibratuarekin, bakoitzaren desbideratze estandar erlatiboarekin (%DEE). Erabilitako trazagarria adieraziz.

5E. taula. Kontzentrazio-maila baxuan ($1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) lagin hidrolizatu eta hidrolizatu gabeen lortutako etekin absolutuak (%) eta zuzenduak (%), desbideratze estandar erlatiboak (DEE, %) eta erabilitako trazagarriak behar izan direnean (LC-MS/MS).

6E. taula. Kontzentrazio-maila ertainean ($10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) lagin hidrolizatu eta hidrolizatu gabeen lortutako etekin absolutuak (%) eta zuzenduak (%), desbideratze estandar erlatiboak (DEE, %) eta erabilitako trazagarriak behar izan direnean (LC-MS/MS).

7E. taula. Kontzentrazio-maila altuan ($30 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) lagin hidrolizatu eta hidrolizatu gabeen lortutako etekin absolutuak (%) eta zuzenduak (%), desbideratze estandar erlatiboak (DEE, %) eta erabilitako trazagarriak behar izan direnean (LC-MS/MS).

1E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP konposatuen zein trazagarrien ezaugarriak eta datu fisiko-kimikoak.

Familia	Konposatua	Cas zenbakia	Formula molekularra	Masa molekularra (g/mol)	Masa zehatza (g/mol)	Purut. (%)	pKa	Log D (pH 3, 7, 10)	Etxe komertz.
OH-PAH	1-Naftola	90-15-3	C ₁₀ H ₈ O	144.17	144.05751	98	9.6	2.7; 2.7; 1.7	Merck
	2-Naftola	135-19-3	C ₁₀ H ₈ O	144.17	144.05751	99	9.8	2.7; 2.7; 2.7	Merck
	1-Hidroxifenantrenoa	2433-56-9	C ₁₄ H ₁₀ O	194.23	194.07316	98	9.6	3.7; 3.7; 2.7	Techno Spec
	2-Hidroxifenantrenoa	605-55-0	C ₁₄ H ₁₀ O	194.23	194.07316	98	9.8	3.6; 3.6; 2.9	Techno Spec
	3-Hidroxifenantrenoa	605-87-8	C ₁₄ H ₁₀ O	194.23	194.07316	98	9.8	3.6; 3.6; 2.6	Techno Spec
	4-Hidroxifenantrenoa	7651-86-7	C ₁₄ H ₁₀ O	194.23	194.07316	98.5	9.4	3.6; 3.6; 2.6	Techno Spec
	9-Hidroxifenantrenoa	1689-64-1	C ₁₄ H ₁₀ O	194.23	194.07316	100	9.4	3.6; 3.6; 2.5	Techno Spec
	1-Hidroxipirenoa	5315-79-7	C ₁₆ H ₁₀ O	218.26	218.07316	98	9.5	4.0; 4.0; 3.0	Merck
	2-Hidroxifluorenoa	2443-58-5	C ₁₃ H ₁₀ O	182.22	182.07316	98	9.9	3.4; 3.4; 2.8	Merck
9-Hidroxifluorenoa	1689-64-1	C ₁₃ H ₁₀ O	182.22	182.07316	96	13.9	2.7; 2.7; 2.7	Merck	
Br-Ph	3-Bromofenola	591-20-8	C ₆ H ₅ BrO	173.01	171.95237	NA	8.9	2.4; 2.4; 0.9	Techno Spec
	4-Bromofenola	106-41-2	C ₆ H ₅ BrO	173.01	171.95237	NA	9.1	2.4; 2.4; 1.1	Techno Spec
	2,4-Dibromofenola	615-58-7	C ₆ H ₄ Br ₂ O	251.91	249.86289	NA	7.7	3.2; 3.1; 1.1	Techno Spec
	2,5-Dibromofenola	28165-52-8	C ₆ H ₄ Br ₂ O	251.91	249.86289	96	7.5	3.2; 3.0; 1.1	Techno Spec
	2,6-Dibromofenola	608-33-3	C ₆ H ₄ Br ₂ O	251.91	249.86289	99.8	6.8	3.2; 2.8; 1.1	Techno Spec
	2,4,6-Tribromofenola	118-79-6	C ₆ H ₃ Br ₃ O	330.80	327.77340	98	6.3	4.0; 3.3; 1.9	Techno Spec
OH-PCB	4-Hidoxi-4'-klorobifeniloa	28034-99-3	C ₁₂ H ₉ ClO	204.65	204.03419	99	9.9	3.9; 3.9; 3.2	Accu Standard
	4-Hidoxi-2',3,5'-triklorobifeniloa	78143-73-4	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O	273.54	271.95624	98.3	8.2	5.1; 5.1; 3.2	Accu Standard
	4-Hidoxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa	59512-50-4	C ₁₂ H ₅ Cl ₅ O	342.42	339.87830	99.6	7.6	6.3; 6.3; 4.3	Accu Standard
	4-Hidoxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa	152969-11-4	C ₁₂ H ₅ Cl ₅ O	342.42	339.87830	98	6.4	6.3; 5.7; 4.3	Wellington
	3-Hidoxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa	54284-55-8	C ₁₂ H ₄ Cl ₆ O	376.86	373.83933	98	6.2	6.9; 6.1; 4.9	Wellington

