



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Ingurumen-kutsaduraren isla
jaioberrien lehen elikagaien:
substantzia arrotzen analisia ama-
esnean**

*Inés Baciero Hernandez,
Maidier Ayerra,
Mikel Musatadi Larrucea,
Maitane Olivares Zabalandikoetxea,
Ailette Prieto Sobrino
eta Olatz Zuloaga Zubieta*

271-278 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.34>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Ingurumen-kutsaduraren isla jaioberrien lehen elikagaian: substantzia arrotzen analisisa ama-esnean

Inés Baciero^{1,2}, Maider Ayerra¹, Mikel Musatadi^{1,2}, Maitane Olivares^{1,2}, Ailette Prieto^{1,2}, Olatz Zuloaga^{1,2}

(1) Kimika Analitikoa saila, Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU), 48940 Leioa, Euskadi, Espainia, (2) Itsas Biologia eta Bioteknologia Esperimentalen Ikerketa Zentroa, Euskal Herriko Unibertsitatea (PiE-UPV/EHU), 48620 Plentzia, Euskadi, Espainia.
ines.baciero@ehu.eus

Laburpena

Gaur egun ezagutzen den gaixotasun anitz ingurumen-kutsadurari estuki lotuta dago. Kutsatzaile horien menpe egotearen eta horrek dakartzan osasun-arazoaren ikerketari “esposoma” deritza. Gorputzari arrotzak zaizkion substantziak (xenobiotikoak) eta euren metabolitoak milaka dira eta hainbeste konposatu batera aztertzea erronka handia da analisiaren ikuspegitik. Ondorioz, espektro zabaleko konposatuen analisiak mahaigaineratzen dira. Matrize gisa, ama-esnea jariatzen biologiko interesgarria da, kutsatzaileak hor metatu eta, amaren esposizioa ez ezik, jaioberriarena ere ikertzeko balioko bailuke. Testuinguru horretan, lan honen helburua esnetan 187 xenobiotiko eta metabolito analizatzeko metodoa fintzea da, etorkizunean Ama-Esnearen Euskal Bankura dohaintzan emandako esnea aztertzeko.

Hitz gakoak: esposoma, xenobiotikoak, hidrolisi entzimatikoa, laginaren tratamendua, likido kromatografia, bereizmen handiko masa-espektrometria.

Abstract

A part of current diseases is related to the environmental contamination we are daily exposed to. The study of the exposure and consequent health issues is known as “exposome”. One of the main drawbacks this type of studies own is the huge number of pollutants (and potential metabolites) of interest. Consequently, broad-scoped analyses are suitable options when coping with those numbers. As target matrix, breast milk is of special interest, since contaminants accumulate there, affecting both mother and nursing child. Based on the above mentioned, the aim of this project is to develop analytical procedures to study the presence of 187 xenobiotics and related metabolites in breast milk, to analyze milk samples from the Basque Bank of Breast Milk in the future.

Keywords: exposome, xenobiotics, enzymatic hydrolysis, sample treatment, liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry.

1. Sarrera eta motibazioa

Gizakiak ingurumen-kutsatzaileekiko esposizio etengabea jasaten du, kutsatutako airea arnastuz edo elikagaiak, edateko ura edo hautsa barneratuz (Roosens et al., 2010). Kutsatzaileekiko giza-esposizioa osasun publikoaren arloko kezka nagusietakoa da (Beser et al., 2019), gizakiak kaltegarriak izan daitezkeen ingurumeneko hainbat kimikoren eraginpean baitaude. Minbizia, gaixotasun kardiobaskularrak, arnas-gaixotasunak eta 2. motako diabetesa, besteak beste, giza populazioetako erikortasun- eta hilkortasun-kausa nagusien artean daude; aitzitik, aldaketa genetikoez gaixotasun konplexu horien kausen zati txikia baino ez dute azaltzen, gaixotasun horien askoren eragilea ingurumen-kutsatzaileekiko esposizioa baita (Cui et al., 2016).

2005ean, Christopher Wild doktoreak, Minbizia Ikertzeko Nazioarteko Agentziako zuzendariak, lehengo aldiz *esposoma* terminoa definitu zuen “jario aurreko garaitik pertsona baten bizitzan zehar gertatzen diren ingurumen-erakusketen bizi-ikastaroa” bezala (Wild, 2005). Gaur egun, esposoma terminoa bizitzako etapa guztietako ingurumen-esposizio osoari erreferentzia egiteko erabili da eta, zalantzarik gabe, gaixotasun kronikoen garapenean funtsezko zeregina duela adierazi da (Wild, 2012).

