

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE  
MICROEXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ESTROGÉNICOS DESDE  
MATRICES LÍQUIDAS PARA SER EVALUADOS POR  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ANALIZADOR DE TIEMPO DE  
VUELO Y DETECTOR DE MASAS (LC-TOF/MS)***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Doctor en Química, área de Especialización en Química Analítica  
por:**

***LUIS YERKO KOYASHI HONDA SOTO***

**Director de Tesis: Dr. Pablo Richter Duk**

**Santiago-CHILE**

**Enero 2020**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**LUIS YERKO KOYASHI HONDA SOTO**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, Área de Especialización: Química Analítica, en el examen público rendido el día 22 de Enero de 2020.

Director de Tesis:

Dr. Pablo Richter Duk

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes

---

Dra. María Angélica Rubio

---

Dr. Jorge Yáñez

---

Dr. Julio Raba

---

*A mi hija Hatsu.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a los proyectos FONDECYT 1140716 y 1180742 y a la Beca de Doctorado Nacional 2014 folio 21140560 por el financiamiento recibido, que hicieron posibles el desarrollo de esta investigación. Además quiero agradecer a los profesores, alumnos y auxiliares del Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por recibirme en su grupo de trabajo y permitir que cada día en el laboratorio fuera como estar en familia, compartiendo cumpleaños, festividades y buenos momentos durante muchos años. Quiero dar las gracias a la profesora Inés Ahumada, a la profesora Loreto, a Cristina e Inmaculada por el cariño, simpatía y generosidad que entregan en su diario vivir. A todos los compañeros que conocí durante esta etapa, principalmente con los que la amistad aún continúa. Quiero agradecer a mi mujer Camila, a mi Padre y a mi Madre por el apoyo, paciencia y comprensión en los momentos difíciles y estar siempre a mi lado. Quiero agradecer a mi Profesor tutor Pablo Richter por aceptarme como alumno tesista de pregrado y postgrado, por los conocimientos transferidos, por su apoyo, por su simpatía, por los momentos compartidos y por todas las oportunidades que me dio durante tanto tiempo.

También quiero agradecer a los profesores Renato Zanella y Osmar Prestes por recibirme para hacer una estadía en el grupo LARP de la Universidad Federal de Santa María de Brasil, como también a mis grandes amigos Filipe y Nelson.

Por último le doy mis sinceros agradecimientos a la comisión evaluadora de esta tesis por sus contribuciones en el desarrollo de este trabajo, a través de sus comentarios desde la expertis de sus respectivas áreas de investigación.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	PÁGINA
I. FINANCIAMIENTOS Y LUGAR DE REALIZACIÓN _____	18
II. RESUMEN _____	19
III. SUMMARY _____	24
IV. LISTA DE ABREVIATURAS _____	28
1. INTRODUCCIÓN _____	30
1.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN. _____	40
1.1.1. Extracción en fase sólida (SPE). _____	40
1.1.2. Microextracción en fase sólida (SPME). _____	40
1.1.3. Extracción por sorción en barra de agitación (SBSE). _____	42
1.1.4. Extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE). _____	43
1.1.4.1. Fases sorbentes utilizadas en RDSE. _____	44
a) Divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona. _____	44
b) C18 _____	45
c) Estireno divinilbenceno (e-DVB) lámina y polvo. _____	46
d) Intercambiador aniónico amina cuaternaria-octil (CUQAX). _____	46
e) Intercambiador aniónico en base a poliestireno-divinilbenceno (QAX). _____	47
f) Sílica. _____	47
g) Anión SR. _____	47
h) Polidimetilsiloxano (PDMS). _____	48
i) Polímeros sintéticos. _____	48
1.1.5. QuEChERS. _____	48
1.2. INSTRUMENTACIÓN. _____	52
1.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC). _____	52
1.2.2. Analizador TOF acoplado a espectrometría de masas. _____	53
1.2.3. Analizador QqQ acoplado a espectrometría de masas. _____	54
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS _____	56

2.1.HIPÓTESIS.	56
2.2.OBJETIVO GENERAL.	56
2.3.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	56
3. MATERIALES Y MÉTODOS	57
3.1.MATERIALES.	57
3.2.REACTIVOS.	58
3.3.EQUIPOS.	59
3.4.METODOLOGÍA.	61
3.4.1. Selección de los analitos.	61
3.4.2. Preparación de soluciones estándares de las hormonas.	61
3.4.3. Metodología de determinación de estrógenos mediante LC-MS.	62
3.4.3.1. Derivatización e identificación de estrógenos por ESI-TOF/MS.	62
3.4.3.2. Optimización de los parámetros instrumentales ESI-TOF/MS y condiciones de la fuente de iones.	62
3.4.3.3. Diseño Doehlert para optimizar la derivatización (dansilación).	63
3.4.3.4. Estudio de la concentración de la solución de carbonato ácido de sodio.	63
3.4.3.5. Estudio de la temperatura de evaporación.	63
3.4.3.6. Estudio del efecto de antioxidante en la derivatización.	64
3.4.3.7. Derivatización optimizada de estrógenos con cloruro de dansilo.	64
3.4.3.8. Estudio de diferentes medios de dilución de los analitos derivatizados.	65
3.4.3.9. Estudio de programas de elución cromatográfica	65
3.4.3.10. Condiciones cromatográficas para la determinación de estrógenos mediante LC-ESI-TOF/MS.	66
3.4.3.11. Error experimental en el sistema LC-ESI-TOF/MS.	66
3.4.3.12. Curva de calibración y linealidad.	66

3.4.3.13. Precisión de la metodología de determinación por LC-ESI-TOF/MS. _____	67
3.4.3.14. Límites de detección y cuantificación instrumentales. _____	67
3.4.4. Extracción de estrógenos desde muestras acuosas mediante RDSE. _____	67
3.4.4.1. Optimización. _____	68
a) Fases sorbentes. _____	68
Figura 12. Representación de metodología de extracción y determinación de estrógenos en muestras acuosas utilizando RDSE. _____	69
b) Fuerza iónica del medio de extracción. _____	69
c) Utilización de un agente antioxidante en la solución de extracción. _____	70
d) Disolvente de desorción. _____	70
e) pH de la solución de extracción. _____	70
f) Perfil de extracción. _____	71
3.4.4.2. Validación del método analítico en muestras acuosas. _____	71
a) Linealidad. _____	71
b) Efecto Matriz. _____	71
c) Exactitud y precisión de la metodología RDSE para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas. _____	72
d) Límites de detección y cuantificación del método. _____	73
3.4.4.3. Análisis de muestras de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales utilizando RDSE. _____	74
3.4.5. Extracción de estrógenos desde muestras de agua potable y efluente de agua residual mediante SPE. _____	74
3.4.6. Extracción de estrógenos desde muestras de leche. _____	76
3.4.6.1. Metodologías QuEChERS evaluadas para la extracción de estrógenos. _____	76
3.4.6.2. Optimización de la metodología de extracción QuEChERS citrato. _____	77
a) Tratamiento del extracto por d-SPE. _____	78
b) Tratamiento del extracto por SPE. _____	78

c) Tratamiento del extracto por RDSE. _____	78
d) Volumen de extracto para limpieza utilizando QuEChERS-citrato. _____	79
e) Disolvente de desorción utilizado en limpieza del extracto con SPE. _____	79
3.4.6.3. Metodología QuEChERS citrato-d-SPE. _____	79
3.4.6.4. Validación del método de extracción QuEChERS-SPE. _____	79
a) Linealidad. _____	80
b) Exactitud y Precisión. _____	80
c) Límites de detección y cuantificación. _____	80
3.4.6.5. Análisis de muestras reales de leche de bovino. _____	80
3.4.6.6. Hidrólisis enzimática a muestras de leche. _____	81
3.4.7. Metodología de extracción de estrógenos desde muestras de orina. _____	81
3.4.7.1. Colección de muestras. _____	82
3.4.7.2. Optimización de la metodología de extracción. _____	83
a) Volumen de muestra. _____	83
b) Clean up a muestras de orina. _____	83
Evaluación de la remoción de estrógenos en clean up con PSA. _____	84
c) Perfil de extracción. _____	85
3.4.8. Metodología de extracción y limpieza utilizando RDSE. _____	85
3.4.9. Validación del método de extracción de estrógenos desde orina. _____	86
3.4.9.1. Linealidad. _____	86
3.4.9.2. Efecto matriz. _____	86
3.4.9.3. Exactitud y precisión. _____	87
3.4.9.4. Límites de detección y cuantificación de la metodología de extracción. _____	87
3.4.10. Metodología de hidrólisis enzimática para determinación de estrógenos totales, libres y conjugados. _____	87

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	89
4.1. Derivatización con cloruro de dansilo e identificación de estrógenos por LC-TOF/MS.	89
4.2. Optimización de los parámetros instrumentales.	90
4.3. Optimización de la derivatización.	92
4.3.1. Diseño experimental Doehlert.	92
4.3.2. Concentración de la solución de carbonato ácido de sodio.	96
4.3.3. Temperatura de evaporación.	97
4.3.4. Antioxidante en la derivatización.	98
4.4. Estudio de diferentes medios de dilución de los analitos derivatizados.	102
4.5. Espectros MS de los 9 estrógenos en estudio.	104
4.6. Evaluación de fases móviles en LC-MS.	107
4.7. Error experimental en el sistema LC-TOF/MS.	111
4.8. Precisión de la metodología de determinación LC-TOF/MS.	113
4.9. Curva de calibración y estimación del intervalo lineal.	113
4.10. Curva de calibración para cálculo de límites de detección instrumentales.	114
4.11. Optimización de la técnica de RDSE para estrógenos en muestras acuosas.	115
4.11.1. Fases sorbentes.	116
4.11.2. Estudio de fuerza iónica.	117
4.11.3. Utilización de ácido ascórbico como agente antioxidante.	118
4.11.4. Disolvente de desorción	119
4.11.5. pH de la solución de extracción.	120
4.11.6. Perfil de extracción.	122
4.11.7. Validación de la metodología RDSE.	123
4.11.7.1. Linealidad.	123
4.11.7.2. Evaluación del efecto matriz.	124

4.11.7.3. Exactitud y precisión del método.	124
4.11.7.4. Límites de detección y cuantificación en agua residual.	125
4.11.8. Análisis de efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento La Farfana y El Trebal.	128
4.11.9. Extracción de estrógenos desde muestras de agua potable y efluente de agua residual utilizando SPE.	130
4.11.10. Comparación de las metodologías RDSE y SPE utilizadas para la determinación de estrógenos en muestras acuosas.	135
4.12. Desarrollo de metodologías de extracción y determinación de estrógenos desde leche.	138
4.12.1. Identificación de estrógenos por LC-MS/MS.	138
4.12.2. Metodologías QuEChERS <i>d</i> -SPE para la extracción de estrógenos desde leche.	139
4.12.3. Comparación en limpieza utilizando QuEChERS <i>d</i> -SPE y QuEChERS SPE.	141
4.12.4. Optimización de la metodología QuEChERS-SPE.	143
4.12.5. QuEChERS citrato-RDSE.	146
4.12.6. Validación de la técnica QuEChERS-SPE-LC-MS/MS.	148
4.12.7. Análisis de muestras reales de leche de bovino.	150
UHPLC-Q-TOF/MS	153
4.13. Extracción de estrógenos desde muestras de orina.	154
4.13.1. Optimización de la metodología de extracción.	155
4.13.1.1. Volumen de muestra.	155
4.13.1.2. Clean up post extracción utilizando mezclas de metanol/agua.	155
4.13.1.3. Clean up simultáneo a la extracción.	156
4.13.1.4. Evaluación de la pérdida de estrógenos durante el clean up con PSA.	161
4.13.1.5. Perfil de extracción.	162

4.13.2. Validación de la metodología de extracción de estrógenos desde muestras de orina.	163
4.13.2.1. Efecto matriz.	163
4.13.2.2. Linealidad.	164
4.13.2.3. Exactitud y precisión.	164
4.13.2.4. Límites de detección y cuantificación.	165
4.13.2.5. Determinación de estrógenos libres, conjugados y totales aplicando hidrólisis enzimática.	166
4.13.2.6. Comparación de la cantidad de estrógenos libres y conjugados en las muestras analizadas.	168
5. CONCLUSIONES	174
6. BIBLIOGRAFÍA	176
7. ANEXO	188
8. PRESENTACIONES A CONGRESOS	209
9. PUBLICACIONES	210

**ÍNDICE DE FIGURAS****PÁGINA**

Figura 1. Esquema de metabolización de los estrógenos E1 y E2. _____	33
Figura 2. Esquema general de una reacción de hidrólisis enzimática. _____	33
Figura 3. Representación de la microextracción en fase sólida. _____	41
Figura 4. Representación de la operación y composición de la técnica SBSE. _	42
Figura 5. Comparación de las recuperaciones teóricas en 10 mL de agua utilizando 100 $\mu\text{L}$ de PDMS en SBSE y 0,5 $\mu\text{L}$ en SPME para analitos con distintos $K_{O/W}$ [24]. _____	43
Figura 6. Conformaciones del disco con distintas fases sorbentes inmovilizadas, a) PDMS, b) C18 y c) Oasis HLB y partes del disco con cavidad. _____	44
Figura 7. Estructura química de divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB). _____	45
Figura 8. Estructura química de la fase sorbente C18. _____	46
Figura 9. Representación de la estructura química del PDMS. _____	48
Figura 10. Proporciones entre muestra/acetonitrilo y cantidad de sales y sorbentes utilizadas en las metodologías QuEChERS. _____	51
Figura 11. Estructura química de PSA. _____	52
Figura 12. Representación de metodología de extracción y determinación de estrógenos en muestras acuosas utilizando RDSE. _____	69
Figura 13. Efecto del voltaje en la salida del capilar del sistema ESI-TOF/MS, utilizando E3 derivatizado formando el aducto $[\text{M}+\text{H}]^+$ con señal $m/z$ 522,2300. _____	91
Figura 14. Efecto del voltaje en el skimmer del sistema ESI-TOF/MS, utilizando E3 derivatizado formando el aducto $[\text{M}+\text{H}]^+$ con señal $m/z$ 522,2300. _____	91
Figura 15. Cromatograma del ion extraído (EIC) de $m/z$ 522,2300, proveniente de un multiestándar de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ derivatizado con dos concentraciones de cloruro de dansilo. a) 0,1 mg/mL y b) 1 mg/mL. _____	93
Figura 16. Superficie de respuesta del estudio de derivatización usando un diseño Doehlert. _____	95
Figura 17. Efecto del pH de la solución de $\text{NaHCO}_3$ (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizado en la derivatización. Entre distintos pH, misma letra indica que no hay diferencia significativa y con distinta letra indican diferencia significativa. _____	96
Figura 18. Efecto de la temperatura de evaporación sobre 10 mL de multiestándar de estrógenos (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). _____	98
Figura 19. Cantidad de ácido ascórbico (% p/v) en la solución 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{NaHCO}_3$ utilizada para derivatizar los estrógenos. _____	99
Figura 20. Espectro MS de 2-OHE1 en las formas $[\text{M}+2\text{H}]^{+2}$ con $m/z = 377,1362$ , $[\text{M}+\text{H}]^+$ con $m/z = 753,2674$ , y $[\text{M}+\text{Na}]^+$ con $m/z = 775,2528$ , obtenido por infusión directa en el sistema TOF/MS a diferentes medios. a)	

Acetonitrilo/0,003 mol·L <sup>-1</sup> ácido fórmico (12:1), b) acetonitrilo/0,03 mol·L <sup>-1</sup> ácido fórmico (12:1) and c) acetonitrilo/0,3 mol·L <sup>-1</sup> ácido fórmico (12:1) y d) acetonitrilo/0,3 mol·L <sup>-1</sup> ácido fórmico (3:1).	103
Figura 21. Espectro de masas de los estrógenos a) E1 m/z 504,2191, b) E2 m/z 506,2346, c) E3 m/z 522,2300, d) EE2 m/z 530,2351y e) 16-OHE1 m/z 520,2141.	105
Figura 22. Espectro de masas de los compuestos doblemente derivatizados de la forma [M+H] <sup>+</sup> y [M+2H] <sup>2+</sup> , respectivamente. a) 2-OHE1 m/z = 753,2692 y 377,1362 b) 4-OHE1 m/z = 753,2692 y 377,1362 c) 2-OHE2 m/z = 755,2869 y 378,1436 y d) 4-OHE2 m/z = 755,2869 y 378,1438.	106
Figura 23. Zoom a espectro MS que muestra la relación isotópica. a) 2-OHE1 m/z = 377,1362 y b) 2-OHE2 m/z = 378,1436.	107
Figura 24. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a (50 µg·L <sup>-1</sup> ) derivatizados. Utilizando acetonitrilo como fase orgánica en ambos cromatogramas, y como fase acuosa se utilizó en a) ácido fórmico 0,1 mol·L <sup>-1</sup> y b) ácido fórmico 0,3 mol·L <sup>-1</sup> .	108
Figura 25. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a (50 µg·L <sup>-1</sup> ) derivatizados. Utilizando como fase móvil agua/acetonitrilo.	109
Figura 26. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a (50 µg·L <sup>-1</sup> ) derivatizados. Utilizando como fase móvil agua/acetonitrilo, segunda inyección.	109
Figura 27. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a (50 µg·L <sup>-1</sup> ) derivatizados. Utilizando como fase móvil ácido fórmico 0,3 mol·L <sup>-1</sup> /metanol.	110
Figura 28. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a 50 µg·L <sup>-1</sup> a) Doblemente cargado [M+2H] <sup>2+</sup> (m/z = 377,1362 y 378,1438 para 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2, respectivamente) y b) mono cargado [M+H] <sup>+</sup> (m/z = 753,26 y 755,28 para 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2, respectivamente).	111
Figura 29. Estudio de fases sorbentes en RDSE para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas.	117
Figura 30. Estudio de fases sorbentes en RDSE utilizando polímeros sintéticos compuestos por N-vinilpirrolidona (Pol 1-3), 1-vinilimidazol (Pol 4-6) y acrilamida (Pol 7-9) en la extracción de estrógenos desde muestras acuosas.	117
Figura 31. Efecto de la fuerza iónica con NaCl en la extracción de estrógenos desde muestras acuosas utilizando RDSE-e-DVB.	118
Figura 32. Comparación de la respuesta analítica luego de la extracción de estrógenos mediante RDSE-e-DVB con ácido ascórbico (0,1% p/v) y sin ácido ascórbico en la solución de extracción.	119