1E. taula. Jarraipena.

Familia	Konposatua	Cas zenbakia	Formula molekularra	Masa molekularra (g/mol)	Masa zehatza (g/mol)	Purut. (%)	pKa	Log D (pH 3, 7, 10)	Etxe komertz.
Trazagarriak	1-[² H ₉]-Hidroxi pirenoa	132603-37-3	C ₁₆ H ₁ D ₉ O	227.30	227.12965	99.4	9.5	4.0; 4.0, 3.0	Techno Spec
	1-[² H ₇]-Naftola	124251-84-9	C ₁₀ H ₁ D ₇ O	151.21	151.10145	99	9.6	2.7; 2.7; 1.7	Techno Spec
	2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola	1219803-14-1	C ₆ H ₁ D ₃ Br ₂ O	254.92	252.88172	99.7	6.8	3.2, 2.8, 1.1	Techno Spec
	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	1219795-42-2	C ₆ H ₁ D ₂ Br ₃ O	332.81	329.78595	99	6.3	4.0, 3.3; 1.9	Techno Spec
	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	-	¹³ C ₁₂ H ₅ Cl ₅ O	-	-	98	-	-	Wellington
Besteak	1-Hidroxi pireno β-D-Glukuronidoa	154717-05-2	C ₂₂ H ₁₈ O ₇	394.37	394.10525	98	3.8	2.0; -1.0; -1.1	TRC canada
	2-Naftol sulfatoa	1733-89-7	C ₁₀ H ₈ O ₄ S	262.32	261.97021	98	-1.8	-0.2; -0.2; -0.2	-

2E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP zein trazagarrien KM_{inst} eta KM_{proz} , GC-MS bidez neurtuta.

Familia	Konposatua	KM_{inst} (ng·g ⁻¹)	KM_{proz} (ng·g ⁻¹)	Familia	Konposatua	KM_{inst} (ng·g ⁻¹)	KM_{proz} (ng·g ⁻¹)
OH-PAH	1-Naftola	11.38	3.69	OH-PCB	4-Hidroxi-4'-klorobifeniloa	2.29	1.24
	2-Naftola	6.64	1.62		4-Hidroxi-2',3,5'-triklorobifeniloa	0.82	1.79
	1-Hidroxifenantrenoa	3.64	1.16		4-Hidroxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa	0.65	1.25
	2-Hidroxifenantrenoa	2.93	1.26		4-Hidroxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa	3.25	6.55
	3-Hidroxifenantrenoa	0.81	0.32		3-Hidroxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa	0.76	1.85
	4-Hidroxifenantrenoa	2.97	2.03	Trazagarriak	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	2.79	1.40
	9-Hidroxifenantrenoa	2.95	1.76		1-[² H ₇]-Naftola	11.74	1.54
	1-Hidroxipirenoa	2.80	2.73		2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola	56.21	42.16
	2-Hidroxifluorenoa	3.05	1.13		2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	8.21	2.79
	9-Hidroxifluorenoa	2.96	0.84		4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂]bifeniloa	0.90	1.43
Br-Ph	3-Bromofenola	8.04	2.21				
	4-Bromofenola	15.08	7.27				
	2,4-Dibromofenola	7.90	1.97				
	2,5-Dibromofenola	15.71	4.32				
	2,6-Dibromofenola	>50	>15.00				
	2,4,6-Tribromofenola	7.90	9.02				

3E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP zein trazagarrien KM_{inst} eta KM_{proz} , LC-MS/MS bidez neurtuta.