Eguneroko jarduerak eta industriak, besteak beste, organismo baten ohiko osaketan edo metabolismoan ezohikoak diren edo batera agertzen ez diren osagaiak (xenobiotikoak) askatzen dituzte ingurumenara. XX. mendean zehar, kutsatzaile organiko anitz isuri zen atmosferara,

bifenilo polikloratuak (PCBak), plagizida organokloratuak (OCPak) edo hidrokarburo aromatiko poliziklikoak (PAHak), besteak beste (van der Oost et al., 2003). Haatik, horiek oraindik aurkitzen diren arren, gaur egun aski ezaguna da gizakiak bestelako kutsatzaileen eragina jasaten duela. Horien artean, aipagarri dira farmakoak eta norberaren zaintzarako produktuak (Daughton & Ternes, 1999; Liu et al., 2020; Yang et al., 2017), surfaktante diren konposatu per- eta polifluoroalkilatuak (PFASak) (Gomis et al., 2018; Wang et al., 2017) eta pestizida modernoak (Wang et al., 2023).

Kutsatzaileen presentzia ingurumenean aztertu da, baina, azken urteotan, arreta berezia jarri zaie matrize biologikoetako esposizio-biomarkatzaileei; gernuan, plasman edo ama-esnean ingurumen-kutsatzaileen gorputz-karga ebaluatu nahian (Wild, 2012). Ama-esnea konposizioz etengabe aldatzen ari den matrize konplexua da (Lehmann et al., 2018) eta, gizakion lehen elikagaia izanik, interesgarria da hura aztertzea xenobiotikoen presentziari dagokionez. Izan ere, edoskitzeak abantaila ugari eskaintzen dizkie haurrei, hazkuntzan eta garapen kognitibo, psikologiko zein immunologikoan (Anadón et al., 2017); aitzitik, kutsatzaile desberdinak amaren odoletik esnera transferi daitezke eta bular-esnea izan umeentzako zeharkako kutsadura-iturri (Lehmann et al., 2018).

Testuinguru horretan, eta kontuan izanda matrize ez-inbaditzailea eta gantzetan aberatsa dela, ama-esnea kutsatzaileekiko esposizioa ebaluatzeko iturri aproposa da (Huang et al., 2020).

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Esnea bezalako jariakin koipetsuetan, traza-mailako kutsatzaile anitzen analisia erronka handia da (Baduel et al., 2015). Halaber, matrize konplexua ez ezik, esneak konposizio hagitx aldakorra erakusten du. Horrek konposatu polarren zehazpena zaildu egiten du (Adenuga et al., 2020) eta literaturako analisi gehienak natura ez-polarreko lehentasunezko konposatu klasikoetara mugatuta daude (Baduel et al., 2015).

Esposomaren ikerketak intereseko analito anitz du, ondorioz, jarraituriko metodologia analitikoak ezin du oso espezifikoa izan, alderantziz, analito-helmen ahalik eta orokorra izan behar du, esposizio potentzialen argazkirik osoena izateko (Díaz et al., 2012). Horretan oinarrituta, laginaren tratamenduari dagokionez, intereseko konposatuak esnetik erauzteko, ohikoa da likido-likido erauzketa erabiltzea (LLE) (Baduel et al., 2015; Lopes et al., 2016); lorturiko erauzketa sakonago purifikatzeko tekniken artean, ordea, proteinen hauspeaketa hotza, fase solidoko erauzketa (SPE) eta tamainaren bidezko garbiketa-zutabeak (iragazkiak) dira aipagarri (Devanathan et al., 2012; Lopes et al., 2016; Musatadi et al., 2021).

Analisiari begira, likido-kromatografia (LC) konposatu organiko polarren detekzioaren aurretik asko erabiltzen den separazio-teknika da (Jamin et al., 2014). Detekzio-etapari dagokionez, masa-espektrometria (MS) da lan berrietan gehien erabiltzen dena (Baduel et al., 2015; Hermo et al., 2008). Horretan, azpimarratzekoa da bereizmen altuko tandem masa-espektrometria (HRMS/MS), zeinak analisi bideratua ez ezik, bideratu gabeko analisiak egiteko aukera ematen duen. Labur, susmagarrien analisi ez-bideratuan, laginean egon litezkeen konposatuak (susmagarriak, “ezagun ezezagunak”) milaka sarrerako zerrendetan bilduta daude. Aldi berean, HRMS/MS detektagailuak laginean dauden konposatu ugarienen analisia ahalbidetzen du (eta ez konposatu zehaztuena), horrela, laginaren analisi “osoa” aurrera eraman daiteke. Amaieran, zerrendak eta laginean aurkitutakoa konparatuz, esposomikari askoz hobeto egokitzen zaion susmagarrien analisia eraman daiteke aurrera.