Figura 33. Comparación en la desorción de estrógenos desde RDSE (e-DVB) utilizando 5 mL de disolvente. _____	120
Figura 34. Efecto del pH en la solución de extracción para E1, E2, EE2, E3 y 16-OHE1 utilizando RDSE-e-DVB. _____	121
Figura 35. Efecto del pH en la solución de extracción para 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OH utilizando RDSE-e-DVB. _____	122
Figura 36. Perfil de extracción de 4-OHE1, 2-OHE1, 4-OHE2, EE2 y E3 desde muestras acuosas mediante RDSE-e-DVB. _____	123
Figura 37. Perfil de extracción de 2-OHE2, E1, E2 y 16-OHE1 desde muestras acuosas mediante RDSE-e-DVB. _____	123
Figura 38. Cromatograma de los analitos E1, E2 y EE2, encontrados en el efluente La Farfana. _____	129
Figura 39. Cromatograma de los analitos E1 y EE2, encontrados en el efluente El Trebal. _____	129
Figura 40. Cromatogramas del ion extraído (EIC) obtenido por LC-TOF/MS de los estrógenos encontrados en efluente de PTAR. E1= $0,007 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , E2= $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y EE2 < LC Mapocho-Trebal. Líneas punteadas corresponden a cromatogramas de la muestra fortificada a $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y líneas continuas al cromatograma de la muestra. _____	132
Figura 41. Estructura química de 2-OHE2 derivatizado con dos grupos dansilo y doblemente protonado $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ m/z 378,1, precursor m/z 378,1 y el fragmento o ion producto m/z 171,0. _____	139
Figura 42. Comparación de metodologías QuEChERS para la extracción de estrógenos desde leche utilizando una proporción 2:1 entre la muestra y acetonitrilo en la extracción. _____	140
Figura 44. Intensidad de la señal de estrógenos desde 10 mL de leche extraídos utilizando QuEChERS citrato y limpieza usando d-SPE y SPE, tomando 1 mL de extracto en cada caso. _____	143
Figura 46. Comparación de la intensidad de la señal analítica obtenida utilizando diferentes proporciones de acetonitrilo en la elución de los estrógenos desde SPE (HLB). _____	146
Figura 47. Cromatogramas de E1 en la muestra de leche analizada mediante adición de estándar. _____	151
Figura 48. Cromatograma del ion extraído de E1 m/z 504,2191 luego de la hidrólisis enzimática en muestras de leche. _____	152
Figura 49. Cromatograma del ion extraído de E1 m/z 504,2191 sin hidrólisis enzimática en muestras de leche. _____	152
Figura 50. Disco rotatorio con fase sorbente e-DVB. A) Post extracción desde 25 mL de orina. B) fase sorbente previo a la extracción. C) utilizando 5 mL de orina diluidos con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% p/v y D) utilizando 5 mL de orina	

diluidos con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% p/v con clean up post extracción utilizando metanol al 20% v/v. _____	156
Figura 51. Comparación en la señal analítica sin clean up y utilizando PSA, mezclas PSA/C18 y florisil en clean up durante la extracción con RDSE (e-DVB). _____	157
Figura 52. Estructura química de urobilina. _____	158
Figura 53. Comparación del volumen de muestra de orina utilizando 200 mg de PSA durante la extracción con RDSE (e-DVB). _____	160
Figura 54. Extracción de estrógenos desde orina utilizando RDSE e-DVB y PSA en distintas cantidades. _____	161
Figura 55. PSA post extracción desde orina a la izquierda y antes de la extracción a la derecha. _____	161
Figura 56. Extracción de estrógenos ( $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) desde ácido ascórbico 0,05% con RDSE (e-DVB) con y sin PSA. _____	162
Figura 57. Perfil de extracción de estrógenos desde 2 mL de orina diluida con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% p/v, utilizando RDSE-e-DVB y PSA. _____	163
Figura 58. Concentraciones encontradas de E1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas. _____	171
Figura 59. Cromatograma del ion extraído para m/z 535,2392, correspondiente a la señal del metabolito 4-metoxiestradiol derivatizado, mediante análisis no dirigido obtenido desde muestra de mujer embarazada con 27 semanas de gestación. _____	173

## ANEXO DE FIGURAS

## PÁGINA

Figura A1. Curva de calibración de estándar $^{13}\text{C}_2$ EE2 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	191
Figura A2. Curva de calibración de estándar 4-OHE1 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	191
Figura A3. Curva de calibración de estándar 2-OHE1 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	192
Figura A4. Curva de calibración de estándar 4-OHE2 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	192
Figura A5. Curva de calibración de estándar 2-OHE2 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	193
Figura A6. Curva de calibración de estándar E1 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	193
Figura A7. Curva de calibración de estándar E2 dansilado en concentraciones entre 3 y $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS. _____	194

Figura A8. Curva de calibración de estándar EE2 dansilado en concentraciones entre 3 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS.	194
Figura A9. Curva de calibración de estándar 16-OHE1 dansilado en concentraciones entre 3 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS.	195
Figura A10. Curva de calibración de estándar E3 dansilado en concentraciones entre 3 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ mediante LC-TOF/MS.	195
Figura A11. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 4-OHE1 (1-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	196
Figura A12. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 2-OHE1 (0,5-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	196
Figura A13. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 4-OHE2 (1-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	197
Figura A14. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 2-OHE2 (0,5-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	197
Figura A15. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de E1 (0,5-4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	197
Figura A16. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de E2 (0,25-4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	198
Figura A17. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de EE2 (0,25-4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	198
Figura A18. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 16-OHE1 (0,25-4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	198
Figura A19. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de E3 (0,25 - 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).	199
Figura A20. Cromatogramas de 2-OHE1 y 4-OHE1 inyectados independientemente.	199
Figura A21. Cromatograma de 2-OHE2 y 4-OHE2 inyectados independientemente.	200
Figura A22. Señales m/z de la solución de calibración para el sistema ESI-TOF/MS.	200
Figura A 23. Curva de calibración de E1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	201
Figura A 24. Curva de calibración de E2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	201
Figura A 25. Curva de calibración de EE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	201
Figura A 26. Curva de calibración de 16-OHE1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	202
Figura A 27. Curva de calibración de E3 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	202
Figura A 28. Curva de calibración de (20,21)- $^{13}\text{C}_2$ EE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	203
Figura A 29. Curva de calibración de 2-OHE1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	203

Figura A 30. Curva de calibración de 4-OHE1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	203
Figura A 31. Curva de calibración de 2-OHE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	204
Figura A 32. Curva de calibración de 4-OHE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.	204
Figura A 33. Concentraciones encontradas de E2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	205
Figura A34. Concentraciones encontradas de EE2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas	205
Figura A35. Concentraciones encontradas de E3 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	206
Figura A 36. Concentraciones encontradas de 16-OHE1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	206
Figura A 37. Concentraciones encontradas de 4-OHE2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	207
Figura A 38. Concentraciones encontradas de 2-OHE2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	207
Figura A 39. Concentraciones encontradas de 4-OHE1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	208
Figura A 40. Concentraciones encontradas de 2-OHE1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.	208

## ÍNDICE DE TABLAS

## PÁGINA

Tabla 1. Compuestos estrogénicos y propiedades físico-químicas.	37
Tabla 2. Intensidad de las señales de los estrógenos derivatizados de acuerdo a la metodología de Anari et al. 2002 y a la metodología optimizada.	101
Tabla 3. Señales m/z teóricas, experimentales y error experimental de los estrógenos estudiados.	112
Tabla 4. Precisión evaluada a través de la reproducibilidad (n=6) en la determinación de hormonas.	113
Tabla 5. Curva de calibración y coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para cada estrógeno entre 3 y 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .	114
Tabla 6. Parámetros obtenidos desde curva de calibración para las hormonas entre 0,25 y 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .	115
Tabla 7. Figuras analíticas del método y efecto matriz (EM) en efluente de agua residual utilizando RDSE-e-DVB.	127
Tabla 8. Recuperación absoluta y repetibilidad del método (n=5) en muestras de agua potable y efluente.	127

Tabla 9. Concentración encontrada, recuperación y RSD para cada compuesto en agua potable tratada con metodología RDSE (e-DVB).	129
Tabla 10. Concentración encontrada, recuperación y RSD para cada compuesto en efluente tratado con metodología RDSE (e-DVB).	130
Tabla 11. Figuras analíticas del método y efecto matriz (EM) en agua potable y en efluente de agua residual utilizando SPE C18.	133
Tabla 12. Concentración encontrada, valores de recuperación y RSD para cada compuesto en agua potable tratada con metodología SPE (C18).	134
Tabla 13. Concentración encontrada, valores de recuperación y RSD para cada compuesto en efluente tratado con metodología SPE (C18).	134
Tabla 14. Metodologías de determinación de estrógenos en muestras acuosas con SPE y RDSE.	137
Tabla 15. Transiciones y energías de colisión utilizadas para la determinación de estrógenos por LC-MS/MS en modo positivo.	138
Tabla 16. Recuperaciones y factores de enriquecimiento de estrógenos para cada metodología evaluada en leche a concentración de $25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .	148
Tabla 17. Curvas de calibración y límites de detección y cuantificación de la metodología propuesta QuEChERS-SPE- LC-MS/MS.	149
Tabla 18. Recuperación, RSD y efecto matriz en leche mediante QuEChERS-SPE-LC-MS.	149
Tabla 19. Comparación con otras metodologías QuEChERS utilizadas para la determinación de estrógenos en leche de bovino.	153
Tabla 20. Comparación de pendiente y efecto matriz de los estrógenos en orina.	164
Tabla 22. Valores de recuperación y de RSD de la metodología de extracción de estrógenos en orina a dos niveles de concentración.	166
Tabla 23. Concentraciones ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de estrógenos libres, totales y conjugados en muestras analizadas.	167

## I. FINANCIAMIENTOS Y LUGAR DE REALIZACIÓN

La presente investigación denominada:

**“DESARROLLO DE ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE MICROEXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ESTROGÉNICOS DESDE MATRICES LÍQUIDAS PARA SER EVALUADOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO Y DETECTOR DE MASAS (LC-TOF/MS)”.**

Ha sido financiada por:

Los **Proyectos Regulares FONDECYT N° 1140716 y 1180742**, dirigido por el Dr. Pablo Roberto Richter Duk.



**CONICYT a través de la beca de gastos operacionales, Folio 21140560** correspondiente al estudiante del programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile, Luis Yerko Koyashi Honda Soto.



Por otra parte, este trabajo de investigación fue desarrollado en:

El Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.



El Laboratorio de Análisis de Residuos de Pesticidas de la Universidad Federal de Santa María, Brasil. (Estadía).



## II. RESUMEN

Los estrógenos son compuestos de origen natural como sintéticos que en el último tiempo han sido estudiados por ser considerados disruptores endocrinos. En humanos estos compuestos han producido enfermedades como: cáncer de mamas y próstata, desordenes del tracto reproductivo y bajo recuento de espermatozoides, entre otras, mientras que en organismos acuáticos se han detectados problemas de feminización, infertilidad, hermafroditismo e incluso la muerte. La estrona (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2) y estriol (E3) son los estrógenos más abundantes en el organismo, estos son producidos para regular funciones biológicas relacionadas con el crecimiento y ciclos reproductivos, tanto en humanos como en animales. En base a esta última función, se ha utilizado el estrógeno sintético  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2) como el principal compuesto activo de diferentes métodos anticonceptivos, también se ha reportado su uso para promover el crecimiento en animales. Los estrógenos son metabolizados en el hígado a través de 2 fases, donde es posible la formación de los metabolitos hidroxilados de E1 y E2 como 2-hidroxiestrona (2-OHE1), 4-hidroxiestrona (4-OHE1), 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) y 4-hidroxiestradiol (4-OHE2) denominados catecol estrógenos, como también el metabolito hidroxilado 16-hidroxiestrona (16-OHE1), todos los anteriores han sido correlacionados con el desarrollo de distintos tipos de cánceres, a través de su transformación a semiquinonas y finalmente a quinonas, capaces de formar aductos con el ADN y producir mutaciones en los organismos. Determinar la presencia de este tipo de compuestos en matrices ambientales, matrices biológicas y/o alimenticias, podría ayudar a evitar la exposición ante estos compuestos, sin embargo se necesita tener las metodologías analíticas que puedan dar cuenta de esta información. El objetivo de esta investigación fue desarrollar metodologías analíticas que

permitan extraer y determinar en forma sensible y selectiva las hormonas sexuales E1, E2, EE2 y E3 y sus metabolitos hidroxilados desde muestras de aguas residuales y muestras biológicas como orina y leche, utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). Se desarrolló una metodología de derivatización con cloruro de dansilo para obtener derivados altamente ionizables compatibles con la espectrometría de masas en modo positivo. Se utilizó un analizador de tiempo de vuelo (TOF) y un analizador de triple cuadrupolo (QqQ) acoplados a espectrometría de masas, donde se obtuvieron los productos derivatizados con señales  $m/z$  correspondientes a la forma  $[M+H]^+$  para EE2, E1, E2, E3, 16-OHE1 y la forma  $[M+2H]^{2+}$  para 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2. Estas últimas señales no reportadas previamente fueron más intensas, desde 4 veces más que las formas  $[M+H]^+$  para 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2. Los 9 estrógenos fueron determinados instrumentalmente en corridas cromatográficas menores a 10 min, con coeficientes de correlación mayores a 0,994. Para la determinación de estos compuestos en muestras acuosas se utilizó la técnica de Extracción por Sorción en Disco Rotatorio (RDSE) y la Extracción en Fase Sólida (SPE). Mediante RDSE se logró desarrollar una metodología de extracción de estrógenos desde efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) utilizando la fase sorbente estireno-divinilbenceno (e-DVB), obteniendo recuperaciones entre el 79 y 118%, con desviaciones estándares relativas (RSD) menores al 16%. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método estuvieron entre 0,001 y 0,012  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y entre 0,004 y 0,038  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. La metodología fue aplicada sobre dos efluentes de PTARs de la Región Metropolitana de Santiago, pudiéndose cuantificar E1 en concentraciones de 0,012 $\pm$ 0,003  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y 0,013 $\pm$ 0,001  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en cada uno de ellos, mientras que E2 y EE2 fueron detectados en concentraciones por debajo del LC. Al utilizar SPE

con C18 se obtuvieron recuperaciones en agua potable y en efluente sobre el 86% con valores de RSD entre el 3 y 16%, mientras que los límites de detección y cuantificación del método estuvieron entre 0,002 y 0,017  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y entre 0,006 y 0,058  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se analizó una muestra de efluente de PTAR detectando y cuantificando E1 y E2 en concentraciones de  $0,007\pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $0,041\pm 0,010 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente.

Para la extracción de estrógenos desde leche se utilizó la metodología QuEChERS citrato y para limpiar el extracto obtenido se utilizó SPE con el sorbente divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona, obteniéndose recuperaciones entre el 90 y 123% con valores de RSD menores al 18%. Los límites de detección y cuantificación de la metodología QuEChERS acoplada a SPE estuvieron entre 0,02 y 0,13  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y entre 0,05 y 0,53  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. Se aplicó la metodología a muestras de leche obtenidas desde bovino lactante, bovino con 7 meses gestación y desde centros comerciales, lográndose determinar la presencia de E1 en una concentración de  $0,094 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en la leche de bovino en gestación. Por otra parte, se aplicó una metodología de hidrólisis enzimática sobre muestras de leche obtenidas desde tiendas comerciales pudiéndose encontrar E1 en 3 muestras analizadas, encontrándose a una concentración bajo el límite de cuantificación en las muestras no hidrolizadas y en concentraciones entre 0,086 y  $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En orina se utilizó RDSE para la extracción de estrógenos y en forma simultanea se utilizó una amina primaria secundaria (PSA) para reducir la cantidad de interferentes provenientes de esta matriz. La metodología de extracción fue optimizada y validada, mostrando recuperaciones entre el 72 y el 130% y RSD menores al 17%. Los límites de detección y cuantificación estuvieron entre el 0,10 y  $0,13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y entre 0,30 y  $0,50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. La metodología

fue utilizada para analizar muestras de orina de mujeres de 29, 35 y 53 años de edad, 2 mujeres embarazadas con 27 y 28 semanas de gestación, y una muestra de un hombre de 29 años, se aplicó un tratamiento enzimático con la enzima  $\beta$ -glucuronidasa previo a la extracción, a modo de determinar la cantidad de estrógenos totales, como también se analizaron las muestras sin tratamiento enzimático para determinar la cantidad de estrógenos libres. Se lograron detectar los 9 estrógenos estudiados entre las diferentes muestras analizadas, en concentraciones de 0,9 a los  $73 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en su forma libre y entre 0,5 y  $1542 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en su forma conjugada, obteniéndose concentraciones totales que llegan hasta los  $1615 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  por analito. Las mayores concentraciones se encontraron en las muestras de orina de mujeres en gestación, siendo E3 el estrógeno encontrado en mayor concentración. Se pudo concluir que las metodologías desarrolladas permitieron determinar 8 estrógenos naturales y 1 sintético mediante metodologías simples y rápidas con buenos niveles de linealidad, selectividad, sensibilidad, exactitud y precisión en las tres matrices analizadas, donde la técnica RDSE fue adecuada para la extracción de estrógenos en matrices complejas de carácter principalmente polar como aguas y orina, mientras que QuEChERS resultó ser una metodología eficiente para la extracción de estrógenos desde matrices complejas de carácter mayormente apolar. La técnica RDSE mostró figuras de mérito similares a otras técnicas con amplio desarrollo como SPE, mientras que la metodología QuEChERS permitió la extracción de estrógenos desde leche a niveles comparables con otras investigaciones, permitiendo cuantificar E1 en las muestras de leche analizadas. La cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas resultó una técnica fundamental en la detección, confirmación y cuantificación de estos compuestos, debido a la capacidad de separación de compuestos con similares propiedades físico-químicas y a la determinación sensible y selectiva que fue posible en muestras de

alta complejidad. Se determinó que la orina es una importante fuente de contaminación de estrógenos, ya que a través de la orina llegan estrógenos hacia aguas residuales, las que posteriormente son descargadas hacia el medio ambiente pudiendo afectar a la fauna acuática y otras especies que tienen interacción directa con estas aguas. Por otra parte, los humanos podríamos estar incorporando estrógenos a nuestros organismos a través de la leche, ya que si esta es extraída en bovinos que se encuentran sobre el 3er trimestre de gestación, los niveles hormonales podrían estar en torno a 1000 veces más altos que en un bovino en condiciones normales.

### III. SUMMARY

The estrogens are compounds of natural and synthetic origin that have been recently studied as endocrine disruptors. In humans the estrogens have produced symptoms as: breast and prostate cancer, reproductive tract disorders and low sperm count, among others, while in aquatic organisms have been detected problems of feminization, infertility, hermaphroditism and even death. Estrone (E1),  $17\beta$ -estradiol (E2) and estriol (E3) are the most abundant estrogens in the organism; they are related with the biological functions as growth and reproductive cycles, in humans and animals. In this last function, the synthetic estrogen  $17\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) is used as the main active compound in contraceptive methods, although its use also has been reported to promote the growth of animals. On the other hand are the hydroxylated metabolites of E1 and E2 as 2-hydroxyestrone (2-OHE1), 4-hydroxyestrone (4-OHE1), 2-hydroxyestradiol (2-OHE2) and 4-hydroxyestradiol (4-OHE2) called catechol estrogens, as well as the hydroxylated metabolite  $16\alpha$ -hydroxyestrone (16-OHE1), all last compounds have been correlated with the development of different types of cancers, through their transformation to semi quinones and finally quinones, capable of forming adducts with DNA and producing mutations in the organisms. The objective of this research was to develop analytical methodologies that allow extract sex hormones E1, E2, EE2 and E3 and their hydroxylated metabolites from wastewater samples and biological samples such as urine and milk, and then determined sensitively and selectively by liquid chromatography, coupled to mass spectrometry (LC-MS). For the determination, a derivatization methodology with dansyl chloride was developed to obtain estrogen derivatives with highly ionizable amine functional groups in positive mode by using mass spectrometry for the detection. A time of flight analyzer

(TOF) and a triple quadrupole analyzer (QqQ) coupled to mass spectrometry were used, the derivatized products were obtained with  $m/z$  signals corresponding to the form  $[M+H]^+$  for EE2, E1, E2, E3, 16-OHE1 and the form  $[M+2H]^{2+}$  for 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 and 4-OHE2. These last signals not previously reported were more intense, from 4 times more than  $[M+H]^+$  forms for 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 and 4-OHE2, reported previously. The estrogens were separated in chromatographic runs of 10 min, showing linearity for all analytes with correlation coefficients greater than 0.994. Different extraction techniques were used depending on the matrix studied. In aqueous samples the techniques rotating disk sorption extraction (RDSE) and solid-phase extraction (SPE) were used. Through RDSE it was possible to develop a methodology for the extraction of estrogens from wastewater using styrene-divinylbenzene (e-DVB) as a sorbent phase, obtaining recoveries between 79 and 118% with RSD values lower than 17%. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of the method were between 0.001 and 0.012  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and between 0.004 and 0.038  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The methodology was applied on two effluents from WWTP in the Región Metropolitana of Santiago, E1 was quantified in concentrations of  $0.012\pm 0.003 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $0.013\pm 0.001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , while E2 and EE2 were detected in concentrations of below the LOQ. When using SPE with C18, recoveries in drinking water and effluent were obtained over 86% with RSD values between 3 and 16%, while the detection and quantification limits of the method were between 0.002 and 0.017  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and between 0.006 and 0.058  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . A sample of WWTP effluent was analyzed by detecting and quantifying E1 and E2 in concentrations of  $0.007\pm 0.001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $0.041\pm 0.010 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively.