Familia	Analitoa	Fase mugikor optimoa	Fase mugikor azidoa		Fase mugikor basikoa	
			KM_{inst} (ng·g ⁻¹)	KM_{proz} (ng·g ⁻¹)	KM_{inst} (ng·g ⁻¹)	KM_{proz} (ng·g ⁻¹)
OH-PAH	Naftolak	Basikoa	>25	>0.81	0.39	0.07
	Fenantrenoak	Basikoa	/	/	2.07	0.18
	OH-pirenoa	Basikoa	>25	>0.63	0.10	0.008
	OH-fluorenoak	-	*	*	/	/
Br-Ph	Bromofenolak	Basikoa	24.71	1.12	2.67	0.30
	Dibromofenolak	Basikoa	/	/	2.74	0.43
	Tribromofenol	Basikoa	9.60	0.23	4.75	0.36
OH-PCB	PentaPCB	-	/	/	/	/
	TriPCB	Basikoa	>25	>0.68	10.43	0.71
	MonoPCB	Basikoa	*	*	4.49	0.34
	HexaPCB	Basikoa	>25	>0.54	22.34	1.31
Trazagarriak	1-[² H ₇]-Naftola	Basikoa	5.11	0.78	1.30	0.27
	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	Basikoa	>25	>1.81	3.43	0.53
	2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola	Basikoa	/	/	8.87	1.53
	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	-	/	/	*	*
	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	-	/	/	/	/
Besteak	1-Hidroxipireno β-D-Glukuronidoa	Basikoa	/	/	10.73	1.44
	2-Naftol sulfatoa	Basikoa	/	/	>25	5.37

* : Ionizatu ezin dela baldintza horretan esan nahi du. / : ionizatzen den arren, ezin izan da kalibratu baldintza horretan.

4E. taula. Aztergai diren 21 OH-POP-en (GC-MS bidez) berreskurapen absolutu (%tan), zuzenduak (%tan) trazagarriekin eta zuzenduak (%tan) matrizerara doitzen den kalibratuarekin, bakoitzaren desbideratze estandar erlatiboarekin (%DEE). Erabilitako trazagarria adieraziz.

		Absolutua		Zuzendua (trazagarri)		Trazagarria	Zuzendua (matrizerara doitutako kalibratua)	
Familia	Konposatua	Berreskurapen (%)	DEE (%)	Berreskurapen (%)	DEE (%)		Berreskurapen (%)	DEE (%)
OH-PAH	1-Naftola	46	15	128	15	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	112	15
	2-Naftola	62	14	166	22	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	87	14
	1-Hidroxifenantrenoa	47	7	138	18	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	81	7
	2-Hidroxifenantrenoa	35	6	102	16	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	71	6
	3-Hidroxifenantrenoa	38	6	111	15	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	65	6
	4-Hidroxifenantrenoa	22	5	76	19	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	66	5
	9-Hidroxifenantrenoa	25	29	84	7	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	70	29
	1-Hidroxipirenoa	15	34	75	9	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	56	34
	2-Hidroxifluorenoa	41	10	118	22	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	70	10
9-Hidroxifluorenoa	53	10	149	22	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	84	10	
Br-Ph	3-Bromofenola	55	9	156	1	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	128	9
	4-Bromofenola	31	1	89	10	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	81	1
	2,4-Dibromofenola	31	35	99	5	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	117	35
	2,5-Dibromofenola	31	34	98	4	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	107	34
	2,6-Dibromofenola	50	40	143	9	2,4,6-Tribromo-[² H ₂]-fenola	*	*
	2,4,6-Tribromofenola	13	30	143	30	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	72	30
OH-PCB	4-Hidroxi-4'-klorobifeniloa	28	10	99	28	1-[² H ₉]-Hidroxipirenoa	66	10
	4-Hidroxi-2',3,5'-triklorobifeniloa	7	23	74	14	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	12	23
	4-Hidroxi-2,2',4',5,5'-pentaklorobifeniloa	8	12	85	19	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	14	12
	4-Hidroxi-2,3,3',4',5-pentaklorobifeniloa	7	20	79	8	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	13	20
	3-Hidroxi-2,2',4,4',5,5'-hexaklorobifeniloa	6	18	66	15	4-Hidroxi-2',3,4',5,5'-pentakloro[¹³ C ₁₂] bifeniloa	6	18