Arestian azalduko kontuan hartuz, jarraian aurkezten den proiektuaren helburua ama-esnean LC-HRMS/MS bidezko xenobiotiko analisia burutzeko metodo analitikoak fentzea da, ikerketataldearen aurreko aurkikuntzetan oinarrituta (Musatadi et al., 2021). Bilatzen den metodo analitikoaren jomuga analito-helmen handia izatea da; hori lortzeko, ohiko erabilerako farmakoak, kosmetikoen osagaiak, pestizidak, plastifikatzaileak, gehigarriak industrialak eta abar jasotzen dituen xenobiotiko-sorta aztertu da, abiapuntua 187 konposatu izanik (bai xenobiotiko askeak bai horien I. eta II. faseko zenbait metabolito kontsideratuz). Garaturiko metodo analitikoak

behin berretsita, lagin errealei aplikatu ahalko zaie eta, etorkizunari begira, susmagarrien analisira mugituko da. Amaieran, proiektu honek Ama-Esnearen Euskal Bankuko laginak aztertzea du helburu, Euskadi-mailan bular-emaileen esposizioa aztertzeko.

3. Ikerketaren muina

Lan honen ekarpena Musatadiren eta lankideen protokoloaren bi urratsetan ardatzu da (Musatadi et al., 2021). Labur, analitoen erauzketa burutzeko, 1 mL ama-esneri gatz-sorta (0.5 g sodio sulfato eta 0.1 g sodio kloruro) eta erauzlea (3 mL azetonitrilo) gehitu zaizkio. Vortex bidezko irabiaketaren eta zentrifugazioaren ostean, analitodun fase organikoa banatu eta izozkailuan (-20 °C) gorde da 12 orduz, igarotako proteinak desnaturalizatu eta hauspeatzeko. Fase garbia berriz banatu eta iragazki polimerikoen bidezko garbiketa jasan du. Azken erauzia N₂ korrontepEAN (35 °C) kontzentratu eta % 20 dimetil sulfoxidotan (DMSO) den ur-disoluzioan berrerratu da, iragazi (0.22 µm-ko poro-diametroa) eta LC-HRMS/MS bidez analizatzeko.

Aurrekoa abiapuntu gisa hartuta, alde batetik, garbiketa-urratsean iragazki polimeriko gehiago frogatu da, baita gorabidean dagoen *Dilute & Shoot* delakoa egokitu ere. Bestetik, esnean egon litezkeen kutsatzaile metabolizatuak ere kontuan hartu nahi izan dira; horretarako, entzima bidezko hidrolisiak proposatu dira. Gainerako parametroak (bai erauzketaren optimizazioa, bai analisi instrumentalaren nolakotasunak) berdin mantendu dira (Musatadi et al., 2021). Oro har, laginaren tratamendua berez luzea ez den arren, 2-3 egunetan zehar banatu behar da, 12 orduko proteinen hauspeaketa hotza gauan zehar burutzen da-eta, baita hidrolisi-baldintza batzuk ere (ikus 3.2 atala). Analisi instrumentalari dagokionez, 25 minutu behar dira lagineko.

Laborategiko protokoloa doitzeko, ama-esnari intereseko analitoak gehitu zaizkio tratamenduren puntu ezberdinetan: aldaera bakoitzari dagokionez, hiru erreplika hasieran dopatu dira (hots, analitoak 1 mL esneri gehitu zaizkio zuzenean) eta beste hiru erreplika, ordea, protokoloa bukatu baino arinago, justu analisi instrumentalaren aurretik. Bi kasuetan, azken erauzian analito bakoitzaren 100 ng/g izatea espero da. Estrategia horrekin, alde batetik, konposatu bakoitza zer ehunekotan berreskuratu den kalkula daiteke (1. formula), hasieran dopatu diren eta protokolo osoa jasan duten laginez baliatuz. Bestetik, justu bukaeran dopatu diren laginetan, idealki, % 100eko berreskurapena espero da, kasu horretan ez baita egon galerarik eragingo duen inolako tratamendurik. Haatik, matrizeak berak (kasu honetan, esnearen bestelako osagaiek) analitoen seinalean eragin dezake, horren intentsitatea handituz edo murriztuz (Niessen et al., 2006). Desbiderapen horri, alegia, “matrize-efektu” deritzo (ikus 2. formula). Matrize-efektuaren balioa zero baino handiagoa denean matrize-efektu positiboa dugula deritzogu, zero azpitik dagoenean, ordea negatiboa. Helburua, ka, matrize-efektua minimizatzea da; hots, % Otik gertu egotea bilatuko da (matrize-efektua nulua izanik kasu horretan).