For the extraction of estrogens from milk samples, the QuEChERS citrate methodology was used, and for clean up the extract, SPE was used with the divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone copolymer sorbent, recoveries between 90 and 123% with RSD values lower than 18% were obtaining. The LOD and LOQ of the QuEChERS methodology coupled to SPE were between 0.02 and 0.13  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and between 0.05 and 0.53  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The methodology was applied to samples of commercial milk, lactating cow's milk and cow's milk with 7 months gestation, being able to determine the presence of E1 in a concentration of 0.094  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in milk of cow's in gestation. On the other hand, an enzymatic hydrolysis methodology was applied to milk samples obtained from commercial stores, and E1 could be found in 3 analyzed samples, being at a concentration below the limit of quantification in non-hydrolyzed samples and in concentrations between 0.086 and 1.3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

For urine samples, RDSE was used for the extraction of estrogens and simultaneously to primary secondary amine (PSA) was used to reduce the quantity of interferences from this matrix. The extraction methodology was optimized and validated, showing recoveries between 72 and 130% and RSD values less than 17%. The LOD and LOQ were between 0.10 and 0.13  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and between 0.30 and 0.50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The methodology was used to analyze urine samples of women of 29, 35 and 53 years old, 2 pregnant women with 27 and 28 weeks of gestation, and of a man of 29 years old. Treatment with the enzyme  $\beta$ -glucuronidase was applied prior to extraction, in order to determine the total amount of estrogen and without enzymatic treatment to determine the free amount of estrogen. The 9 estrogens studied were detected in the different samples analyzed, in individual concentrations ranging from 0.9 to 73  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the free form, between 0.5 and 1542  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in the conjugated form,

obtaining concentration until  $1615 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  in total per analyte. The highest concentrations were found in the urine samples of pregnant women, with E3 being the estrogen found in the highest concentration. It was concluded that the developed methodologies allowed to determine 8 natural and 1 synthetic estrogens by simple and fast methodologies with good levels of linearity, selectivity, sensitivity, accuracy and precision in the three matrices analyzed, where the RDSE technique was adequate for estrogen extraction in complex matrices of a mainly polar nature such as water and urine, while QuEChERS proved to be an efficient methodology for the extraction of estrogens from complex matrices of a mostly non-polar nature.

The RDSE technique showed figures of merit similar to other techniques with extensive development such as SPE, while the QuEChERS methodology allowed the extraction of estrogens from milk at levels comparable to other investigations, allowing quantify E1 in the analyzed milk samples. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry was a fundamental technique in the detection, confirmation and quantification of these compounds, due to the ability to separate compounds with similar physicochemical properties and to the sensitive and selective determination that was possible in samples of high complexity. It was determined that urine is an important source of estrogen contamination, since through the urine estrogens reach wastewater, which are subsequently discharged into the environment and can affect aquatic fauna and other species that have direct interaction with these waters. On the other hand, humans could be incorporating estrogens into our organisms through milk, since if it is extracted in cattle that are in the 3rd trimester of pregnancy, hormonal levels could be around 1000 times higher than in a bovine in normal conditions.

#### IV. LISTA DE ABREVIATURAS

E1	Estrona
E2	17 $\beta$ -estradiol
EE2	17 $\alpha$ -etinil estradiol
2-OHE1	2-hidroxiestrona
4-OHE1	4-hidroxiestrona
16-OHE1	16 $\alpha$ -hidroxiestrona
2-OHE2	2-hidroxiestradiol
4-OHE2	4-hidroxiestradiol
E3	Estriol
(20,21) <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -EE2	EE2 marcado isotópicamente con carbono 13
PAHs	<i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</i>
EDCs	<i>Endocrine Disrupting Chemicals</i>
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i>
TOF	<i>Time-of-Flight</i>
<i>QqQ</i>	<i>Triple Quadrupole</i>
LC-MS	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
APCI	<i>Atmospheric Presion Chemical Ionization</i>
APPI	<i>Atmospheric Presion Photo Ionization</i>
RDSE	<i>Rotating Disk Sorptive Extraction</i>
SPE	<i>Solid-Phase Extraction</i>
SPME	<i>Solid-Phase Micro Extraction</i>
SBSE	<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe</i>

d-SPE	<i>dispersive-Solid-Phase Extraction</i>
e-DVB	Estireno-divinilbenceno
CUQAX	Intercambiador aniónico amina cuaternaria-octil
CA	Carbón activado
C8	Octil
C18	Octadecil
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno
HLB	<i>Hidrophilic Lipophilic Balance</i>
PSA	<i>Primary Secondary Amine</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
$K_{O/W}$	Coefficiente de partición octanol agua
AcOEt	Acetato de etilo
MeOH	Metanol
HorRat	<i>Horwitz Ratio</i>
PTAR	Planta de Tratamiento de Aguas Residuales
JECFA	<i>Join FAO/WHO Expert Committee on Food Additives</i>

## 1. INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son aquellos compuestos que se encuentran en el medio ambiente producto de la actividad urbana, industrial o agrícola, sobre los que no existe regulación puesto que sus efectos no se conocen en totalidad, sin embargo debido a sus propiedades físico químicas, podrían presentar riesgos para los organismos expuestos a ellos. Algunos de estos compuestos son clasificados como disruptores endocrinos (EDCs), definidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), como agentes exógenos que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión o eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, responsable de mantener la homeostasis y la regulación del desarrollo en los procesos biológicos [1]. Los EDCs son compuestos naturales o sintéticos asociados con diversas patologías en humanos como: trastornos en el equilibrio hormonal, producción de esperma de baja calidad y pubertad adelantada en niños, además son correlacionados con el desarrollo de cáncer de mamas, próstata, testículos y ovarios [2–4], mientras que en organismos acuáticos se han detectados problemas como feminización, infertilidad, hermafroditismo e incluso la muerte [1,5,6]. En este plano, varios tipos de EDCs han sido encontrados en muestras acuosas medioambientales, biológicas y alimenticias, encontrándose dentro de este grupo los estrógenos de origen natural como  $17\beta$ -estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3), que son secretados por la corteza adrenal, ovarios, testículos y placenta en humanos y animales [7]. Por otra parte se encuentra  $17\alpha$ -etinilestradiol (EE2), correspondiente a un estrógeno sintético ampliamente utilizado en formulaciones de métodos anticonceptivos. E2 tiene un alto potencial endocrino, siendo el estrógeno más biopotente encontrado en matrices medio ambientales [8]. En el organismo humano E1 y E2 se inter convierten generando un equilibrio entre ellos, a su vez,

ambos estrógenos son metabolizados vía hepática en dos fases produciendo los respectivos metabolitos hidroxilados y también los estrógenos conjugados conteniendo grupos glucurónidos y sulfatos, siendo estas últimas las formas metabolizadas menos activas y altamente solubles en agua, favoreciendo su eliminación a través de la orina [7,9,10]. En la Figura 1 se muestran las estructuras químicas de los estrógenos naturales y sus productos de metabolización. En orina se ha monitoreado la presencia de estrógenos, siendo de gran importancia en áreas de investigación del cáncer de mamas y áreas clínicas como en diagnósticos de hiperplasia suprarrenal congénita o diagnósticos prenatal de trastornos que afectan al feto [11]. Por otra parte la presencia de estrógenos y metabolitos hidroxilados en tejidos ha mostrado una fuerte correlación con trastornos cancerosos, por lo que en orina se monitorean los estrógenos E1, E2 y E3, junto con algunas formas de metabolización específicas que podrían indicar prematuramente daños a nivel del ADN. Algunos estudios han interpretado que las formas de metabolización que llevan a 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) y 4-hidroxiestradiol (4-OHE2) producen un alto potencial de riesgo a la formación de quinonas que reaccionan con el ADN, mientras que los compuestos 2-hidroxiestronea (2-OHE1) y 4-hidroxiestronea (4-OHE1), han sido interpretados como “buenos estrógenos” que inhiben la proliferación celular o potenciales factores genotóxicos que producen cáncer de mamas. La forma 16-hidroxiestronea (16-OHE1) es controversial puesto que algunos lo han correlacionado fuertemente con el crecimiento de tumores, mientras que otros no lo estiman como riesgoso en el desarrollo de cáncer de mamas [12]. A pesar de que los estrógenos podrían ser excretados en gran parte en las formas menos activas como estrógenos conjugados, algunos estudios han indicado que ellos pueden ser transformados a su forma libre más activa en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR). Todo lo anterior muestra que es importante conocer la forma

y cantidad de estrógenos que se excretan a través de la orina humana, a modo de dimensionar la magnitud de la exposición y posibles consecuencias que estos compuestos químicos podrían producir hacia el medio ambiente, como también indicar prematuramente alteraciones biológicas que pudieran llevar al desarrollo del cáncer en humanos. Para la determinación de los estrógenos algunos investigadores han propuesto métodos de análisis que incluyen etapas de hidrólisis enzimática a modo de desconjugar los estrógenos y poderlos cuantificar en su forma libre. Para este propósito la hidrólisis enzimática ha sido la técnica más utilizada, a través de la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa proveniente de las especies *Escherichia Coli* o *Hélix pomatia*. Esta enzima presenta actividad tanto glucuronidasa como sulfatasa, pudiendo desconjugar los estrógenos de sus principales grupos de conjugación. En la Figura 2 se muestra un esquema de hidrólisis enzimática donde una molécula **R** conjugada con un grupo glucurónido disuelta en un medio acuoso, es hidrolizada por la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa, obteniendo como producto la molécula R en su forma libre. En las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) los estrógenos conjugados pueden ser hidrolizados por microorganismos, los que pueden actuar en forma similar a la enzima mencionada anteriormente, produciendo que los estrógenos vuelvan a su forma libre más activa [13], los que posteriormente son descargados al medio ambiente al no ser removidos completamente en las PTAR [14], convirtiéndose en una de las principales fuentes de emisión de estrógenos hacia matrices acuosas medioambientales.

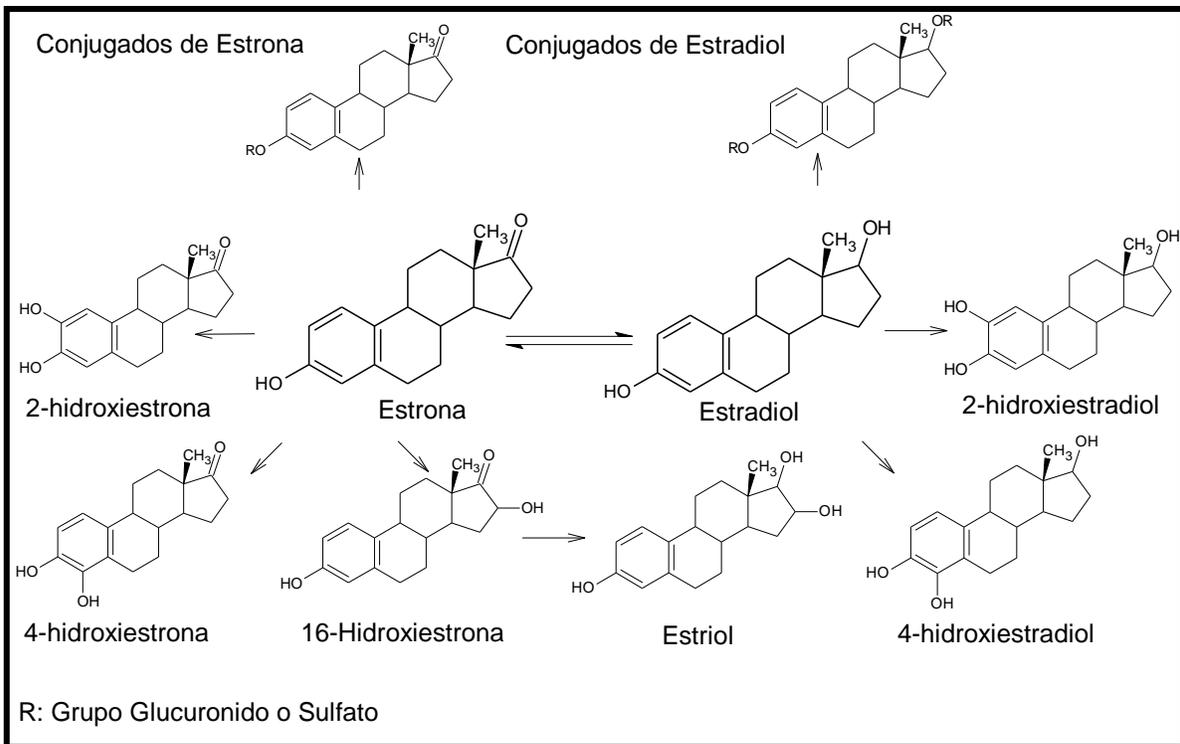


Figura 1. Esquema de metabolización de los estrógenos E1 y E2.

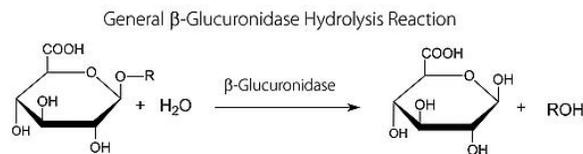


Figura 2. Esquema general de una reacción de hidrólisis enzimática.

Como consecuencia de esta ruta de contaminación, los estrógenos se han encontrado en muestras de aguas residuales tratadas, en países como: Reino Unido, Estados Unidos, Italia, Alemania, España, Holanda, Suiza, Israel, Canadá [1] y Chile [15], llegando a fuentes naturales de agua como ríos, lagos y mares, encontrándose en concentraciones que pueden llegar hasta el orden de los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [7,16,17], pudiendo provocar graves efectos sobre el medio ambiente.

Otro tipo de matriz en que se han estudiado los estrógenos son los tejidos animales, debido a que muchos son utilizados como alimentos [18], sin embargo en los últimos años ha tomado gran importancia la leche derivada principalmente de bovino [19,20], como también en sus derivados [21]. La presencia de estrógenos en estos productos se puede deber a un origen natural ya que estos son producidos endógenamente durante el desarrollo y reproducción, pudiéndose encontrar en diferentes partes del cuerpo. En leche los niveles de E1, E2 y de sus metabolitos pueden aumentar entre 20 [19] y 160 veces durante el periodo de gestación [22]. Por otra parte los estrógenos pueden ser suministrados en animales en forma controlada para favorecer la fertilidad [19], como también podrían ser administrado en forma ilegal, utilizando principalmente estrógenos sintéticos como el EE2 para promover el crecimiento del ganado [19,21,23].

En el año 2013 el consumo de leche se estimó en una cantidad del orden de  $7 \times 10^8$  toneladas anuales a nivel mundial [19], de la cual el 75% de la leche fue producida por vacas en periodos de gestación [22]. En la Unión Europea no existen límites máximos residuales (LMR) para estos compuestos, solo E2 ha sido evaluado por el comité mixto FAO/OMS de expertos en aditivos alimentarios (*JECFA*), sin embargo se consideró poco probable que los residuos de esta sustancia pudiera provocar un daño al ser utilizados como promotor del crecimiento al seguir las buenas prácticas pecuarias (Codex Alimentarius 2018). Sin embargo en China y en la Unión Europea se prohibió el uso de agentes con actividad hormonal para aumentar la producción, donde se incluye E2 [19,21,24]. Existen estudios en que se ha detectado la presencia de E1 en leche llegando a concentraciones que varían entre 8 y  $1266 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , considerando la suma del estrógeno libre y conjugado, mientras que el total de sus metabolitos se han encontrado entre 323 y  $706 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  [19,25]. En base a lo anterior, la leche

podría ser la principal fuente de ingreso de estrógenos al organismo humano a través de la dieta, lo que hace necesario contar con metodologías analíticas capaces de lograr la determinación de estos compuestos en leche, de esta forma controlar su calidad en cuanto al contenido de estrógenos y poder detectar si se aplican buenas prácticas pecuarias en la administración de estrógenos como medicamentos, en respetar periodos de resguardo y evitar la extracción de leche en avanzados periodos de gestación.

Actualmente las técnicas instrumentales más utilizadas para la separación y determinación de este tipo de compuestos son la cromatografía gaseosa (GC) y la cromatografía líquida (LC) acoplada a espectrómetros de masas (MS), debido a la selectividad y sensibilidad que ofrecen estos tipos de acoplamientos.

Los estrógenos son compuestos poco volátiles [14], lo que hace necesario agregar una etapa de derivatización a la preparación de la muestra para poder determinarlos por GC, siendo esta una desventaja respecto a la utilización de LC donde los estrógenos podrían ser determinados directamente. Además en GC las corridas cromatográficas generalmente superan los 30 min de análisis [26] contrastando con determinaciones en LC donde los análisis podrían durar unos pocos minutos por muestra. Por lo anterior, el análisis por LC-MS ha tomado mayor protagonismo para la determinación de compuestos estrogénicos, puesto que este acoplamiento no está limitado a compuestos volátiles de bajo peso molecular. LC-MS ha sido utilizada para la determinación de estrógenos en modo de ionización negativo [8,27–31], sin embargo algunos investigadores han descrito bajas sensibilidades en este modo [10,32]. Se ha propuesto la derivatización de estrógenos agregando un grupo funcional altamente ionizable para incrementar la sensibilidad en modo de ionización positiva [10,12,20,32–41]. Una de las metodologías más utilizadas es la dansilación, la cual es aplicada

a compuestos que contienen anillos fenólicos y en general cuando la espectrometría de masas es utilizada para la detección [10,12,20,32,33,36–43]. Esta derivatización consiste en agregar un grupo funcional amina a la molécula de cada compuesto, obteniendo derivados altamente ionizables capaces de formar aductos con átomos de hidrógeno, los cuales pueden ser detectados mediante ionización positiva según la forma  $[M+H]^+$ . La derivatización con cloruro de dansilo ha resultado ser una metodología simple y efectiva, en ocasiones se ha mejorado la sensibilidad hasta en 3 órdenes de magnitud respecto a la obtenida para el mismo analito no derivatizado determinado en modo negativo [42]. Cloruro de dansilo ha sido ampliamente utilizado para mejorar la sensibilidad de los estrógenos en muestras complejas como; orina [37], plasma [44] y aguas residuales [32], o en matrices en las que estos compuestos se encuentran en concentraciones trazas. Algunos investigadores han estudiado las condiciones de ionización de estos compuestos con diferentes fuentes como: ionización electrospray (ESI) [12], fotoionización a presión atmosférica (APPI) e ionización química a presión atmosférica (APCI) [8]. Las señales  $m/z$  y las intensidades obtenidas para este grupo de compuestos varían dependiendo del instrumento y el tipo de fuente utilizada, por lo que es apropiado hacer un estudio exhaustivo en cuanto a los iones precursores como iones productos en la fuente que se disponga, a modo de obtener los niveles óptimos de sensibilidad para la identificación y cuantificación.

A pesar de la diversidad de instrumentos que se han utilizado para la determinación de estrógenos, la etapa de preparación de la muestra y las técnicas utilizadas para la extracción son generalmente las etapas críticas que determinan el buen resultado de la medición química. En la Tabla 1 se muestran las propiedades físico-químicas de estos compuestos, donde se puede observar que

son un grupo de compuestos poco volátiles (presión de vapor inferior a  $3,4 \times 10^{-8}$  mm Hg), y de mediana a baja polaridad y solubilidad.

Tabla 1. Compuestos estrogénicos y propiedades físico-químicas.