5E. taula. Kontzentrazio-maila baxuan ($1 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) lagin hidrolizatu eta hidrolizatu gabean lortutako etekin absolutuak (%) eta zuzenduak (%), desbideratze estandar erlatiboak (DEE, %) eta erabilitako trazagarriak behar izan direnean (LC-MS/MS).

Familiak	Konposatuak	Absolutuak		Zuzenduak		Trazagarria
		Berreskurapen (%)	DEE (%)	Berreskurapen (%)	DEE (%)	
OH-PAH	Naftolak	45	10	115	11	1-[² H ₇]-Naftola
	Fenantrolak	106	12	106 ^a	12	-
	OH-pirenoa	92	23	92 ^a	23	-
Br-Ph	Bromofenolak	98	12	98 ^a	12	-
	Dibromofenolak	81	32	123	7	2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola
	Tribromofenol	196	22	196 ^a	22	-
OH-PCB	TriPCB	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-
	MonoPCB	108	32	108 ^a	32	-
	HexaPCB	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-

^a : Trazagarriekiko zuzenketarik ez

6E. taula. Kontzentrazio-maila ertainean ($10 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) lagin hidrolizatu eta hidrolizatu gabean lortutako etekin absolutuak (%) eta zuzenduak (%), desbideratze estandar erlatiboak (DEE, %) eta erabilitako trazagarriak behar izan direnean (LC-MS/MS).

Familiak	Konposatuak	Absolutuak		Zuzenduak		Trazagarria
		Berreskurapen (%)	DEE (%)	Berreskurapen (%)	DEE (%)	
OH-PAH	Naftolak	37	5	108	13	1-[² H ₇]-Naftola
	Fenantrolak	83	9	83 ^a	9	-
	OH-pirenoa	80	20	80 ^a	20	-
Br-Ph	Bromofenolak	71	1	71 ^a	1	-
	Dibromofenolak	57	8	112	8	2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola
	Tribromofenol	121	9	121 ^a	9	-
OH-PCB	TriPCB	127	20	127 ^a	20	-
	MonoPCB	87	9	87 ^a	9	-
	HexaPCB	154	21	154 ^a	21	-

^a: Trazagarriekiko zuzenketarik ez

7E. taula. Kontzentrazio-maila altuan (30 ng·g⁻¹) lagin hidrolizatu eta hidrolizatu gabeen lortutako etekin absolutuak (%) eta zuzenduak (%), desbideratze estandar erlatiboak (DEE, %) eta erabilitako trazagarriak behar izan direnean (LC-MS/MS).

Familiak	Konposatua	Absolutuak		Zuzenduak		Trazagarria
		Berreskurapen (%)	DEE (%)	Berreskurapen (%)	DEE (%)	
OH-PAH	Naftolak	40	3	111	17	1-[² H ₇]-Naftola
	Fenantrolak	85	10	85 ^a	10	-
	OH-pirenoa	93	9	93 ^a	9	-
Br-Ph	Bromofenolak	67	12	67 ^a	12	-
	Dibromofenolak	48	19	114	15	2,6-Dibromo-[² H ₃]-fenola
	Tribromofenol	99	6	99 ^a	6	-
OH-PCB	TriPCB	110	11	110 ^a	11	-
	MonoPCB	99	5	99 ^a	5	-
	HexaPCB	128	36	128 ^a	36	-

^a: Trazagarriekiko zuzenketarik ez