$$\text{Berreskurapena (\%)} = \frac{\text{detektatutako analito-masa}}{\text{hasieran gehitutako analito-masa}} \cdot 100 \quad (1)$$

$$\text{Matrize - efektua (\%)} = \left(1 - \frac{\text{detektatutako analito-masa}}{\text{analisisa baino lehen gehitutako analito-masa}} \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Azkenik, laginaren tratamenduan zehar albo-kutsadurarik ez dagoela bermatzeko, hiru esnezuriak (analitorik gehitu ez zaienak) ere kontsideratu dira. Guztira, burututako baldintza esperimental bakoitzarekin bakoitzarekin bederatzi esne-erreplika tratatu dira (hiru zuri, hiru hasieran dopatuak eta hiru amaieran dopatuak).

Aurkeztutako aldagai horietaz baliatuz, laginaren garbiketa (ikus 3.1 atala) eta aurretiazko hidrolisi entzimatikoa (3.2 atala) aztertu eta findu dira. Lehendabizikoan, erauzketan eramandako interferentziak kentzea bilatu da, bai matrize-efektua bai analito-galerak minimoak izan daitezen. Hidrolisi entzimatiakoaren kasuan, esneak izan litzakeen kutsatzaileen glukuronidoak eta sulfatoak modu eraginkorrean liseritzeko baldintza anitz frogatu da. Aipatzekoa da jarraian ageri diren emaitzak ikerketaren laburpena direla eta erabilitako analito-zerrenda osoa, bakoitzaren parametro guztiak eta gainerako xehetasun oro prestaketan dagoen artikulu zientifikoan aurkeztuko direla (Baciero et al., argitaratu gabe).

3.1 Laginaren garbiketa: iragazki polimerikoak eta *Dilute and Shoot* (D&S)

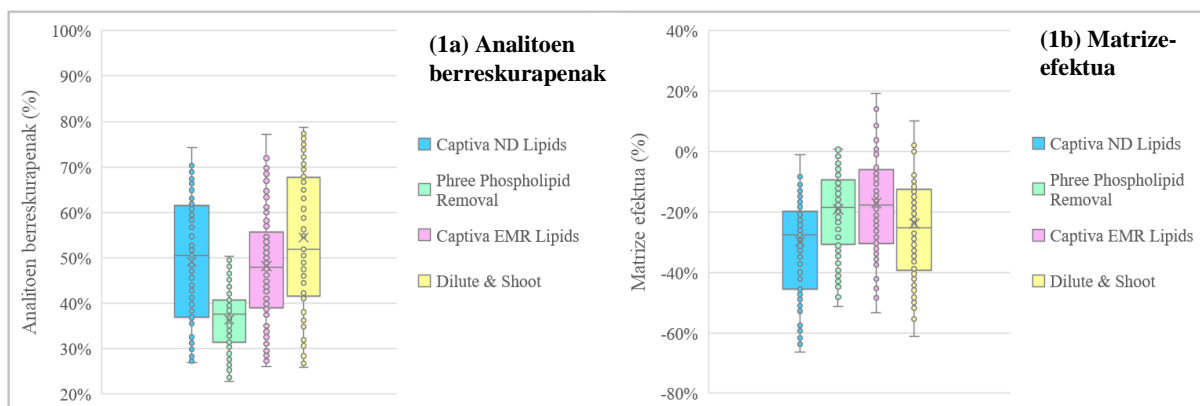
Garbiketa-urratsaren doikuntzan, lau izan dira erkaturiko metodologiak: hiru iragazkien bidezko purifikazio eta garbiketa-urratsik gabeko prozedura (*Dilute and Shoot*, D&S). Laurak proteinak hotzean hauspeatzeko urratsaren ostean ezarri dira. Hain zuzen, hiru iragazkiak *Captiva ND Lipids* (hemendik aurrera, “Captiva ND”) (Musatadi et al., 2021), *Captiva EMR Lipids* (“Captiva EMR”) eta *Phree Phospholipid Removal* (“Phree”) dira, bakoitza bere zehazpen teknikoekin erabilerari dagokionez (jasan dezakeen lagin kantitatea, lagin horren osagai organikoaren proportzioa eta abar). D&Sri dagokionez, hauspeatutako proteinak kendu ostean, erauziak zuzenean kontzentratu dira, analisirako % 20 DMSOtan den ur-disoluziora eramateko.