Compuesto	Presión de vapor (mm Hg)	Solubilidad ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Masa Molecular (Da)	Log $K_{O/W}$	pKa
<b>E3</b>	2,0E-10 [14]	441 [9]	288,1725 <sup>a</sup>	2,5 [38]	10,3 [38]
<b>16-OHE1</b>	-	-	286,1569 <sup>a</sup>	2,9 [38]	13,1 [38]
<b>17<math>\beta</math>-E2</b>	1,3E-8 [14]	4 [9]	272,1776 <sup>a</sup>	4,2 [38]	10,3 [38]
<b>17<math>\alpha</math>-EE2</b>	2,7E-9 [14]	11 [9]	296,1776 <sup>a</sup>	4,1 [38] 3,7 [14]	10,2 [38]
<b>E1</b>	3,4E-8 [45]	30 [9]	270,1620 <sup>a</sup>	3,6 [38]	10,3 [38]
<b>4-OHE2</b>	-	-	288,1725 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>	9,8 <sup>a</sup>
<b>2-OHE2</b>	-	-	288,1725 <sup>a</sup>	3,3 [38]	10,1 [38]
<b>4-OHE1</b>	-	-	286,1569 <sup>a</sup>	2,7 [38]	10,1 [38]
<b>2-OHE1</b>	-	-	286,1569 <sup>a</sup>	2,8 [38]	10,1 [38]

a) Chemicalize.[org](http://www.chemicalize.org)

Considerando estas propiedades físico-químicas, se han utilizado técnicas de preparación de muestras donde se utilizan sorbentes sólidos y/o extractantes líquidos para aislar los analitos y poderlos determinar mediante las técnicas anteriormente mencionadas. Algunas de las técnicas de preparación de muestras que han sido utilizadas para la extracción de estrógenos, son la microextracción en fase sólida (SPME) [46], la extracción en fase sólida (SPE) [11], la microextracción en fase sólida dispersiva (d- $\mu$ -SPE) [47], la extracción por sorción en barra de agitación (SBSE) [48], la extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) [15], la extracción en columna monolítica [49], la extracción líquido-líquido (LLE) [36], la extracción líquida soportada (SLE) [50] y

QuEChERS [51] entre otras. Cada técnica puede entregar ciertas ventajas frente a otras técnicas de preparación de muestras, sin embargo la tendencia apunta hacia la reducción en el uso de disolventes orgánicos y a la automatización de las metodologías, aquellas que se enmarcan en estos últimos aspectos, son las técnicas que actualmente están siendo más utilizadas, aunque también es importante considerar aspectos importantes de la muestra como el tipo de matriz y la concentración esperada de los analitos. Por ejemplo, en orina se ha reportado que la cantidad de estrógenos excretada por día podría superar los 20 mg al día en el caso de mujeres embarazadas, mientras que en mujeres no embarazadas y hombres las cantidades van desde los 0,4 a los 20,6  $\mu\text{g}$  en 24 horas [50]. En base a los valores encontrados y considerando la complejidad de la matriz orina, pequeños volúmenes de muestra bastarían para determinar la concentración de estrógenos, siendo un tipo de muestra fácil de obtener en los volúmenes necesarios sin que sea un factor limitante para el análisis. En el caso de muestras acuosas como aguas de ríos, aguas residuales o agua potable se producen algunos escenarios distintos, ya que en agua potable estamos en presencia de una matriz sin muchos interferentes en comparación con muestras de aguas de ríos y/o aguas residuales, sin embargo la concentración de estrógenos podría estar en niveles bajo el orden de los  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que podría ser necesario que la metodología de extracción conlleve factores de concentración para lograr cuantificar los estrógenos a estos niveles de concentración, para lo cual se podría trabajar con mayores volúmenes de muestra a los utilizados para análisis de orina, leche, suero, etc. sin embargo grandes volúmenes de muestra hacen que las metodologías analíticas se tornen tediosas y poco aplicables a análisis de rutina. Cuando la muestra es compleja como en el caso de aguas de ríos o aguas residuales, los interferentes también pueden concentrarse provocando pérdidas en la sensibilidad de la metodología, por lo que el volumen de muestra se limita a la

capacidad de obtener extractos en las condiciones necesarias para poder realizar una adecuada determinación analítica. Un caso diferente son las muestras de leche, debido a que estas contienen altas cantidades de proteínas, grasas, carbohidratos, azúcares, vitaminas y minerales, siendo una muestra de alta complejidad, necesitando que en la extracción se logre separar gran parte de los componentes de la leche que pueden interferir en la extracción o dañar la instrumentación utilizada en la etapa de determinación. Por ejemplo las proteínas podrían inmovilizarse permanentemente en columnas de cromatografía líquida utilizadas para la separación de los componentes de la muestra. Por otra parte, los analitos apolares migran en conjunto con las grasas presentes en la leche, lo que dificulta la extracción y limpieza de los extractos finales. La separación de las proteínas de la leche puede lograrse mediante su precipitación, para lo que se han utilizado distintos disolventes orgánicos como acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, metanol, o mezclas de ellos para este fin. También se ha logrado la precipitación de proteínas acidificando la muestra con ácidos como por ejemplo: ácido acético, perclórico, tricloroacético o ácido sulfúrico entre otros [19], provocando la desnaturalización de las proteínas, haciéndolas precipitar. Luego de la precipitación de proteínas se han utilizado técnicas de extracción y/o limpieza para remover los analitos del sobrenadante y poder obtener extractos limpios y adecuados para ser analizados. En los últimos años se han utilizado diferentes métodos QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) para la preparación de muestras de alimentos, debido a que se logra aislar los analitos de interés reduciendo los co-extractivos de la matriz, siendo una metodología que ha resultado ser altamente efectiva, pudiéndose extraer diversos tipos de compuestos en distintas matrices alimenticias. Los principios de las técnicas de preparación de muestras que han sido utilizadas para la extracción de

estrógenos en los tres tipos de matrices anteriormente señaladas, se describen a continuación.

## **1.1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN.**

Las técnicas de extracción que a continuación se detallan han sido desarrolladas enfatizando en contribuir con algunos de los principios de la química verde, usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en etapas de acondicionamiento, extracción y limpieza.

### **1.1.1. Extracción en fase sólida (SPE).**

La extracción en fase sólida es una potente, rápida y simple técnica de extracción y/o limpieza de muestras. Se basa en la partición selectiva, de uno o más compuestos entre dos fases, una de las cuales es un sólido adsorbente. La segunda fase suele ser un líquido, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico. SPE permite la concentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida que puede ser de diferentes características entre las cuales se encuentran polímeros que contienen grupos activos como octadecil de característica (C18), divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona más conocido como HLB por su balance hidrofílico-lipofílico, aminas cuaternarias, etc., abarcando un amplio espectro de polaridades. Posteriormente los contaminantes de la matriz son eluidos en una etapa de lavado y luego los analitos de interés son eluidos disminuyendo el efecto matriz. Esta técnica ha sido utilizada en diversos estudios [5,22,24,28,29,42,52], siendo la técnica más utilizada para la determinación de estrógenos desde muestras líquidas.

### **1.1.2. Microextracción en fase sólida (SPME).**

La microextracción en fase sólida se comenzó a desarrollar en el año 1989 por J. Pawliszyn, esta técnica tiene la ventaja de prácticamente no utilizar disolventes

orgánicos, ya que en determinadas aplicaciones en cromatografía líquida, se utiliza desorción en línea con pequeñas cantidades de disolvente. SPME logra concentrar los analitos mediante la exposición de una fibra de sílice fundida, recubierta con una película de polidimetilsiloxano (PDMS) u otro sorbente apropiado como se muestra en la Figura 3, directamente en la muestra, o en el espacio cabeza por un tiempo determinado, luego la desorción del analito, se realiza normalmente mediante desorción térmica directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases.

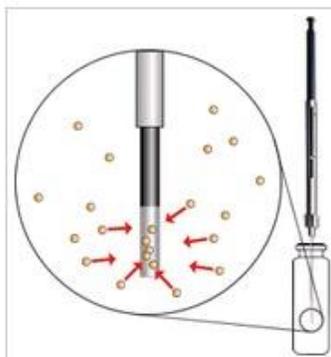


Figura 3. Representación de la microextracción en fase sólida.

La evolución de SPME ha permitido mejorar la capacidad de esta técnica, utilizando diferentes polímeros y de espesor variable [53]. Se han descrito diversos sorbentes para su uso como PDMS, polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) y poliacrilato (PA), dependiendo de la polaridad del analito. Uno de los inconvenientes de SPME es la pequeña cantidad de fase sorbente que se usa como recubrimiento (alrededor de 0,5  $\mu\text{L}$ ), lográndose extracciones cuantitativas para compuestos de muy baja polaridad; lo que implica que un número limitado de compuestos puedan extraerse mediante esta técnica con PDMS como fase sorbente.

### 1.1.3. Extracción por sorción en barra de agitación (SBSE).

En 1999 la extracción por sorción en barra de agitación fue introducida como una novedosa técnica de preparación de muestra [54]. Aquí los analitos son extraídos desde la matriz, generalmente acuosa, a una fase líquida no miscible, preferentemente de PDMS. La técnica de SBSE se basa en los principios de la SPME, aunque en vez de utilizar una delgada fibra recubierta con un material sorbente (0,5  $\mu\text{L}$ ), ésta se compone de una barra de agitación magnética recubierta con sorbente como se muestra en la Figura 4, en cantidades entre los 50-300  $\mu\text{L}$  de PDMS.

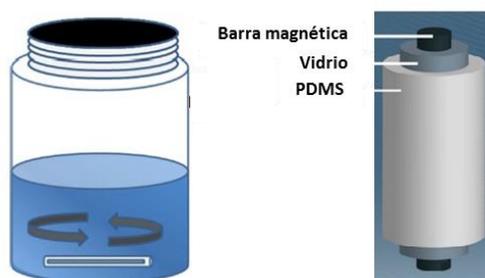


Figura 4. Representación de la operación y composición de la técnica SBSE.

Una mayor cantidad de fase sorbente favorece el equilibrio de partición PDMS-agua, alcanzando al menos una sensibilidad 100 veces mayor que SPME. Esta técnica permite la extracción cuantitativa de analitos con una constante de partición octanol/agua ( $K_{O/W}$ ) mayor que 500 [54], mientras SPME permite una extracción cuantitativa de compuestos con un  $K_{O/W}$  de  $10^5$  en adelante como se muestra en la Figura 5. SBSE ha sido utilizada en la extracción de diversos compuestos químicos como también para hormonas estrogénicas [55–57]. Las desventajas de esta técnica de extracción son que comercialmente se encuentra prácticamente solo con PDMS como material sorbente y una velocidad de agitación sobre los 600 rpm puede causar daño físico en la fase sorbente debido al contacto directo de la barra con el fondo del vial de extracción [58], por otra parte

la relación área volumen no es muy favorable y el valor por unidad bordea a los 200 dólares.

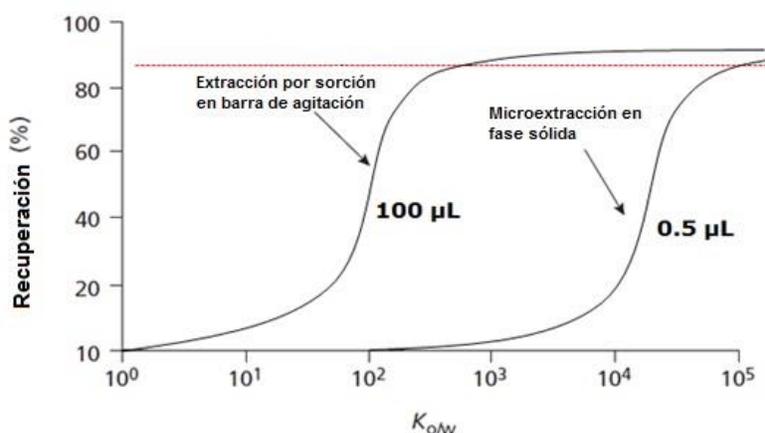


Figura 5. Comparación de las recuperaciones teóricas en 10 mL de agua utilizando 100  $\mu$ L de PDMS en SBSE y 0,5  $\mu$ L en SPME para analitos con distintos  $K_{O/W}$  [24].

#### 1.1.4. Extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE).

En el año 2009 se desarrolló la técnica de extracción por sorción en disco rotatorio [59]. basándose en la tecnología de bio-reactores rotatorios [60,61], con la finalidad de mejorar aquellas desventajas de las técnicas de extracción mencionadas anteriormente. Esta consiste en un disco de teflón con una barra magnética en su interior que en los primeros reportes de RDSE se utilizó una fase sorbente de PDMS inmovilizada en una de sus superficies como se muestra en la Figura 6a, o con fases de C18 inmovilizado en teflón como se muestra en la Figura 6b. Esta técnica tiene una fase con una alta razón superficie/volumen, y puede rotar a más altas velocidades con respecto a SBSE, sin que ésta se dañe, ya que, sólo está en contacto con la muestra y no con el fondo del vial. PDMS es una fase sorbente adecuada para extraer compuestos de baja polaridad, sin embargo existen otras fases que extraen eficientemente compuestos con características de polaridad intermedia, como HLB y estireno-divinilbenceno (e-DVB). Algunas de

estas fases sorbentes son adquiridas comercialmente solo en forma pulverizada, lo que las hace incompatibles con la configuración original del disco. En este contexto el disco rotatorio fue modificado para poder inmovilizar este tipo de fases sorbentes, adaptándose mediante una cavidad central, como se muestra en la Figura 6c, en este dispositivo se introduce una fase sorbente en forma de polvo, luego se cubre con una lámina circular de papel filtro, fibra de vidrio o polietileno sulfonado (PES)[62], la que es soportada por un anillo de teflón. RDSE es una técnica versátil, de fácil automatización, cumple con principios de la química verde [63], además de ser una técnica rápida y económica, ha resultado adecuada en el desarrollo de metodologías analíticas de diversos contaminantes medio ambientales como: antiinflamatorios [64,65], antibióticos [66], surfactantes [59], antisépticos [67], colorantes [68,69], plaguicidas [62], PAHs [70] y hormonas [15].

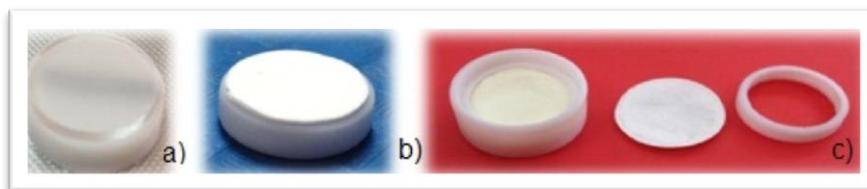


Figura 6. Conformaciones del disco con distintas fases sorbentes inmovilizadas, a) PDMS, b) C18 y c) Oasis HLB y partes del disco con cavidad.

#### 1.1.4.1. Fases sorbentes utilizadas en RDSE.

##### a) Divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona.

Esta fase sorbente es obtenida desde cartuchos de SPE Oasis HLB adquiridos desde la empresa Waters. El copolímero divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona que se muestra en la Figura 7, se presenta físicamente como un polvo fino de color levemente amarillo. Los monómeros que la componen le permiten interactuar hidrofílicamente a través del grupo lactama y lipofílicamente por los grupos divinilbenceno presentando un balance hidrofílico-lipofílico (HLB por sus

siglas en inglés) lo que le confiere afinidad con analitos polares como apolares, esta fase ha sido ampliamente utilizada en la extracción de diversos tipos de compuestos orgánicos [15,64,71]. Debido a la forma pulverizada en que esta fase se encuentra disponible, debe ser utilizada en el disco rotatorio con cavidad, descrito anteriormente. Para favorecer la interacción analito-sorbente es necesario acondicionar la fase en forma secuencial con pequeñas cantidades de disolvente orgánico, utilizando acetato de etilo (AcOEt), metanol (MeOH) y agua, previamente a la extracción.

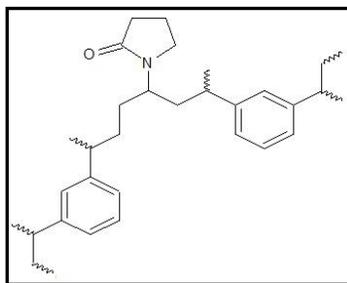


Figura 7. Estructura química de divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB).

### b) C18

La fase C18 es obtenida comercialmente impregnada en teflón en forma de láminas circulares de 47 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor o también en forma granulada, este sorbente corresponde a cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos unidos en forma covalente a cadenas de sílica como se muestra en la Figura 8, de esta forma se obtiene un polímero con una alta afinidad a compuestos de baja polaridad. Para obtener recuperaciones óptimas con C18, debe ser acondicionado previo a su utilización en forma secuencial con metanol y agua, manteniéndolo siempre humectado para que las cadenas hidrocarbonadas se mantengan activas para que puedan interactuar y retener los compuestos de interés.

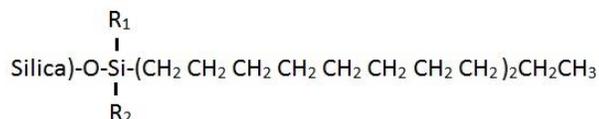


Figura 8. Estructura química de la fase sorbente C18.

**c) Estireno divinilbenceno (e-DVB) lámina y polvo.**

Esta fase sorbente corresponde al copolímero compuesto por los monómeros estireno y divinilbenceno. Las ventajas de esta fase sorbente se debe a que no está enlazado a sílica como C18, por lo que no existen grupos silanoles que pueden producir interacciones secundarias del tipo catiónicas y por el mismo motivo no se encuentra limitado a ciertos valores de pH, siendo estable entre pH 1 y 14. Esta fase se compone de partículas 100% esféricas, porosas de diámetros de 80 angstrom y entrecruzadas, produciendo interacciones predecibles a través de los anillos aromáticos y cadenas alquílicas, entregando selectividad y reproducibilidad en la extracción especialmente para analitos de polaridad intermedia que sean solubles en medios acuosos. Este copolímero puede ser obtenido en gránulos como también impregnado en teflón en discos de 47 mm para extracción en fase sólida.

**d) Intercambiador aniónico amina cuaternaria-octil (CUQAX).**

Esta fase sorbente corresponde a un copolímero compuesto por una amina cuaternarias enlazada a cadenas alquílicas de 8 carbonos (C8), esta fase sorbente contiene una carga orgánica del 13%, un tamaño de poro de 60 angstrom y un área superficial de 500 m<sup>2</sup> por gramo, esta fase sorbente es utilizada principalmente para realizar limpiezas de muestras ya que puede interactuar reteniendo aniones desde una muestra líquida a través de las cargas positivas presentes en el grupo amino por lo que el pH del medio es importante en este tipo de fase sorbente. Por otra parte debido a la presencia de cadenas alquílicas en este

sorbente, también podría interactuar con los grupos de menor polaridad presentes en los compuestos químicos.

**e) Intercambiador aniónico en base a poliestireno-divinilbenceno (QAX).**

Esta fase corresponde a un intercambiador aniónico compuesto de amonio cuaternario en un soporte polimérico de poliestireno-divinilbenceno, físicamente es un polvo blanco de tamaño de partícula de 40 a 63  $\mu\text{m}$  de diámetro, al utilizar esta fase sorbente, es importante el pH al que se realiza el tratamiento de la muestra, puesto las interacciones con los analitos ocurrirán principalmente cuando estos se encuentren en su forma iónica con cargas negativas.

**f) Sílica.**

Este sorbente está compuesto de sílica con cadenas de carbono que contienen grupos funcionales polares. Corresponde a un polvo blanco con tamaños de poros de 60 angstrom y de área superficial de 500  $\text{m}^2$  por gramo. Este tipo de fase sorbente es usada para extraer compuestos que muestran uniones del tipo polar como puentes de hidrógeno, interacciones pi-pi o dipolo-dipolo, comúnmente son extraídos analitos que contienen grupos amina, hidroxilos y carbonilos.

**g) Anión SR.**

Esta fase corresponde a un intercambiador aniónico compuesto de amonio cuaternario en un soporte polimérico de poliestireno-divinilbenceno, físicamente corresponde a una lámina circular de 47 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor, de tamaño de partícula de 12  $\mu\text{m}$  de diámetro, con un área superficial de 350  $\text{mm}^2$  por gramo y un tamaño de poro de 80 angstrom, en este caso es importante el pH al que se realiza el tratamiento de la muestra puesto las interacciones con los analitos ocurrirán principalmente cuando estos se encuentren en su forma iónica con cargas negativas, al igual que la fase QAX, anteriormente mencionada.

### h) Polidimetilsiloxano (PDMS).

El PDMS es una fase polimérica que pertenece al grupo de compuestos orgánicos de silicio, que se conoce comúnmente como silicona. El PDMS es ópticamente transparente y es considerado inerte, no tóxico y no inflamable. La fase polimérica de PDMS extrae por absorción, preferentemente analitos no polares, a pesar de que se han informado recuperaciones cuantitativas de compuestos polares. Parte de la estructura química se muestra en la Figura 9.

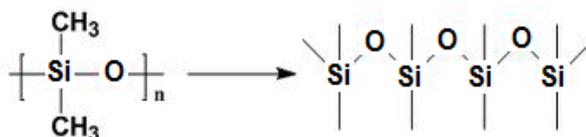


Figura 9. Representación de la estructura química del PDMS.

### i) Polímeros sintéticos.

En el laboratorio de Química Ambiental se disponía de 9 polímeros sintetizados a partir de 3 monómeros en distintas cantidades, los polímeros 1, 2 y 3 fueron sintetizados a partir de un monómero básico, vinilpirrolidona, 4, 5 y 6 sintetizados a partir de un monómero básico, 1-vinilimidazol, mientras que 7, 8 y 9 a partir de un monómero neutro, acrilamida, las cantidades de iniciador, entrecruzante y disolvente utilizado en la síntesis se muestran en la Tabla A1 del Anexo.

#### 1.1.5. QuEChERS.

El método QuEChERS nombre adquirido de sus siglas en inglés (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*) que significan rápido, fácil, económico, efectivo, robusto y seguro. Fue propuesto originalmente en el año 2003 por Anastassiades y colaboradores [72] como una técnica de preparación de muestras, basada en las condiciones que normalmente eran utilizadas para analizar multiresiduos de

agrotóxicos (plaguicidas) en alimentos. Esta metodología consta de tres etapas principales: (1) Extracción con acetonitrilo, (2) Partición promovida por la adición de sales como sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) y cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) y (3) limpieza del extracto utilizando la técnica denominada “extracción en fase sólida dispersiva” (*dispersive solid phase extraction*, d-SPE). La utilización de acetonitrilo como disolvente posibilita la extracción de una menor cantidad de interferentes provenientes de la muestra, por ejemplo: ceras, grasas y pigmentos, además proporciona la extracción de una amplia gama de analitos con diferentes polaridades y cuando es acidificado, permite recuperaciones satisfactorias de analitos que generalmente presentan problemas de estabilidad. Otra ventaja del acetonitrilo es que es más adecuado para LC-MS que acetona o acetato de etilo y puede ser utilizado sin problemas en análisis por GC-MS [72]. En la etapa de partición, la adición de sales como  $\text{NaCl}$ , promueve el efecto “*salting out*”, siendo utilizada en varios métodos de análisis de multiresiduos. Dependiendo de la naturaleza del disolvente utilizado en la extracción, se obtienen mejores porcentajes de recuperación para analitos polares ya que la adición de sales disminuye la solubilidad de estos compuestos en la fase acuosa como también la cantidad de agua en la fase orgánica. En la extracción con acetonitrilo, la adición de sales es muy conveniente puesto que es rápida, fácil, económica, tiene la gran ventaja de no diluir el extracto de la muestra y proporcionar la separación de las fases orgánicas y acuosas [72]. La adición de sales secantes, como sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) tienen la finalidad de mejorar la recuperación de compuestos polares. La elección de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) en el desarrollo del método QuEChERS se debe a la mayor capacidad de esta sal de remover agua comparada con otras sales, cuando se utiliza en la forma anhidra su hidratación produce una reacción exotérmica, teniendo como resultado el aumento de la temperatura de la muestra a valores entre 40 y 45°C, favoreciendo la extracción principalmente de

compuestos apolares [72]. Durante el desarrollo del método original de QuEChERS algunos plaguicidas mostraron problemas de estabilidad según el pH de la matriz. De esa forma durante la optimización del método se percibió que al utilizar tampones que generaran valores de pH cercanos a 5, obteniéndose recuperaciones satisfactorias (>70%) para compuestos dependientes del pH, independientemente de la matriz utilizada. De acuerdo a Lehotay y Anastassiades, la adición de una etapa de tamponamiento fue la primera modificación propuesta para el método QuEChERS (original), con el objetivo de obtener recuperaciones entre el 70 y 120%. En el año 2005 Lehotay y colaboradores [73] desarrollaron el método “QuEChERS acetato” en el cual la extracción es realizada con acetonitrilo conteniendo 1% (v/v) de ácido acético y el efecto tamponante (pH 4,8) fue promovido por la adición de acetato de sodio. En el año 2007 este método fue adoptado como método oficial de la Asociación Oficial de Química Analítica (AOAC por sus siglas en inglés) para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos.

En el año 2007 Anastassiades propuso el método “QuEChERS citrato” el cual utiliza una mezcla de citrato de sodio di-hidratado ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) e hidrógeno citrato sesqui-hidratado ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1,5H_2O$ ) como responsables del efecto tamponante (pH 5,0–5,5), metodología que en el año 2008, el Comité Europeo de Normalización (CEN) oficializó el método “QuEChERS citrato” como método de referencia en la Unión Europea. En estos métodos, la limpieza de los extractos es esencial para promover robustez y confiabilidad en los resultados obtenidos por sistemas cromatográficos, ya que componentes no volátiles de la matriz pueden quedar adheridos en el sistema de inyección y también en la columna cromatográfica alterando la respuesta del sistema y aumentando la frecuencia de la mantención de los equipamientos y por lo tanto

los costos de operación. En la Figura 10, se muestran las cantidades y proporciones entre disolvente, muestra y sales utilizadas en las 3 metodologías QuEChERS anteriormente descritas.

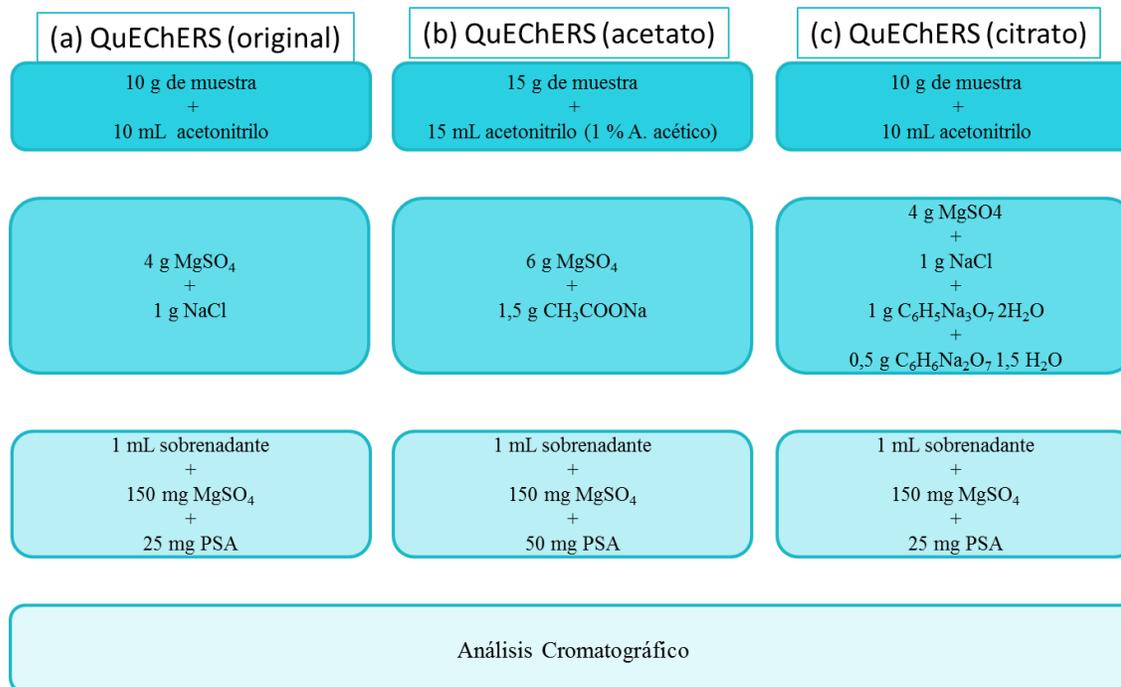


Figura 10. Proporciones entre muestra/acetonitrilo y cantidad de sales y sorbentes utilizadas en las metodologías QuEChERS.

El método *d*-SPE, propuesto por Anastassiades se basa en un procedimiento simple para ser empleado en la limpieza del extracto para ser analizado por cromatografía. En la propuesta original se agita 1 mL de extracto con 25 mg de sorbente PSA. La agitación tiene como finalidad homogenizar el sorbente para facilitar el proceso de limpieza, luego el sorbente es separado por centrifugación, tomando una alícuota del sobrenadante del extracto final para el análisis, de esta manera el sorbente actúa como un filtro químico reteniendo los co-extractos no deseados de la matriz. En *d*-SPE se utiliza una pequeña cantidad de sorbente en comparación con SPE, disminuyendo los costos de operación, además de no necesitar cartuchos. Una de las principales ventajas de *d*-SPE es que es un método

versátil para establecer nuevos métodos utilizando diferentes cantidades de sorbentes y/o mezclas de ellos dependiendo del tipo de matriz y analito de interés, además de descartar las etapas de acondicionamiento. El sorbente etilendiamino-N-propilsilano es un compuesto que contiene una amina primaria y una secundaria (PSA) que actúa como un intercambiador aniónico que puede interactuar con otros compuestos a través de puentes de hidrógeno y/o fuerzas dipolo-dipolo. Tiene fuerte interacción con los compuestos de la matriz siendo utilizado para remover los interferentes. La estructura bidentada del PSA, que se muestra en la Figura 11, tiene un efecto quelante debido a la presencia de los grupos amino primario y secundario en su estructura. Como resultado se genera la retención de los ácidos grasos libres, azúcares y de otros compuestos polares presentes en la matriz. Por otro lado no es tan eficiente en la remoción de las grasas por lo que en ocasiones ha sido usado en combinación con otros sorbentes, principalmente con C18 o carbono grafitizado. El tamaño de partícula utilizado es generalmente de 40 µm. Las diferentes versiones del método QuEChERS utilizan en general 25 o 50 mg de PSA por cada mL de extracto. Para algunas matrices como cereales, se utiliza una mayor cantidad de PSA en la etapa *d*-SPE con la intención de remover de forma más eficiente, los ácidos grasos co-extraídos.

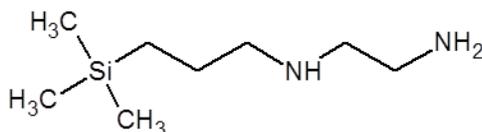


Figura 11. Estructura química de PSA.

## 1.2. INSTRUMENTACIÓN.

### 1.2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (UHPLC).

La cromatografía líquida, en particular UHPLC otorga la ventaja de poder separar varios analitos en corridas cromatográficas cortas, esto se hace posible gracias a los tamaños de partículas utilizados en las columnas UHPLC, permitiendo una

alta interacción del analito con la fase estacionaria, generándose más equilibrios que en una columna convencional, obteniéndose buenas resoluciones sin la necesidad de largas corridas cromatográficas.

### **1.2.2. Analizador TOF acoplado a espectrometría de masas.**

Los analizadores de tiempo de vuelo (TOF) de última generación ofrecen resolver señales  $m/z$  hasta con cuatro cifras decimales, utilizando soluciones de calibración propias para la fuente de ionización utilizada, de esta forma se logra obtener las masas exactas de los compuestos químicos a determinar con errores menores a 10 ppm, pudiendo discriminar entre compuestos con similares señales  $m/z$ , que un analizador triple cuadrupolo o de trampa iónica no podría distinguir. Para la calibración del instrumento se cuenta con un mix de calibración, en el que en modo positivo ionizan con masas exactas conocidas de señales  $m/z$  118,08625, 322,04812, 622,02896 y 922,00979 para el intervalo de  $m/z$  entre 100 y 1000, las cuales permiten la calibración del sistema TOF/MS.

Otra ventaja del acoplamiento TOF/MS, es que no se pierde la información estructural de los compuestos analizados puesto que la señal  $m/z$  encontrada corresponde a la masa exacta del ion pseudomolecular [71], generalmente en modo positivo según la forma  $[M+H]^+$  o en modo negativo  $[M-H]^-$ . Por otra parte debido al monitoreo constante en todo el intervalo de masas seleccionado durante una corrida cromatográfica, es que es posible además realizar análisis no dirigidos, es decir pudiendo en ocasiones determinar la presencia de ciertos compuestos en muestras que fueron analizadas cuando temporalmente ese compuesto no era de interés analítico, esto es posible ya que no es indispensable conocer los patrones de fragmentación y programar una búsqueda dirigida, en el espectrómetro de masas se registran todas las señales  $m/z$  de compuestos cargados

que se introducen en él, generando la información correspondiente, donde la selectividad se obtiene en la alta resolución de masas que entrega este sistema.

### **1.2.3. Analizador QqQ acoplado a espectrometría de masas.**

El analizador de triple cuadrupolo acoplado a espectrometría de masas (QqQ/MS) es el más utilizado en química analítica para la determinación de compuestos orgánicos, debido a su facilidad de operación, buena sensibilidad y selectividad. El cuadrupolo está compuesto de cuatro barras metálicas paralelas por las que se aplica corriente continua y radiofrecuencias que varían en magnitud durante el paso de los iones por el cuadrupolo. El analizador QqQ está compuesto por tres cuadrupolo en serie, sin embargo el segundo no es utilizado para separar iones, sino que es utilizado como celda de colisión. Los iones de interés son seleccionados en el primer cuadrupolo (Q1), luego en el segundo cuadrupolo o celda de colisión (q2) el ion precursor proveniente de Q1 es acelerado por un potencial eléctrico hacia una región de bajas presiones o alto vacío donde ocurren repetidas colisiones con un gas inerte (argón, helio o nitrógeno) de elevada energía que produce la formación de iones productos o fragmentos, que luego son analizados en el tercer cuadrupolo (Q3) y luego detectados en el detector de masas, de esta forma se obtienen altos niveles de selectividad que permite el análisis de compuestos que podrían no haber sido separados durante la cromatografía, sin embargo si sus iones precursores o productos son diferentes pueden ser cuantificados independientemente de la eficiencia de la separación cromatográfica. La selectividad de este acoplamiento produce una línea base o ruido de baja intensidad que permite que sea posible detectar compuestos químicos al nivel de trazas, y presentar buena especificidad cuando se utilizan muestra de alta complejidad, lo que se traduce en ocasiones en una ventaja sobre

el acoplamiento TOF/MS, puesto que generalmente se obtiene mayor sensibilidad.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS.**

“Desarrollos analíticos utilizando la técnica RDSE permitirá la extracción de estrógenos desde muestras líquidas medioambientales y biológicas en forma rápida, simple y limpia, generando la preconcentración necesaria para poder determinarlos selectivamente a niveles trazas mediante el acoplamiento de la cromatografía líquida y la espectrometría de masas (LC-MS)”.

### **2.2. OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar metodologías analíticas que permitan extraer compuestos estrogénicos desde muestras líquidas ambientales y biológicas, utilizando RDSE y determinarlos mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS).

### **2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Implementar una metodología de derivatización de estrógenos para aumentar la sensibilidad en la detección por espectrometría de masas.
- Desarrollar una metodología para la determinación de los estrógenos derivatizados mediante LC-TOF/MS.
- Desarrollar metodologías para la extracción de estrógenos y sus metabolitos hidroxilados desde muestras de aguas, orina y leche.
- Optimizar las variables químicas e hidrodinámicas que influyen en la extracción de estrógenos desde las matrices estudiadas.
- Aplicar una metodología de hidrólisis enzimática sobre estrógenos conjugados en muestras de orina y leche.
- Determinar los estrógenos libres, metabolitos hidroxilados y estrógenos totales en muestras de orina y leche.
- Realizar una comparación con otras metodologías de preparación de muestras.

- Analizar e interpretar resultados.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. MATERIALES.**

- Viales de vidrio ámbar 2, 12 y 30 mL con tapa sólida con liner de teflón.
- Matraz de aforo clase A de 10 mL, Brand.
- Matraz de aforo clase A de 500 mL, Brand.
- Micro-jeringa 50  $\mu$ L, Hamilton.
- Micro-jeringa 10  $\mu$ L, Hamilton.
- Disco rotatorio de teflón 1,5 cm de diámetro, con barra magnética, cavidad y anillo.
- Disco rotatorio de teflón 1,5 cm de diámetro con barra magnética y plano.
- Jeringa hipodérmica 2 mL, Ruthe.
- Filtros de jeringa PTFE 0,22  $\mu$ m, Millipore.
- Filtros de jeringa PVDF 0,45  $\mu$ m, Millipore.
- Papel filtro N°2 125 mm, Whatman.
- Micropipetas 20-200  $\mu$ L, Labopette.
- Micropipetas 100-1000  $\mu$ L, Labopette.
- Puntas de micro pipetas de 200 y 1000  $\mu$ L.
- Pipetas pasteur 150 mm, Hirschmann.
- Materiales de vidrio (vaso de precipitado, pipetas volumétricas, botellas) Brand.
- Cinta doble contacto, 3M.
- Sacabocado de golpe 12 mm de diámetro, Elora.
- Tubos centrífuga fondo cónico de 50 mL polipropileno, VWR.
- Columnas SPE (HLB) 3 mL, 60 mg, Supelco.

### 3.2. REACTIVOS.

- 2-Hidroxiestrone TRC (Toronto Research Chemicals INC, Canadá).
- 16 $\alpha$ -Hidroxiestrone TRC (Toronto Research Chemicals INC, Canadá).
- 17 $\beta$ -estradiol (Dr. Ehrenstorfer, Alemania).
- Estriol (Dr. Ehrenstorfer, Alemania).
- Estrone (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- 4-Hidroxiestrone (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- 2-Hidroxiestradiol (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- 4-Hidroxiestradiol (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- 17 $\alpha$ -etinilestradiol (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- Estándar marcado (20,21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-17 $\alpha$ -etil estradiol (Wellington Laboratories, Canadá).
- Cloruro de dansilo (5-Dimetilamino naftaleno-1-sulfonil cloruro) de pureza > 99,0% (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- Enzima  $\beta$ -Glucuronidasa tipo HP-2 con actividad glucuronidasa  $\geq$  a 100.000 unidades de actividad por 1 mL de solución, y actividad secundaria sulfatasa de aproximadamente 7.500 de unidades por 1 mL de solución.
- Agua desionizada.
- Nitrógeno (pureza  $\geq$  99,995%) (Linde, Chile).
- Metanol grado LC-MS (Merck, Alemania).
- Acetonitrilo grado LC-MS (Merck, Alemania).
- Agua grado LC-MS (Merck, Alemania).
- Metanol Grado cromatografía líquida (Merck, Alemania).
- Acetato de etilo grado cromatografía líquida (Merck, Alemania).
- Acetona (grado HPLC, 99,8% de pureza) (Merck, Alemania).
- Carbonato ácido de sodio (99,5% de pureza) (Merck, Alemania).

- Ácido fórmico > 98% de pureza (Merck, Alemania).
- Ácido clorhídrico 37% p.a. (Merck, Alemania)
- Ácido acético glacial grado LC (JT Baker, EE.UU.).
- Hidróxido de sodio (pureza  $\geq 99\%$ ) (Merck, Alemania).
- Solución ESI tuning mix G2421A (Agilent, EE.UU.).
- Cloruro de sodio 99,5% p.a. (Merck, Alemania)
- Nitrógeno extra puro 99,995% (Linde, Chile).
- Sorbente Oasis® HLB 30 $\mu$ m (Waters, EE.UU.).
- Octadecil C18 Empore™ 47 mm disco para extracción en fase sólida (3M, EE.UU.)
- Disco para extracción en fase sólida estireno divinilbenceno Empore™ 47 mm (3M, EE.UU.).
- Sulfato de magnesio anhidro (MgSO<sub>4</sub>), (JT Baker, EE.UU.).
- Citrato de sodio di-hidratado (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub>·2H<sub>2</sub>O), (Sigma Aldrich, EE.UU.).
- Citrato de sodio sesqui hidratado (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Na<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·1.5H<sub>2</sub>O), (Sigma Aldrich, EE.UU.)
- PSA, 40  $\mu$ m (Agilent, EE.UU.).
- C18, 40  $\mu$ m (Agilent, EE.UU.).
- Acetato de sodio, (JT Baker, EE.UU.).
- Membrana polietersulfona (PES) 0,1  $\mu$ m (GVS Life Sciences, Brasil).