Aipaturiko lau aldaeren etekinak eta kasuan kasu pairaturiko matrize-efektua, hurrenez hurren, 1. irudian ikus daitezke. Oro har, etekin egokiak lortu dira bi Captiva iragazkiekin eta D&S metodologiarekin; Phree filtroek, ordea, berreskurapen hagitz baxuak eman dituzte (1a). Estatistikoki (% 95eko konfiantza-mailan), hala frogatu da: Phree iragazkiek berreskurapen baxuagoak lortu dituzte beste hiru metodoekiko erkatuta ($p < 0,05$); aldi berean, D&S izan da berreskurapen altuenak izan dituen aldaera ($p < 0,05$) eta, azkenik, bi Captiva metodoen batezbestekoak konparagarriak izan dira ($p > 0,05$).

Aurrekoaz aparte, tratamendu bakoitza zenbat analito kuantitatiboki berreskuratzekeo gai den begiratu da; hots, zenbat konposatu detektatu daitezkeen % 30-130 bitarteko berreskurapenekin. Proposatutako 187 xenobiotikoetatik, Captiva EMR izan da kopuru handiena berreskuratzea ahalbidetu duena: iragazki-mota horrek konposatuen % 62 izan du % 30-130 tartean; gainerako bideek, aldiz, ez hainbeste (Captiva NDk % 55, Phreek % 43 eta D&Sek % 52).

Matrize-efektuari begira (1b), amaieran dopaturiko laginen artean, seinaleek desbiderapen handiena jasan dute Captiva ND eta D&S protokoloekin eta bi horiek elkarrekiko konparagarriak dira % 95eko konfiantza-mailan ($p > 0,05$). Haatik, Phree eta Captiva EMR iragazkiek matrize-efektu txikiagoa erakutsi dute aurreko biek baino ($p < 0,05$). Era berean, Phree eta Captiva EMR protokoloen artean ez dago ezberdintasun esanguratsurik matrize-efektuari dagokionez ($p > 0,05$). Aitzitik, aipatzekoa da laborategian ikusi dela Captiva EMR filtroek hoberen kentzen dituztela esnearen gantzak; izan ere, gainerako kasuetako erreplika batzuetan fase lipidiko apurra ikus zitekeen.

1. irudia. Hurrenez hurren, garbiketa bakoitzarekin izandako analitoen berreskurapen-maila (1a) eta jasandako matrize-efektua (1b).



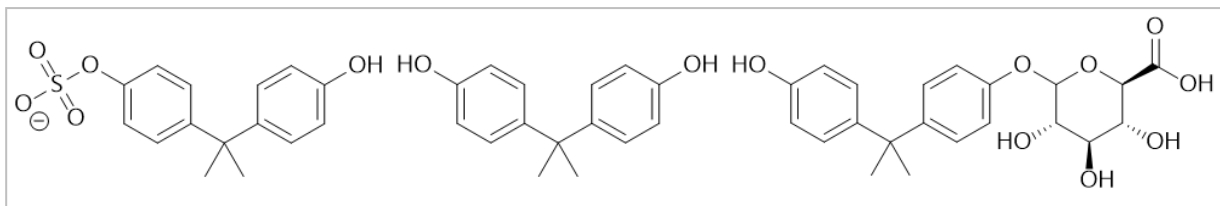
Atal honetan azaldutakoa kontuan hartuz, lehenik eta behin, Phree iragazkien bidea baztertu egin da, analito-galera handienak izan dituelako. Gainerakoan artean, D&Sek izan ditu konposatuen banakako berreskurapen handienak, baina baita matrize-efektu handienetarikoa ere (Captiva NDrekin batera). Captiva NDk eta EMRk konposatuen banakako berreskurapen konparagarriak izan dituzte, baina bigarrenak analito gehiago berreskuratu ditu, matrize-efektu txikiagoarekin gainera. Ondorioz, Captiva ND ere baztertu da, EMRren alde. Azkenik, nahiz eta

D&Sek berreskurapen indibidual hobeak izan, Captiva EMRk analito gehiago berreskuratu ditu kuantitatiboki (% 62, D&Sren % 52ren aurrean). Egia da bere berreskurapen indibidualak ez direla D&Srenak baino hobeak izan; hala eta guztiz ere, egokiak izan dira. Halaber, matrize-efektu urriagoa pairatu da EMRren bidean; begi-bistaz erauzi garbiagoak erakutsiz, gainera. Hori guztia dela bide, Captiva EMR hautatu da garbiketa optimo gisa.

3.2 Hidrolisi entzimatikoa: β -glukuronidasa vs. β -glukuronidasa/arilsulfatasa

Ama-esnean, eraldatu gabeko kutsatzaileak aurki daitezke, baina espero izatekoa da eurek prozesu metabolikorik pairatzea, hori baita gorputzaren mekanismoa substantzia arrotzak kanporatzeko. Hori horrela, jariakin biologikoan xenobiotiko-zama osoa kuantifikatzea da interesgarria (zatiki askea gehi glukuronido eta/edo sulfato eran dagoena, ikus 2. irudia).

2. irudia. A bisfenola (erdian) eta bere bi metabolito: sulfatoa (ezkerrean) eta glukuronidoa (eskuinean).



Horretarako, aurkeztutako metodoan entzimen bidezko hidrolisia txertatzea frogatu da, esneak eduki litzakeen xenobiotikoen glukuronidoak eta sulfatoak askatzeko. Hain zuzen, erauzketa baino lehen, esnari hidrolasa entzimak gehitu zaizkio. Halaber, euren funtzioa betetzeko, entzimek tenperatura eta pH jakinak behar dituzte; baldintzok bermatzeko, 200 μ L disoluzio indargetzaile gehitu zaio 1 mL esneri eta laginak 37 °C-an inkubatu dira. Oro har, burututako frogetan entzima-mota, kantitate eta inkubazio-tarte ezberdinak kontsideratu dira, 1. taulan jasota:

1. taula. Hidrolisi entzimatikorako frogatu diren baldintzen aldagaien balioak.

Baldintza-sorta	Entzima mota	Entzima kantitatea eta lanerako pHa	Inkubazio-denbora
A	β -glukuronidasa (<i>Helix pomatia</i>)	20 μ L; pH 5,0	2 h
B	β -glukuronidasa/arilsulfatasa (<i>Helix pomatia</i>)	10 μ L; pH 5,5	2 h
C	β -glukuronidasa/arilsulfatasa (<i>Helix pomatia</i>)	50 μ L; pH 5,5	2 h
D	β -glukuronidasa/arilsulfatasa (<i>Helix pomatia</i>)	50 μ L; pH 5,5	12 h

Baldintzak antolatzerako orduan, abiapuntua ikerketa-taldearen aurreko lanetan erabilitakoak izan dira (Musatadi et al., 2022). Horretan, β -glukuronidasa entzimaren bidezko hidrolisirako parametroak jadanik findu ziren; hortaz, lehendabiziko baldintza-sorta eurek ontzat emandakoa izan da (1. taulan, A esperimntua). Aitzitik, sulfatoen presentzia ere kontuan hartzeko, oraingoa sulfatasa funtziodun entzima frogatu nahi izan da (B-D esperimntuak), hidrolisi “arinagoak” (B) zein “bortitzagoak” (D) probatuz, entzima-kantitateari eta inkubazio-denborari dagokionez.

Atal hori aztertzeke erabilitako metabolitoei begira, jadanik erabilitako kutsatzaileen forma glukuronidoak eta sulfatoak kontsideratu dira. Gainera, glukuronidoen kasuan, azido glukuronikoa molekularen amina-taldee (N-Gluk), alkoholei (O-Gluk) edota azido karboxilikoei (COO-Gluk) lot dakieke, hidrolisiaren eraginkortasuna ezberdin suertatuz, kasuan kasu (Dwivedi et al., 2018). Ondorioz, glukuronidoak aukeratzeko orduan, hiru motetatik gutxienez bana kontsideratu da. Guztira, bi O-glukuronidoren, N- eta COO-glukuronido banaren eta bi sulfatoren jokabidea aztertu da, proposaturiko A-D baldintza hidrolitikoetan.

Jasotako emaitzei dagokionez, O-glukuronidoak eta bi sulfatoak frogatutako lau baldintzetan kuantitatiboki (% 95-100) liseritu dira. N- eta COO-glukuronidoei dagokionez, hidrolisi-tasa maximoa D baldintzetan eman da, forma metabolizatuen konbertsioa % 63 eta % 100 izanik, hurrenez hurren. Hori horrela, entzima bidezko hidrolisirako D baldintzak hartu dira ontzat.