### **3.3. EQUIPOS.**

- Sistema de purificación de agua Milli-Q Direct UV3® (Millipore, EE.UU.).
- Evaporador con corriente de nitrógeno y baño termoregulado TurboVap LV (Biotage, U.K).
- Balanza analítica Precisa 125A (Swiss Quality, Suiza).

- Balanza analítica APX-200 (Denver Instruments, Brasil).
- Balanza micro analítica.
- pH metro modelo pMX 3000 (WTW, Alemania).
- pH metro 500 series Cole Parmer (Vernon Hills, EE.UU.).
- Vortex Mixer KMC-1300V (Vision Scientific, Korea).
- Centrífuga refrigerada NT 825 (Nova Técnica, Brasil).
- Centrífuga refrigerada SL 703 (Solab, Brasil).
- Sistema SPE Manifold modelo estándar de 12 puertos (Supelco Visiprep™, EE.UU.).
- Bloque calefactor Standard Heatblock (VWR, EE.UU.).
- Agitador magnético MMS-3000 (Boeco, Alemania).
- Agitador magnético multipunto MS-52M (Jeio Tech, Korea).
- Agitador magnético múltiple (SP labor, Brasil).
- Refrigerador, GM-B471 UVB (LG, Korea).
- UHPLC modelo Flexar FX-15 (PerkinElmer, EE.UU.).
- Bomba binaria Flexar FX-15 (PerkinElmer, EE.UU.).
- Desgasificador Flexar FX-15 (PerkinElmer, EE.UU.).
- Autosampler con enfriador Flexar FX-15 (PerkinElmer, EE.UU.).
- Horno para columna Flexar FX-15 (PerkinElmer, EE.UU.).
- Sistema Tiempo de Vuelo (TOF) con detector de masas modelo AxION 2 TOF MS (PerkinElmer, EE.UU.).
- Generador de nitrógeno Parker (Ohio, EE.UU.).
- Generador de nitrógeno NM30L-MS (Peak Scientific, Escocia).
- Gas argón 6.0, gas de colisión (White Martins, Brasil)
- Columna LC Brownlee SPP-C18 (2,1 x 75 mm, 2,7 μm) (PerkinElmer, EE.UU.).

- Programas controladores Chromera y TOF MS Drive.
- Programa Workstation 6.6 software
- HPLC 212 LC (Varian, EE.UU.)
- Bomba binaria (Varian, EE.UU.)
- Autosampler ProStar 410 (Varian, EE.UU.)
- Sistema triple cuadrupolo (QqQ) con detector de masas 320MS (Varian, EE.UU.)

### **3.4. METODOLOGÍA.**

#### **3.4.1. Selección de los analitos.**

Los analitos seleccionados en este trabajo corresponden a una familia de compuestos estrogénicos entre los que se encuentran las hormonas E1 y E2 con sus principales productos de metabolización como 2-OHE1, 4-OHE1, 16-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y E3, adicionalmente se seleccionó el compuesto sintético EE2. Se utilizó el estrógeno sintético EE2 marcado isotópicamente (20,21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-17 $\alpha$ -etinil estradiol como estándar surrogate para hacer correcciones al momento de analizar muestras reales complejas.

#### **3.4.2. Preparación de soluciones estándares de las hormonas.**

Se prepararon estándares de cada una de las hormonas hidroxiladas (2-OHE1, 4-OHE1, 16-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE1) tomando 1 mg y llevándolo a 1 mL con metanol en un matraz de aforo, obteniendo un estándar de 1000 mg·L<sup>-1</sup> de cada compuesto. Los estrógenos E1, E2, EE2 y E3 fueron preparados pesando 10 mg de cada compuesto y llevado a un matraz aforado de 10 mL y disueltos con metanol, obteniendo estándares de 1000 mg·L<sup>-1</sup>. A partir de cada estándar mencionado se prepararon diluciones de 1 mg·L<sup>-1</sup> para la identificación individual mediante el sistema TOF/MS y LC-TOF/MS, derivatizando previamente con cloruro de dansilo como se indica más adelante.

Adicionalmente se preparó una solución multiestándar de concentración de 1 mg·L<sup>-1</sup> de cada hormona, la cual fue utilizada durante el desarrollo de las metodologías analíticas.

### **3.4.3. Metodología de determinación de estrógenos mediante LC-MS.**

#### **3.4.3.1. Derivatización e identificación de estrógenos por ESI-TOF/MS.**

Los compuestos E1, E2, EE2, E3, 16-OHE1, 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2, fueron derivatizados con cloruro de dansilo utilizando una metodología de derivatización para la determinación de etinilestradiol en plasma [44], la cual consistió en llevar a sequedad 100 µL de estándar de cada una de las hormonas (1 mg·L<sup>-1</sup>) anteriormente mencionadas, luego se agregó 100 µL de carbonato ácido de sodio 100 mmol·L<sup>-1</sup> ajustado a pH 10,5 con NaOH, se agitó en vortex por 1 min, se agregó 100 µL de cloruro de dansilo 1 mg·mL<sup>-1</sup> en acetona, la solución fue homogenizada nuevamente en vortex por 1 min y llevada a 60°C por 3 min y finalmente la solución fue enfriada a temperatura ambiente. Para obtener un volumen adecuado para caracterizar cada uno de los analitos derivatizados, el extracto fue diluido en metanol e infusionado en el sistema ESI-TOF/MS.

#### **3.4.3.2. Optimización de los parámetros instrumentales ESI-TOF/MS y condiciones de la fuente de iones.**

Para determinar las condiciones óptimas en el espectrómetro de masas para la determinación de los estrógenos derivatizados se infusionó un estándar de E3 derivatizado en una concentración de 1,0 mg·L<sup>-1</sup> en el sistema ESI-TOF/MS. Se evaluaron parámetros instrumentales como el voltaje en la salida del capilar entre 10 y 240 V y en el skimmer entre 10 y 90 V, también se modificó la modalidad de adquisición de los analitos evaluando la modalidad pulso y trampa, en el caso de la modalidad trampa se optimizaron los valores de los parámetros “IG Exit

Low” y “Trap/Pulse Delay” de tal forma de mejorar las señales analíticas en el intervalo de masas deseado. Los parámetros que se mantuvieron constantes fueron el voltaje del detector en 2900 V, voltaje del capilar 6000 V, flujo del gas de secado de  $10 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  a una temperatura de  $300^{\circ}\text{C}$  y presión del gas de nebulización de 80 psi, adquiriendo en un intervalo entre 100 y 1000 unidades  $m/z$ .

#### **3.4.3.3. Diseño Doehlert para optimizar la derivatización (dansilación).**

La metodología de derivatización de Anari et al. (2002) [44], fue optimizada para todos los analitos a través de un diseño Doehlert de 3 factores y 2 centros [74], evaluando el efecto de la concentración de derivatizante entre 0,1 y  $1,0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , el pH de la solución de carbonato ácido de sodio ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) entre 8 y 11 como también el tiempo de reacción entre 5 y 60 minutos, los valores específicos utilizados de cada factor se muestran en las Tablas A2 - A4 del anexo.

#### **3.4.3.4. Estudio de la concentración de la solución de carbonato ácido de sodio.**

Se evaluó el efecto de la concentración de la solución de carbonato ácido de sodio utilizando soluciones en concentraciones de 5, 50 y  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  en la reacción de derivatización. Para este ensayo se utilizaron alícuotas de  $100 \mu\text{L}$  de solución estándar de  $1 \text{ mgL}^{-1}$ , las cuales fueron evaporadas y reconstituidas en  $100 \mu\text{L}$  de solución de 5, 50 y  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbonato ácido de sodio y luego derivatizadas con cloruro de dansilo como se describió anteriormente en la sección 6.4.3.1.

#### **3.4.3.5. Estudio de la temperatura de evaporación.**

Se estudió el efecto de utilizar temperaturas de 20, 40 y  $50^{\circ}\text{C}$  al concentrar mediante evaporación con corriente de  $\text{N}_2$ , para esto se evaporaron 10 mL de multiestándar en concentración de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada hormona a las temperaturas

anteriormente mencionadas, de tal forma de evaporar el disolvente en un menor tiempo sin afectar la respuesta final de los analitos, luego se derivatizó como se indica en la sección 6.4.3.1.

#### **3.4.3.6. Estudio del efecto de antioxidante en la derivatización.**

Para evitar posibles degradaciones de los analitos estudiados durante la derivatización se evaluó utilizar ácido ascórbico en las soluciones estándares de trabajo para que la dansilación sea eficiente sobre los catecol estrógenos, ya que en investigaciones anteriores se obtuvieron buenos resultados utilizando este compuesto como agente antioxidante [36,37]. Se evaluó derivatizar en presencia de ácido ascórbico, adicionándolo en concentraciones entre 0 y 0,2% en 10 mL de multiestándar ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada analito en metanol), luego el disolvente fue evaporado a hasta sequedad y se aplicó la metodología optimizada de derivatización para luego medir su señal analítica. Otro ensayo consistió en adicionar ácido ascórbico en la solución de  $\text{NaHCO}_3$   $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  utilizada para la derivatización, agregándolo en concentraciones entre 0 y 0,32% p/v, luego se compararon las respuestas de cada una de las señales  $m/z$  seleccionadas en el sistema TOF/MS para cada concentración de ácido ascórbico utilizada.

#### **3.4.3.7. Derivatización optimizada de estrógenos con cloruro de dansilo.**

La metodología de derivatización optimizada consistió en llevar a sequedad con corriente de nitrógeno una solución estándar de los estrógenos o extractos, los que fueron reconstituidos con  $100 \mu\text{L}$  de una solución  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NaHCO}_3$  con 0,04% p/v de ácido ascórbico ajustada a pH 9,5, la solución se agitó en vortex por 1 min y posteriormente se agregaron  $100 \mu\text{L}$  de una solución de cloruro de dansilo ( $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  en acetona), se agitó nuevamente en vortex por 1 min y la solución homogenizada se llevó a un bloque calefactor a  $70^\circ\text{C}$  por 5 min, finalmente se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego la solución fue

homogenizada en vortex por 0,5 min para luego ser infundida al sistema ESI-TOF/MS o inyectada en el sistema LC-ESI-TOF/MS.

#### **3.4.3.8. Estudio de diferentes medios de dilución de los analitos derivatizados.**

Con las condiciones de derivatización óptimas se procedió a optimizar el medio de ionización de los analitos derivatizados para posteriormente desarrollar un método cromatográfico para los 9 analitos estudiados, para esto se consideró el uso de las fases móviles comúnmente utilizadas en determinaciones mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. En primera instancia el producto obtenido de la derivatización (200  $\mu\text{L}$ ) fue disuelto con 800  $\mu\text{L}$  de disolventes orgánicos metanol, acetonitrilo, como también en mezclas con ácido acético y ácido fórmico en concentraciones entre 0,003 y 0,3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Luego de seleccionar el medio óptimo, se inyectó por separado una solución estándar de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada uno de los analitos para identificar los tiempos de retención correspondientes.

#### **3.4.3.9. Estudio de programas de elución cromatográfica**

Los medios de dilución para favorecer la ionización fueron probados mediante cromatografía líquida para seleccionar aquella que mostrara mejores resultados en cuanto a sensibilidad, separación y reproducibilidad. Se utilizó un multiestándar de concentración 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada compuesto y fue inyectado al sistema LC-TOF/MS con cada composición de fases móviles. Se realizó un programa de elución en gradiente utilizando una fase orgánica (acetonitrilo o metanol) y una fase acuosa (ácido fórmico o agua) de tal modo de obtener la mejor señal analítica y separación cromatográfica. Las fases móviles utilizadas fueron mezclas de agua-acetonitrilo, ácido fórmico 0,3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /metanol, ácido fórmico 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /acetonitrilo y ácido fórmico 0,3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /acetonitrilo.

#### **3.4.3.10. Condiciones cromatográficas para la determinación de estrógenos mediante LC-ESI-TOF/MS.**

Se utilizó una columna Brownlee SPP-C18 (2,1 mm × 75 mm, 2,7 μm) manteniéndola a una temperatura constante de 25°C, un volumen de inyección de 10 μL y un flujo de 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, utilizando como fase móvil los disolventes ácido fórmico 0,3 mol·L<sup>-1</sup> (pH 2,1) (A) y acetonitrilo (B), utilizando el siguiente programa de elución en gradiente: 0–0,9 min, 50% B; 0.9–3,9 min, 70% B; 3,9–10 min, 100% B; volviendo finalmente a las condiciones iniciales en 2 min.

#### **3.4.3.11. Error experimental en el sistema LC-ESI-TOF/MS.**

Para determinar los compuestos en estudio de forma confiable, se monitorearon las señales *m/z* de cada compuesto con un delta de error máximo de 20 ppm, calculado como se muestra en la Ecuación 1.

$$\text{Error (ppm)} = \frac{(m/z \text{ mono isotópica experimental} - m/z \text{ monoisotópica teórica})}{m/z \text{ mono isotópica teórica}}$$

Ecuación 1.

#### **3.4.3.12. Curva de calibración y linealidad.**

A partir de un multiestándar de todas las hormonas de concentración 100 μg·L<sup>-1</sup> y de un estándar surrogate (20, 21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub> EE2 de concentración 100 μg·L<sup>-1</sup> se agregaron volúmenes de 6 - 12 - 25 -50 - 100 y 200 μL de cada uno en viales de 2 mL, se evaporaron a sequedad y se derivatizaron obteniendo los estándares en concentraciones de 3 - 6 - 12,5 - 25 - 50 y 100 μg·L<sup>-1</sup>. Posteriormente se inyectaron en el sistema LC-ESI-TOF/MS para obtener el área de cada analito correspondiente a cada nivel de concentración, con los valores obtenidos se graficó la respuesta vs la concentración realizando un ajuste lineal del tipo  $y = mx + b$ , donde *m* corresponde a la pendiente de la curva y *b* al intercepto.

#### **3.4.3.13. Precisión de la metodología de determinación por LC-ESI-TOF/MS.**

Para evaluar la reproducibilidad de la metodología de derivatización, 6 estándares independientes de concentración de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  fueron derivatizados con la metodología optimizada señalada en el punto 6.4.3.1. Se evaluaron las áreas obtenidas para cada estándar y los tiempos de retención a través de la precisión expresada como desviación estándar relativa (RSD).

#### **3.4.3.14. Límites de detección y cuantificación instrumentales.**

Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación instrumentales, se realizaron curvas de calibración en duplicado a partir de un multiestándar de los estrógenos, obteniendo concentraciones entre  $0,25$  y  $10,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los límites de detección y cuantificación fueron calculados interpolando en la curva de calibración los valores obtenidos de la multiplicación de la raíz cuadrada del error cuadrado medio de la regresión lineal para cada analito por 3,3 y 10, respectivamente.

#### **3.4.4. Extracción de estrógenos desde muestras acuosas mediante RDSE.**

El método de extracción consistió en tomar 25 mL de muestra acuosa sobre un vial ámbar de 30 mL a la cual se le agregó ácido ascórbico quedando en una concentración de 0,1%, luego se introdujo el disco rotatorio con la fase sorbente e-DVB previamente acondicionada (en forma secuencial con 5 mL de acetona, 5 mL de metanol y 5 mL agua agitando por 5 min en cada disolvente a 2000 rpm) luego se agitó por 90 min a 3000 rpm, a continuación el disco rotatorio fue retirado de la muestra e introducido en otro vial con 5 mL de metanol para desorber los analitos agitando a 2000 rpm por 15 min, el eluato fue traspasado a un vial de 12 mL para llevar a sequedad mediante un concentrador con corriente

de nitrógeno y temperatura, el residuo fue derivatizado como se expuso en la sección 6.4.3.1 y luego inyectado en el sistema LC-TOF/MS.

#### **3.4.4.1. Optimización.**

Durante la optimización de la extracción de estrógenos mediante RDSE se utilizó un volumen constante de 25 mL de solución acuosa enriquecida con el multiestándar de estrógenos a una concentración de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , las soluciones fueron contenidas en viales ámbar de 30 mL, para posteriormente introducir el disco rotatorio con la fase sorbente utilizada para la extracción modificando las variables físicas y químicas que influyen en la extracción.

##### **a) Fases sorbentes.**

Para optimizar la extracción de estrógenos desde muestras acuosas utilizando la técnica RDSE, se inmovilizaron distintas fases sorbentes en un disco rotatorio con cavidad para las fases sorbentes en polvo, o en un disco plano aquellas que se obtuvieron en forma laminar. Se pesaron 50 mg de las fases sorbentes en polvo y se distribuyeron homogéneamente en la cavidad del disco, luego se colocó una sección circular de 12 mm de diámetro de fibra de vidrio sobre el disco con la fase sorbente y para soportar el sistema se utilizó el anillo de teflón como se mostró anteriormente en la Figura 6c. Las fases sorbentes fueron acondicionadas por inmersión y agitación del disco rotatorio a 2000 rpm por 5 min, en forma secuencial en 5 mL de acetato de etilo, 5 mL de metanol y 5 mL de agua desionizada, o con otros disolventes si las especificaciones del fabricante de la fase sorbente así lo recomendaba. Cada fase sorbente fue evaluada por agitación del disco rotatorio a 3000 rpm por un tiempo de 60 min, posteriormente el disco fue extraído desde la solución y sumergido en 5 mL de metanol, luego se agitó a 2000 rpm por 15 min para favorecer la desorción de los compuestos desde la fase sorbente. La solución obtenida fue evaporada a sequedad con una corriente de

nitrógeno, luego los analitos fueron derivatizados con cloruro de dansilo para ser medidos por LC-ESI-TOF/MS. En la Figura 12 se esquematiza el proceso de extracción optimizado. Inicialmente se realizó un estudio de fases sorbentes utilizando, divinilbenceno en soporte polimérico de poliestireno/divinilbenceno polvo (e-DVB polvo), poliestireno/divinilbenceno en lámina (e-DVB plano), C18 en soporte polimérico de poliestireno/divinilbenceno, poliestireno/divinilbenceno con grupos funcionales amina cuaternaria (Anión-SR) en lámina, amina cuaternaria con octil (CUQAX), una amina cuaternaria en soporte polimérico de poliestireno/divinilbenceno (QAX) estas últimas dos fases probadas en pH neutro y básico (pH 12) para favorecer la sorción de los analitos en su forma iónica. Posteriormente se evaluaron diferentes polímeros sintetizados en distintas proporciones monómero/entrecruzador, de los cuales los polímeros 1, 2 y 3 están compuestos por un monómero básico (vinilpirrolidona) en diferentes proporciones, 4, 5 y 6 compuestos por un monómero básico (1-vinilimidazol) y los polímeros 7, 8 y 9 compuestos por un monómero neutro (acrilamida) (ver Tabla A1).

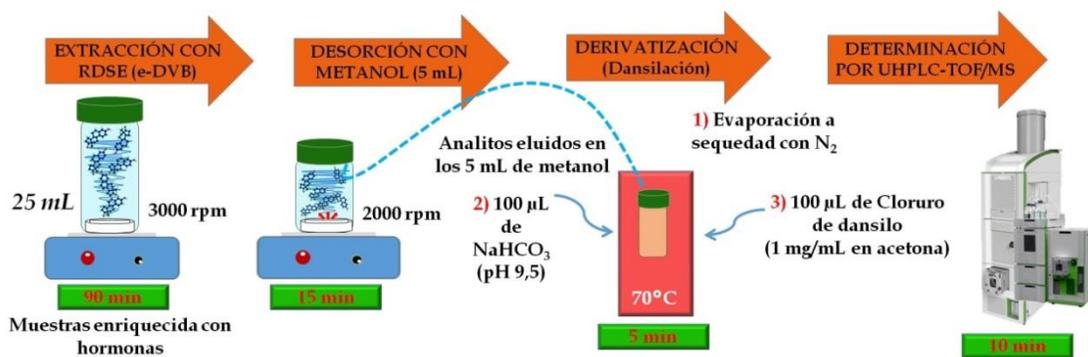


Figura 12. Representación de metodología de extracción y determinación de estrógenos en muestras acuosas utilizando RDSE.