4. Ondorioak

Aurkeztutako proiektuan, ama-esnean xenobiotiko anitzen presentzia aztertzeke metodo analitikoa findu da. Horrela, protokoloaren garbiketa-urratsa ondu da, analitoen berreskurapen-eteekin hobetu eta matrize-efektua urritzen duten Captiva EMR Lipids iragazkiak inplementatuta. Era berean, xenobiotiko askeez aparte, forma metabolizatuak ere kontuan hartzeko, hidrolisi-urrats kuantitatiboa gehitu da. Azken horretan, hala ere, N-glukuronidoekin froga gehiago egin liteke, proposatutako digestio-baldintzak ez baitira nahikoak izan horiek guztiz askatzeko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Findutako metodoa prest dago kontzentrazio-maila ezberdinetan berretsia izateko eta hori izango da ikerketaren ondorengo urratsa. Behin metodoa berretsi dela, lagin errealetan aplikagarri izango da eta, analisi bideratuaz aparte, susmagarrien analisia burutzea ahalbidetuko du; hori baita, azken finean, azaldutako ikerketa mahaigaineratzearen zergatia. Horrela, azter daitekeen konposatu-espektro zabalaz baliatuz, ama-esnean esposoma aztertzeke erramintak lortuko dira. Hain zuzen, aipatutako susmagarrien analisi bakoitzean, aldibereko 14.000 susmagarrien ikerketa eramango da aurrera. Izan ere, bereizmen altuko masa espektrometriak (HRMS) aurretiaz estandar kimikoak erosi gabe susmagarrien analisia aurrera eramatea bermatzen du. Amaitzeko, landutako analisi-metodoak erabiliz, etorkizun hurbilean, Ama-Esnearen Euskal Bankuko laginak ikertuko dira, Euskadi-mailan bular-emaileen esposizioa argitzeko.

6. Erreferentziak

- Adenuga, A. A., Ayinuola, O., Adejuyigbe, E. A., & Ogunfowokan, A. O. (2020). Biomonitoring of phthalate esters in breast-milk and urine samples as biomarkers for neonates' exposure, using modified quechers method with agricultural biochar as dispersive solid-phase extraction absorbent. *Microchemical Journal*, *152*, 104277. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104277>
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M. R., Ares, I., Castellano, V., & Martínez, M. A. (2017). Drugs and Chemical Contaminants in Human Breast Milk. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (or. 67–98). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804239-7.00005-6>
- Baduel, C., Mueller, J. F., Tsai, H., & Gomez Ramos, M. J. (2015). Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, *1426*, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.040>
- Beser, M. I., Pardo, O., Beltrán, J., & Yusà, V. (2019). Determination of 21 perfluoroalkyl substances and organophosphorus compounds in breast milk by liquid chromatography coupled to orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *1049*, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.10.033>
- Cui, Y., Balshaw, D. M., Kwok, R. K., Thompson, C. L., Collman, G. W., & Birnbaum, L. S. (2016). The Exposome: Embracing the Complexity for Discovery in Environmental Health. *Environmental Health Perspectives*, *124*(8), A137-A140. <https://doi.org/10.1289/EHP412>
- Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives*, *107*, 32.
- Devanathan, G., Subramanian, A., Sudaryanto, A., Takahashi, S., Isobe, T., & Tanabe, S. (2012). Brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk from several locations in India: Potential contaminant sources in a municipal dumping site. *Environment International*, *39*(1), 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.10.005>

- Díaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V., & Hernández, F. (2012). Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS. *Anal. Methods*, 4(1), 196–209. <https://doi.org/10.1039/C1AY05385J>
- Dwivedi, P., Zhou, X., Powell, T. G., Calafat, A. M., & Ye, X. (2018). Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers. *Chemosphere*, 199, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.177>
- Gomis, M. I., Vestergren, R., Borg, D., & Cousins, I. T. (2018). Comparing the toxic potency in vivo of long-chain perfluoroalkyl acids and fluorinated alternatives. *Environment International*, 113, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.01.011>
- Hermo, M. P., Nemetlu, E., Kir, S., Barrón, D., & Barbosa, J. (2008). Improved determination of quinolones in milk at their MRL levels using LC–UV, LC–FD, LC–MS and LC–MS/MS and validation in line with regulation 2002/657/EC. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.045>
- Huang, M., Li, J., Xiao, Z., & Shi, Z. (2020). Tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane isomers in breast milk from the general population in Beijing, China: Contamination levels, temporal trends, nursing infant’s daily intake, and risk assessment. *Chemosphere*, 244, 125524. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125524>
- Jamin, E. L., Bonvallot, N., Tremblay-Franco, M., Cravedi, J.-P., Chevrier, C., Cordier, S., & Debrauwer, L. (2014). Untargeted profiling of pesticide metabolites by LC–HRMS: An exposomics tool for human exposure evaluation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(4), 1149–1161. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7136-2>
- Lehmann, G. M., LaKind, J. S., Davis, M. H., Hines, E. P., Marchitti, S. A., Alcalá, C., & Lorber, M. (2018). Environmental Chemicals in Breast Milk and Formula: Exposure and Risk Assessment Implications. *Environmental Health Perspectives*, 126(9), 096001. <https://doi.org/10.1289/EHP1953>
- Liu, N., Jin, X., Feng, C., Wang, Z., Wu, F., Johnson, A. C., Xiao, H., Hollert, H., & Giesy, J. P. (2020). Ecological risk assessment of fifty pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Chinese surface waters: A proposed multiple-level system. *Environment International*, 136, 105454. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105454>
- Lopes, B. R., Barreiro, J. C., & Cass, Q. B. (2016). Bioanalytical challenge: A review of environmental and pharmaceuticals contaminants in human milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 318–325. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.06.012>
- Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2021). Multi-Target Analysis and Suspect Screening of Xenobiotics in Milk by UHPLC–HRMS/MS. *Separations*, 8(2), 14. <https://doi.org/10.3390/separations8020014>
- Musatadi, M., Caballero, C., Mijangos, L., Prieto, A., Olivares, M., & Zuloaga, O. (2022). From target analysis to suspect and non-target screening of endocrine-disrupting compounds in human urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 414(23), 6855–6869. <https://doi.org/10.1007/s00216-022-04250-w>
- Niessen, W. M. A., Manini, P., & Andreoli, R. (2006). Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography–mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 25(6), 881–899. <https://doi.org/10.1002/mas.20097>
- Roosens, L., D’Hollander, W., Bervoets, L., Reynders, H., Van Campenhout, K., Cornelis, C., Van Den Heuvel, R., Koppen, G., & Covaci, A. (2010). Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals, two groups of persistent contaminants in Belgian human blood and milk. *Environmental Pollution*, 158(8), 2546–2552. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.022>
- van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Wang, L., Zhang, Z.-F., Liu, L.-Y., Zhu, F.-J., & Ma, W.-L. (2023). National-scale monitoring of historic used organochlorine pesticides (OCPs) and current used pesticides (CUPs) in Chinese surface soil:

- Old topic and new story. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130285. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130285>
- Wang, Z., DeWitt, J. C., Higgins, C. P., & Cousins, I. T. (2017). A Never-Ending Story of Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFASs)? *Environmental Science & Technology*, 51(5), 2508–2518. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04806>
- Wild, C. P. (2005). Complementing the Genome with an “Exposome”: The Outstanding Challenge of Environmental Exposure Measurement in Molecular Epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 14(8), 1847–1850. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>
- Wild, C. P. (2012). The exposome: From concept to utility. *International Journal of Epidemiology*, 41(1), 24–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>
- Yang, Y., Ok, Y. S., Kim, K.-H., Kwon, E. E., & Tsang, Y. F. (2017). Occurrences and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in drinking water and water/sewage treatment plants: A review. *Science of The Total Environment*, 596–597, 303–320. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.102>

7. Eskerrak eta oharrak

Aurkeztatutako lanaren egileek eskerrak eman nahi dizkiote:

- Espainiar Zientzia eta Berrikuntza Ministerioari, *Kutsatzaile Emergenteekiko Ingurumen-eta Giza-Esposizioa Ebaluatzeko Errendimendu Handiko Estrategia Analitikoak* (AQUASOMIC, Mineco-PID2020-117686RB-C31, 2021-24) proiektuaren bidezko finantziazioagatik.
- Eusko Jaurlaritzari (EJ/GV), Inés Bacieroren eta Mikel Musatadiren diru-laguntzengatik, Doktore Ez Diren Ikertzaileak Prestatzeko Doktoratu Aurreko Programaren barruan (Ikerketa orokorra, 2021-2022 eta 2022-2023).
- Dohaintzan ama-esnea eman duten kideei, ikerketa aurrera eramatea ahalbidetu baitute.