### b) Fuerza iónica del medio de extracción.

Se evaluó la utilización de NaCl en concentraciones desde 0 al 10% p/v durante la extracción para aumentar la fuerza iónica del medio y como consecuencia

disminuir la solubilidad de los analitos en la solución, de esta forma desplazar el equilibrio de los analitos desde la fase acuosa a la fase sorbente por efecto “salting out”.

**c) Utilización de un agente antioxidante en la solución de extracción.**

Se probó adicionar ácido ascórbico en la solución de extracción de estrógenos para evitar la degradación de estrógenos durante la extracción, se preparó una solución 0,1% p/v de ácido ascórbico en agua desionizada, quedando a un pH de 3,4, esta solución de 25 mL fue ajustada a pH 6 con NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> y luego se realizó la extracción con RDSE por un tiempo de 60 min.

**d) Disolvente de desorción.**

Para eluir los analitos desde la fase sorbente se probó realizar la desorción con metanol y con acetona utilizando 5 mL en cada caso, agitando a 2000 rpm por un tiempo de 15 min, luego el extracto fue evaporado a sequedad, derivatizado e inyectado en el sistema LC-TOF/MS para evaluar la intensidad de las señales analíticas de cada estrógenos en ambos disolventes utilizados en la desorción.

**e) pH de la solución de extracción.**

Debido a que los analitos pueden interactuar de distinta forma con la fase sorbente, dependiendo del pH de la solución, se realizó un estudio de pH entre 2 y 12, modificando la solución de extracción con HCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup> para pH ácido y con NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> para pH básico, la fase sorbente utilizada en este estudio fue aquella que mostró mayores respuestas en la evaluación de fases sorbentes, realizando la extracción por un tiempo de 60 min.

#### **f) Perfil de extracción.**

Para determinar el tiempo óptimo de extracción se probó extraer los compuestos desde 25 mL de muestra acuosa en tiempos entre 15 y 150 min utilizando las condiciones óptimas de extracción, obtenidas de los estudios anteriores.

#### **3.4.4.2. Validación del método analítico en muestras acuosas.**

Una vez seleccionada la condición óptima de cada variable estudiada, se procedió a validar el método analítico desarrollado, a través de las figuras de mérito linealidad, efecto matriz, exactitud, precisión, límites de detección y cuantificación del método. En esta sección se utilizaron muestras de agua potable fortificada como también muestras de efluentes de aguas residuales de la Región Metropolitana de Santiago enriquecidas con los estrógenos, de tal forma de utilizar matrices reales y de alta complejidad. Las muestras utilizadas para la validación fueron analizadas previamente, no detectándose la presencia de estrógenos.

##### **a) Linealidad.**

Para evaluar si el método desarrollado presentó una respuesta lineal para los estrógenos estudiados, se aplicó la metodología de extracción en muestras fortificadas de agua desionizada y de efluente de PTAR en concentraciones entre 0,005 y 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , luego se graficó la respuesta instrumental obtenida vs la concentración de fortificación, obteniendo una calibración que se ajustó a una ecuación lineal de la forma  $y = mx + b$ , la linealidad de la metodología fue expresada mediante el coeficiente de determinación  $R^2$ .

##### **b) Efecto Matriz.**

El efecto matriz fue evaluado mediante enriquecimiento de las muestras de efluente de aguas residuales en concentraciones entre 0,005 y 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , luego se aplicó la metodología de extracción RDSE por un tiempo de 90 min sobre 25 mL

de muestra a pH 6, conteniendo 0,1%, p/v de ácido ascórbico. De la misma forma se realizaron extracciones en agua des ionizada en el mismo intervalo de concentraciones, a modo de realizar una comparación de las pendientes obtenidas de la curva de calibración extraída en ambos tipos de muestra.

La supresión o mejoramiento de la señal por efecto matriz fue calculada a través de la Ecuación 2 que se muestra a continuación:

$$\textit{Efecto matriz} (\%) = 100x \left( \frac{\textit{Pendiente en efluente}}{\textit{Pendiente en agua desionizada}} \right) - 100$$

Ecuación 2

Donde valores positivos indican un efecto matriz de mejoramiento de la señal y valores negativos corresponden a efecto matriz de supresión en el porcentaje calculado.

### **c) Exactitud y precisión de la metodología RDSE para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas.**

Para evaluar la exactitud y precisión de la metodología, se aplicó el método de extracción en 5 alícuotas de la misma muestra enriquecida en concentraciones de 0,040  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada hormona en agua potable y en efluente de PTAR, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo. La exactitud y precisión fueron expresadas como recuperación (%) y desviación estándar relativa (RSD), respectivamente. Calculadas según las Ecuaciones 3 y 4.

$$\textit{Recuperación}(\%) = A_s/A \times 100$$

Ecuación 3.

Donde,  $A_s$  es el área determinada al extraer la muestra fortificada con estrógenos y  $A$  es el área del estándar de referencia obtenida desde el análisis de un extracto blanco fortificado a una concentración final de 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  correspondiente a la

concentración con que se fortificó considerando el factor de concentración de la metodología ( $0,040 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  x factor de concentración de 125 =  $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). También se evaluó la recuperación de los 9 analitos utilizando una curva de calibración aplicando el método de extracción en alícuotas de la muestra enriquecida en concentraciones entre  $0,005$  y  $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , a modo de corregir el efecto matriz de cada analito.

$$RSD (\%) = \left( \frac{S}{\bar{X}} \right) \times 100$$

Ecuación 4.

Donde  $S$ = desviación estándar de las concentraciones obtenidas en la serie de mediciones de las muestras,  $\bar{X}$ = concentración media de la series de muestras medidas.

#### **d) Límites de detección y cuantificación del método.**

Para calcular los límites de detección y cuantificación del método en efluentes de plantas de tratamiento se realizó una calibración en la matriz mediante la aplicación de la metodología de extracción a muestras fortificadas entre  $0,005$  y  $0,025 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Con las respuestas (áreas) obtenidas a cada nivel de concentración se realizó una regresión lineal para cada analito, obteniendo el error cuadrado medio de la regresión ( $\sigma$ ), el que fue multiplicado por 3,3 y 10 para obtener las señales  $Y_{LD}$  e  $Y_{LC}$  correspondientes a la señal del límite de detección y de cuantificación, respectivamente. Los valores de señal analítica  $Y_{LD}$  e  $Y_{LC}$  fueron interpolados en la curva de calibración de cada analito para la obtención de las concentraciones correspondientes a los límites de detección y cuantificación del método como se muestra en las ecuaciones 5 y 6.

$$LD = 3,3 \times \sigma/m$$

Ecuación 5.

Donde,  $\sigma$  es la raíz del error cuadrado medio de la regresión lineal de la calibración en matriz y  $m$  es la pendiente.

$$LC = 10 \times \sigma/m$$

Ecuación 6.

#### **3.4.4.3. Análisis de muestras de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales utilizando RDSE.**

Las muestras de efluentes de plantas de tratamiento de agua residual fueron tomadas en la ciudad de Santiago, específicamente en las plantas de La Farfana y El Trebal, ubicadas en la comuna de Maipú, las muestras fueron recolectadas durante 24 horas (muestra compuesta), filtradas, almacenadas a 4°C y analizadas al día siguiente de su recolección. Para poder calcular la concentración real de los analitos en las muestras, se analizó la muestras directamente aplicando la metodología de extracción como también se tomaron alícuotas de las muestras, las cuales fueron fortificadas a 2 concentraciones diferentes, adicionalmente se realizó una curva en otro efluente (el cual no contenía los estrógenos estudiados) para cuantificar el contenido de estrógenos en la muestras, a modo de control 2 alícuotas de este último efluente fueron fortificadas con todas las hormonas a concentraciones de 0,01 y 0,05  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a modo de controlar la recuperación para cada analito.

#### **3.4.5. Extracción de estrógenos desde muestras de agua potable y efluente de agua residual mediante SPE.**

Para comparar las propiedades analíticas obtenidas con RDSE en muestras de efluentes de PTAR se utilizó un método de extracción de estrógenos desde aguas residuales utilizando SPE con C18 como fase sorbente [75]. Se utilizó una muestra de efluente obtenida desde la PTAR Mapocho-Trebal, ubicada en la

comuna de Santiago y además se evaluó el método en muestras de agua potable obtenida desde la comuna de Independencia. La fase sólida (C18) fue acondicionada con 4 mL de metanol, seguido de 10 mL de agua. Luego, a una velocidad de aproximadamente  $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , la muestra (50 mL) fue pasada a través de la columna y posteriormente secada con vacío por 20 min. Luego con 3 mL de metanol se realizó la desorción de los analitos desde la columna de extracción. El extracto fue evaporado a sequedad con corriente de nitrógeno y luego el residuo fue derivatizado, obteniendo un volumen final de 200  $\mu\text{L}$ , aplicando un factor de concentración de 250 veces; finalmente, la solución derivatizada fue inyectada en el sistema LC-ESI-TOF/MS para su determinación. Para la cuantificación de los estrógenos se realizó una calibración en matriz, para lo cual se tomaron alícuotas de 50 mL de cada matriz a las que se le agregaron los 9 estrógenos a seis niveles de concentración entre 0,01 y 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Adicionalmente se agregó el estándar surrogate (20,21)- $^{13}\text{C}_2\text{EE}_2$  a una concentración de 0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , para corregir pérdidas durante la extracción. El efecto matriz fue estimado por comparación de las pendientes de la curva de calibración del estándar disuelto en disolvente y la curva de calibración del estándar disuelta en matriz para cada analito, como se mostró anteriormente a través de la Ecuación 2. Por otra parte, la exactitud y la precisión de la metodología fueron evaluadas en agua potable y efluente de PTAR a través de la recuperación y RSD, respectivamente, calculados a partir de la aplicación del método a muestras blanco enriquecidas con todos los analitos ( $n=6$ ) a 3 niveles de concentración, 0,1 - 1,0 and 4,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **3.4.6. Extracción de estrógenos desde muestras de leche.**

Para la optimización de la metodología fue utilizada leche entera de bovino, las que fueron adquiridas desde mercados en la ciudad de Santa María (Brasil), la leche utilizada para el desarrollo del método fue dividida en fracciones de 250 mL y para su conservación fueron congeladas a una temperatura  $\leq$  a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta el análisis.

#### **3.4.6.1. Metodologías QuEChERS evaluadas para la extracción de estrógenos.**

Inicialmente se evaluaron tres metodologías de extracción con QuEChERS, basadas en las metodologías QuEChERS original, QuEChERS acetato y QuEChERS citrato. En estas metodologías se utilizó una proporción reducida de disolvente con respecto a la muestra (2 partes de muestra por 1 disolvente) en comparación con las proporciones originales, donde la proporción entre la muestra y el disolvente de extracción es (1:1). Además se redujo a 5 mL el volumen de muestra en cada caso. La muestra de leche entera o integral fue enriquecida a una concentración de  $30\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  con los compuestos E1, E2, E3, EE2, 2-OHE1, 4-OHE1, 16-OHE1, 2-OHE2 and 4-OHE2, luego homogenizada en vortex por 1 min. La extracción consistió en agregar 2,5 mL del disolvente, compuesto por acetonitrilo para la metodología basada en QuEChERS original como para la QuEChERS citrato, y 2,5 mL de acetonitrilo con 1% v/v de ácido acético para la metodología basada en QuEChERS acetato, luego se agitó vigorosamente en vortex por 1 min de forma similar para las 3 metodologías. A la mezcla resultante se adicionaron las sales correspondientes a cada metodología QuEChERS (2,0 g de  $\text{MgSO}_4$  y 0,5 g de  $\text{NaCl}$ ), (2,0 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,5 g de  $\text{NaCl}$ , 0,5 g de citrato de sodio di-hidratado y 0,25 g de citrato de sodio sesqui hidratado) y (2,0 g of  $\text{MgSO}_4$  y 0,5 g de  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), para QuEChERS “original”, “citrato” y “acetato”, respectivamente. Para completar la etapa de

partición y separación de fases, se agitó nuevamente por 1 min y a continuación se centrifugó a 3400 rpm por 8 min a una temperatura de 4°C. Para el clean-up se utilizó la técnica *d*-SPE, para lo cual se tomó 1 mL de cada sobrenadante en tubos eppendorf y se adicionaron 150 mg de MgSO<sub>4</sub> y 25 mg de PSA para el extracto proveniente de la metodología “original”, 150 mg de MgSO<sub>4</sub> y 25 mg de PSA para el extracto proveniente de la metodología “citrato” y 150 mg de MgSO<sub>4</sub> y 50 mg de PSA para el extracto proveniente de la metodología “acetato”. Cada tubo se agitó en vortex por 1 min y se centrifugó a 10.000 rpm por 3 min. Para la determinación se tomaron 200 µL del sobrenadante y se llevaron a sequedad con corriente de nitrógeno, luego se derivatizó con cloruro de dansilo y se inyectó al sistema LC-MS/MS. La metodología QuEChERS que mostró mejores recuperaciones y respuestas analíticas para los estrógenos estudiados fue seleccionada para las optimizaciones posteriores.

#### **3.4.6.2. Optimización de la metodología de extracción QuEChERS citrato.**

La metodología de extracción con QuEChERS citrato fue optimizada con la finalidad de obtener la mayor sensibilidad en la determinación de los estrógenos provenientes de muestras de leche. Se evaluaron diferentes formas de limpieza y concentración del extracto obtenido desde la extracción QuEChERS utilizando las técnicas *d*-SPE, SPE y RDSE. Se evaluó aumentar el volumen de muestra a 10 mL y en forma proporcional la cantidad de acetonitrilo utilizada para la extracción (5 mL), de tal forma de obtener una mayor cantidad de extracto que permita aumentar el factor de concentración de la metodología de extracción. Del extracto obtenido de aproximadamente 4 mL, se tomaron alícuotas de 1 mL para ser tratadas por las técnicas *d*-SPE, SPE y RDSE para comparar y seleccionar aquella que entregue extractos limpios y que permita concentra los

analitos las veces necesarias para poder determinar los estrógenos a concentraciones bajo los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

**a) Tratamiento del extracto por d-SPE.**

El extracto obtenido desde la extracción con QuEChERS citrato fue tratado mediante *d*-SPE, que corresponde a la técnica de limpieza comúnmente utilizada en las metodologías QuEChERS, esta consistió en tomar 1 mL del extracto y traspararlo a un tubo eppendorf de 2 mL que con 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  anhidro y 50 mg de PSA, luego el tubo se agitó en vortex por 1 min y se centrifugó a 10.000 rpm por 3 min, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y se llevaron a sequedad con corriente de nitrógeno para ser derivatizados e inyectados al sistema LC-MS/MS.

**b) Tratamiento del extracto por SPE.**

Para cargar el extracto en la columna SPE (HLB), se tomó 1 mL del extracto en acetonitrilo y se diluyó a 25 mL con agua des ionizada, luego esta solución fue cargada en la columna SPE a un flujo de  $3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , la columna fue lavada con 1 mL de agua y dejada con vacío durante 10 min, luego se desorbieron los analitos con 1 mL de acetonitrilo, del cual 200  $\mu\text{L}$  fueron evaporados a sequedad con corriente de nitrógeno y derivatizados con cloruro de dansilo para su posterior determinación por LC-MS/MS.

**c) Tratamiento del extracto por RDSE.**

Para tratar el extracto mediante RDSE se realizó el mismo procedimiento de dilución que para SPE obteniendo 25 mL de solución, en la cual fue introducido un disco rotatorio con la fase sorbente HLB para extraer los analitos desde la solución durante 60 min agitando a 1600 rpm, luego se realizó la desorción sumergiendo el disco rotatorio en 2 mL de acetonitrilo, de los cuales se tomaron 400  $\mu\text{L}$  para ser evaporados a sequedad y derivatizados con cloruro de dansilo para su posterior determinación por LC-MS/MS.

#### **d) Volumen de extracto para limpieza utilizando QuEChERS-citrato.**

Para obtener señales analíticas más intensas se evaluó utilizar alícuotas de 1, 2 y 4 mL de extracto para la técnica SPE anteriormente mencionada, para d-SPE no fue posible utilizar volúmenes mayores a 1 mL de extracto debido a que no disponía de materiales y equipamiento para trabajar con volúmenes mayores, limitados principalmente por la etapa de centrifugación que conlleva esta etapa.

#### **e) Disolvente de desorción utilizado en limpieza del extracto con SPE.**

Con la finalidad de obtener un extracto con menos interferentes apolares que podrían co-eluir junto a los compuestos de interés, se evaluó eluir desde el cartucho SPE utilizando 1 mL de acetonitrilo puro y soluciones de acetonitrilo en agua al 80% y 60% (v/v).

#### **3.4.6.3. Metodología QuEChERS citrato-d-SPE.**

La metodología consistió en agregar 5 mL de acetonitrilo a 10 mL de muestra de leche contenida en un tubo centrífuga de 50 mL, se agitó en vórtex por 1 min y luego se agregaron 2,0 g de  $MgSO_4$ , 0,5 g de NaCl, 0,5 g de citrato de sodio dihidratado y 0,25 g de citrato de sodio sesqui-hidratado y se agitó vigorosamente por 1 min, inmediatamente se centrifugó a 3400 rpm por 8 min, luego 2 mL del sobrenadante fueron diluidos a 25 mL con agua y cargado en un cartucho SPE (HLB) a un flujo de  $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , finalmente los analitos fueron desorbidos con 1 mL de acetonitrilo al 80% (v/v). El extracto fue evaporado a sequedad con corriente de nitrógeno, derivatizado e inyectado en el sistema LC-MS.

#### **3.4.6.4. Validación del método de extracción QuEChERS-SPE.**

Se validó la metodología QuEChERS-SPE debido a que fue la que presentó mejores respuestas en cuanto a recuperación y señal analítica. A continuación se muestra los parámetros evaluados en la validación.

#### **a) Linealidad.**

Se evaluó la linealidad de la metodología de extracción y determinación de estrógenos utilizando QuEChERS-SPE-LC-MS/MS, a través de la aplicación de la metodología optimizada a muestras de leche enriquecidas a 5 niveles de concentración entre 0,1 y 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### **b) Exactitud y Precisión.**

La exactitud y la precisión del método QuEChERS-SPE-LC-MS/MS fueron evaluadas a través de la recuperación y desviación estándar relativa (RSD) obtenida al aplicar la metodología optimizada a alícuotas (n=6) de una muestra blanco enriquecida a 0,5 y 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### **c) Límites de detección y cuantificación.**

Los límites de detección del método fueron obtenidos aplicando la metodología de extracción (n=6) a la mínima concentración en que los analitos fueron detectables. La desviación estándar obtenida del set de repeticiones fue multiplicada por 3 y 10 para obtener la señal analítica correspondiente al límite de detección ( $Y_{LD}$ ) y cuantificación del método ( $Y_{LC}$ ), respectivamente. Luego los valores fueron extrapolados en la curva de calibración para la obtención de las concentraciones correspondientes a los límites de detección y cuantificación, respectivamente.

#### **3.4.6.5. Análisis de muestras reales de leche de bovino.**

La metodología desarrollada fue aplicada sobre 2 muestras de leche de bovino, de las cuales una muestra fue extraída de un ejemplar con 7 meses de gestación y otra muestra desde otro ejemplar lactante no gestante, cada una de las muestras fueron analizadas por triplicado. Para cuantificar el contenido de estrógenos libres en ambas muestras, se realizó una curva de calibración en matriz y adicionalmente se tomaron alícuotas de cada muestra, las cuales fueron

enriquecidas con los estrógenos quedando en la muestra concentraciones de 0,1-0,2-0,4 y 0,75  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### **3.4.6.6. Hidrólisis enzimática a muestras de leche.**

Para evaluar la cantidad total de estrógenos en muestras de leche fue necesario hidrolizar el contenido de estrógenos que podría encontrarse presente en las formas conjugadas con grupos glucurónidos o sulfatos. La hidrólisis enzimática consistió en tomar 10 mL de muestra de leche en un tubo de centrífuga de 50 mL, luego se enriqueció con estándar surrogate (20,21)- $^{13}\text{C}_2$ -17 $\alpha$ -etinilestradiol a una concentración de 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y se homogenizó en vortex por 30 segundos, luego se adicionó 1 mL de una solución de acetato de sodio 0,1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  pH 5,2 y 20  $\mu\text{L}$  de solución de enzima  $\beta$ -glucuronidasa (100.000 unidades/mL), la solución resultante fue homogenizada en vórtex y encubada a 37°C por 24 horas para completar la hidrólisis enzimática, posteriormente la muestra fue homogenizada y tratada según el procedimiento de extracción anteriormente descrito en el punto 6.4.6.3. Para evaluar el contenido de estrógenos libres, se realizó el mismo procedimiento de extracción a las muestras pero sin la etapa de hidrólisis enzimática. Se analizaron por esta metodología 3 muestras de leche entera de diferentes marcas (1, 2 y 3) comercializadas en locales comerciales de Santiago de Chile.

#### **3.4.7. Metodología de extracción de estrógenos desde muestras de orina.**

Para la extracción de estrógenos desde orina se utilizó RDSE con e-DVB como fase sorbente, al igual que para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas, debido a la similitud entre ambas matrices, donde el agua es el componente principal, produciendo que la muestra posea características polares y que los analitos se comporten de la misma forma en orina como en agua, en cuanto a la solubilidad de los estrógenos en la muestra como también en cuanto a

la interacción de estos con la fase sorbente de e-DVB. En estudios previos a este trabajo, se ha determinado que al utilizar la técnica RDSE, es adecuado utilizar altas velocidades de rotación para favorecer la transferencia de masa desde la muestra hacia la fase sorbente inmovilizada en el disco rotatorio. Por lo anterior, es que se utilizó una velocidad de rotación constante de 3000 rpm para la extracción, ya que esta corresponde a la máxima velocidad de rotación entregada por los agitadores disponibles. Por otra parte, el pH óptimo de extracción como las condiciones de desorción, fueron tomadas en base a los resultados obtenidos en muestras acuosas, donde un pH 6 durante la extracción fue la condición óptima, mientras que en la desorción se utilizó la rotación del disco rotatorio a 2000 rpm en 5 mL de metanol por 5 min.

#### **3.4.7.1. Colección de muestras.**

Para desarrollar y optimizar una metodología de extracción de estrógenos desde orina, se utilizaron muestras (blanco analítico) provenientes de un niño varón pre púber de 5 años de edad, puesto que en niños con estas características es donde se encuentran los mínimos niveles de estrógenos. Todas las muestras fueron donadas en forma voluntaria y con el consentimiento de los padres. Las muestras analizadas para la determinación de estrógenos fueron solicitadas directamente a personas que cumplieran con las características necesarias para este estudio, en las que se incluyeron muestras de mujer pre menopaúsica que no consume estrógenos de 29 años de edad, mujer pre menopaúsicas que consume anticonceptivos en base a EE2, mujeres embarazadas con 27 y 28 semanas de gestación, una mujer entrante a la menopausia de 52 años y un hombre de 29 años de edad. Todas las muestras fueron adquiridas con el consentimiento de cada donador, los cuales gozaban de buena salud al momento de donar las muestras. El pH de las muestras recibidas se muestra en la Tabla A5 del anexo.

### **3.4.7.2. Optimización de la metodología de extracción.**

La metodología de extracción fue optimizada evaluando el volumen de muestra entre 1 y 10 mL, debido a la complejidad de la matriz en cuanto a la presencia de interferentes se evaluaron diferentes etapas de limpieza, simultánea a la extracción utilizando sorbentes como C18, PSA, CA, y florisil, como también post extracción mediante lavados y desorción selectiva. Con las mejores condiciones de extracción y de limpieza se evaluó el tiempo de extracción entre 15 y 120 min a modo de seleccionar al tiempo óptimo de extracción.

#### **a) Volumen de muestra.**

La técnica RDSE es una técnica que ha sido utilizada directamente en muestras de orina para la extracción de antiinflamatorios [65] utilizando LC-UV, sin embargo en esta metodología que conlleva una etapa de derivatización de los estrógenos previo a la determinación por LC-TOF/MS, hace necesario reducir la cantidad de interferentes co-extraídos, puesto que pueden interferir en la reacción de derivatización. Para evaluar el volumen de muestra se utilizó orina enriquecida con los 9 estrógenos a una concentración de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , de la cual se tomaron alícuotas de 1, 2, 5, 7,5 y 10 mL, las cuales fueron diluidas a 25 mL con ácido ascórbico 0,05% p/v a modo de asegurar que la fase sorbente quede sumergida totalmente en la muestra se logre la transferencia de masa hacia la fase sorbente.

#### **b) Clean up a muestras de orina.**

Debido a que la orina es una muestra compleja, se evaluaron distintas formas de obtener un extracto adecuado para ser derivatizado e inyectado al sistema LC-TOF/MS. Las metodologías de clean up probadas consistieron en hacer una limpieza a la fase sorbente post extracción, como también en forma simultánea a la extracción. La primera alternativa de clean up consistió en realizar un lavado a

la fase sorbente e-DVB inmovilizada en el disco rotatorio una vez concluida la extracción mediante la agitación del disco a 2000 rpm por 5 min en 5 mL de mezclas metanol/agua al 20 y al 40% v/v, evaluando la concentración adecuada de metanol que permita eluir selectivamente los interferentes y a continuación transferir el disco rotatorio a otro vial con 100% metanol para realizar la desorción de los analitos y posterior determinación. Por otra parte, la alternativa de clean up simultáneo a la extracción, consistió en agregar distintos sorbentes en forma dispersiva (*d*-SPE) a la muestra durante la extracción con disco rotatorio con e-DVB. Los sorbentes evaluados fueron: C18, carbón activado (CA), amina primaria secundaria (PSA), mezclas PSA/C18 y florisil, utilizando 100 y 200 mg de C18, 100 y 200 mg de CA, 100 y 200 mg de PSA, una mezcla de 100 mg de PSA con 100 mg de C18 y 200 mg de florisil. Con el sorbente que mostró mejores resultados, se evaluó la cantidad óptima adicionándolo a la solución de extracción en cantidades de 0, 100, 200 y 300 mg. Cada parámetro fue evaluado respecto a la señal obtenida para la serie de analitos luego de la extracción, desorción, derivatización y determinación en LC-TOF/MS.

- **Evaluación de la remoción de estrógenos en clean up con PSA.**

Para evaluar la posibilidad de pérdidas de los analitos durante el clean up, se realizó una comparación de las respuestas obtenidas luego de aplicar la metodología de extracción sobre alícuotas de 20 mL de solución de ácido ascórbico 0,05% p/v con  $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada estrógeno con la fase sorbente e-DVB sin PSA y en paralelo las mismas condiciones de extracción pero con 300 mg de PSA, las muestras fueron agitadas a 3000 rpm por 60 min, luego se realizó la desorción con 5 mL de metanol, se evaporó a sequedad el extracto y se derivatizó con cloruro de dansilo para su determinación por LC-TOF/MS.

### **c) Perfil de extracción.**

Luego de optimizar las variables físicas y químicas que influyen en el proceso de extracción se procedió a estudiar el tiempo óptimo de extracción con RDSE, realizando un perfil de extracción entre 15 y 120 min, para este procedimiento se utilizaron las mejores condiciones de extracción obtenidas en las optimizaciones anteriores.

### **3.4.8. Metodología de extracción y limpieza utilizando RDSE.**

La metodología de extracción de estrógenos desde orina consistió en tomar 20 mL de solución acuosa de ácido ascórbico 0,05%, p/v en un vial de 30 mL, a la cual se introdujo el disco rotatorio con la fase sorbente e-DVB previamente acondicionada en forma secuencial con acetona, metanol y agua, sumergiendo el dispositivo de extracción en 5 mL de cada disolvente por un periodo de 5 min y agitando a 2000 rpm en cada uno de ellos. Luego se agregaron 300 mg de PSA a la solución e inmediatamente se agregaron 2 mL de muestra de orina para comenzar la extracción a través de la rotación del disco a una velocidad de 3000 rpm por 60 min, luego el disco fue retirado de la muestra y lavado sumergiéndolo brevemente en agua desionizada para remover las partículas restantes de PSA, el disco fue secado con papel absorbente evitando el contacto con la fase sorbente y a continuación se realizó la desorción de los analitos introduciendo el disco en otro vial con 5 mL de metanol, en el cual se agitó a 2000 rpm por un tiempo de 15 min, el extracto fue traspasado a un vial ámbar de 12 mL para evaporar el metanol hasta sequedad mediante corriente de nitrógeno, el residuo fue derivatizado, aplicando la metodología de derivatización descrita en el punto 6.4.3.1, e inyectado en el sistema LC-TOF/MS. La metodología utilizada conlleva un factor de concentración de 10.

### **3.4.9. Validación del método de extracción de estrógenos desde orina.**

#### **3.4.9.1. Linealidad.**

Para evaluar si el método desarrollado responde en forma lineal en cuanto a la concentración de estrógenos en la muestra de orina, se realizó un calibrado en matriz mediante la aplicación del método de extracción sobre alícuotas de orina enriquecida a concentraciones entre 0,5 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  con todos los analitos. Se agregó el estándar (20,21)- $^{13}\text{C}_2$ -17 $\alpha$ -etinilestradiol para ser utilizado como estándar interno a modo de corregir pérdidas durante la etapa de preparación muestras, considerándose los puntos de calibración en matriz como las muestras analizadas.

#### **3.4.9.2. Efecto matriz.**

Para evaluar el efecto matriz de la metodología se realizaron curvas de calibración en disolvente y en matriz. Para obtener la curva de calibración en matriz, se repitió 5 veces el proceso de extracción, tomando 20 mL de solución de ácido ascórbico 0,05% p/v a la cual se le agregaron 300 mg de PSA y 2 mL de muestra de orina sin enriquecer, luego se realizó la extracción por 60 min y se eluyó con 5 mL de metanol, obteniéndose extractos con todos los componentes aportados por la matriz, los cuales posteriormente fueron enriquecidos para obtener concentraciones de cada estrógenos a 0 - 5 - 10 - 20 y 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en el extracto final. La curva de calibración en disolvente fue preparada a las mismas concentraciones y luego ambas curvas se inyectaron en el sistema LC-TOF/MS para evaluar y comparar las pendientes obtenidas en cada condición. El efecto matriz (EM) fue calculado a través de la Ecuación 7.

$$EM(\%) = 100x[(\text{pendiente en matriz})/(\text{pendiente en solvente}) - 1]$$

Ecuación 7

Donde; un valor negativo indica que existe supresión y un valor positivo indica un mejoramiento de la señal en el porcentaje calculado.

#### **3.4.9.3. Exactitud y precisión.**

Para evaluar la exactitud y precisión del método en muestras de orina se aplicó la metodología de extracción en condiciones de repetibilidad (n=4) a alícuotas de orina, las cuales fueron enriquecidas a dos niveles de concentración 0,50 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la exactitud fue obtenida a través del cálculo de la recuperación a cada nivel de concentración mientras que la precisión fue expresada en términos de la desviación estándar relativa, calculada para cada nivel de concentración.

#### **3.4.9.4. Límites de detección y cuantificación de la metodología de extracción.**

Los límites de detección y cuantificación de la metodología fueron obtenidos mediante extracciones de muestras de orina blanco enriquecida (n=6 para cada concentración) a concentraciones entre 0,125 y 0,5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , donde la desviación estándar de la mínima concentración en que se logró detectar cada analito, fue multiplicada por 3 y 10 veces para obtener la señal correspondiente al límite de detección ( $Y_{LD}$ ) y cuantificación ( $Y_{LC}$ ), respectivamente, las señales anteriormente mencionadas fueron interpoladas en cada curva de calibración para obtener la concentración correspondiente al límite de detección y cuantificación para cada analito.

#### **3.4.10. Metodología de hidrólisis enzimática para determinación de estrógenos totales, libres y conjugados.**

Para hidrolizar los analitos que se encuentran metabolizados en su forma conjugada con grupos glucurónidos o sulfatos y poder cuantificar los estrógenos totales (forma libre + forma conjugada), se utilizó una metodología de hidrólisis enzimática adaptada desde bibliografía [76], la cual consistió en tomar 2,0 mL de muestra de orina en un tubo cónico de vidrio al cual se le agregaron 2,0 mL de

acetato de sodio  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ajustado a pH 5,2 con HCl  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , luego la solución resultante se homogenizó mediante vortex por 10 segundos y luego se agregaron  $20 \text{ }\mu\text{L}$  (2000 U) de la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa, se homogenizó mediante inversión manual y luego se dejó en incubadora a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, luego la solución fue traspasada a un vial que contenía 20 mL de una solución de ácido ascórbico 0,05%, p/v, el disco rotatorio con la fase e-DVB y 300 mg de PSA, para aplicar la metodología de extracción por 60 min, a continuación los analitos fueron desorbidos, llevados a sequedad, derivatizados y determinados por LC-TOF/MS. Por otra parte para obtener la concentración de estrógenos solo en su forma libre, se aplicó la metodología de extracción directamente a la muestra de orina, sin el tratamiento enzimático. A partir de la cantidad de estrógenos totales menos la forma libre, se determinó la cantidad de estrógenos en su forma conjugada (estrógenos conjugados = estrógenos totales – estrógenos libres). Todas las muestras de orina analizadas como los puntos de la curva de calibración fueron fortificados con el estándar surrogate  $(20,21)^{13}\text{C}_2\text{EE}_2$  a una concentración de  $10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para corregir pérdidas durante la extracción.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Derivatización con cloruro de dansilo e identificación de estrógenos por LC-TOF/MS.

Inicialmente se aplicó la metodología de derivatización de EE2 reportada por Anari y colaboradores (2002) [44] sobre 100  $\mu\text{L}$  de estándar ( $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de cada estrógeno utilizado en este estudio. Con esta metodología de derivatización se infundieron los compuestos diluidos a 1 mL con metanol a un flujo de 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  obteniéndose las señales  $m/z$  530,2351, 504,2191, 506,2346, 522,2300, 520,2158, 753,2674, 753,2697, 755,2866 y 755,2869 para los analitos EE2, E1, E2, E3, 16-OHE1, 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2, respectivamente, correspondientes a las estructuras químicas que se muestran en la Tabla A6. Las señales obtenidas fueron las correspondiente a la formación del aducto  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , donde M representa la molécula de cada estrógeno derivatizado y H el átomo de hidrógeno (protón) que se le adhiere, obteniendo el aducto mono cargado positivamente, de la misma forma en que se ha reportado previamente para la determinación mediante espectrometría de masas para estos estrógenos en modo positivo [12,33,36,37]. Adicionalmente para los pares de isómeros 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2 se encontraron las señales de estos estrógenos con dos grupos dansilo y protonados en cada uno de ellos según la forma  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ , correspondientes a las señales con  $m/z$  377,1362, 377,1362, 378,1436 y 378,1438, respectivamente. Sin embargo con esta metodología de derivatización las señales obtenidas para los analitos 2/4-OHE1 como para 2/4-OHE2 presentaron una baja intensidad en relación al resto de los estrógenos, tanto en la forma  $[\text{M}+\text{H}]^+$  como  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ . En base a estos resultados se decidió realizar un estudio de las condiciones de derivatización para mejorar las señales de los 9 estrógenos considerados en este estudio. Previamente a la optimización de las condiciones de derivatización se utilizaron las señales obtenidas para optimizar los parámetros instrumentales que

influyen en la ionización como los voltajes en la salida del capilar (Capillary Exit) y en el cono (skimmer).

#### **4.2. Optimización de los parámetros instrumentales.**

Mediante la infusión de un estándar de E3 derivatizado en la fuente ESI, que ionizó en modo positivo formando el aducto de la forma  $[M+H]^+$  ( $m/z$  522,2300), se optimizó la ionización de los voltajes en la salida del capilar (*capillary exit*) y en el cono (*skimmer*), ya que estos parámetros influyen directamente en la intensidad de la señal  $m/z$  obtenida en el instrumento, afectando directamente en la sensibilidad de cada compuesto. Al modificar el voltaje de la salida del capilar se pudo observar un máximo de señal en 150 V como se muestra en la Figura 13. Este efecto se debe a que las moléculas de E3 derivatizadas y cargadas positivamente expuestas a voltajes inferiores a 120 V no logran ser conducidas en su totalidad hacia el sistema interno del espectrómetro de masas, debido a que el voltaje no es el suficiente para cumplir la función de atraer los iones hacia el interior del sistema, al incrementar a voltajes entre 120 y 160 V se obtiene un aducto estable que logra llegar en más cantidad hasta el detector, mostrando su máxima señal en 150 V, a medida que se supera el voltaje óptimo la intensidad de la señal comienza a disminuir llegando a intensidades mínimas, este efecto se puede deber a una inestabilidad del aducto a altos voltajes ocasionando fragmentación en fuente de los iones analizados, produciendo una disminución de la intensidad de la señal y por ende una pérdida de la sensibilidad.

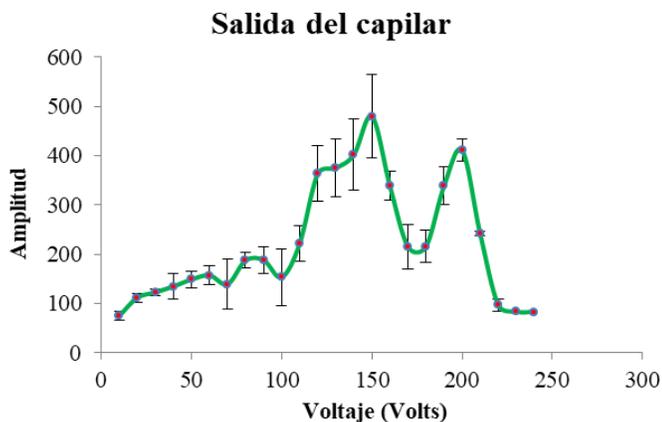


Figura 13. Efecto del voltaje en la salida del capilar del sistema ESI-TOF/MS, utilizando E3 derivatizado formando el aducto  $[M+H]^+$  con señal  $m/z$  522,2300.

El efecto del voltaje en el cono actúa seleccionando el paso de los iones que entrarán a la cámara de expansión donde se encuentran los lentes, que a través de radiofrecuencia guiarán los iones hacia el detector, en este caso valores entre 40 y 50 V fueron los valores en que se obtuvo la mayor respuesta para el analito estudiado, como se muestra en la Figura 14, el cual representa al grupo de estrógenos estudiados considerando la similitud en el intervalo de masas de los otros compuestos.

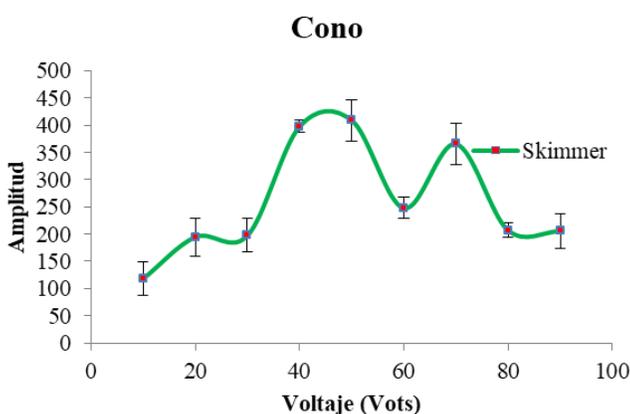


Figura 14. Efecto del voltaje en el skimmer del sistema ESI-TOF/MS, utilizando E3 derivatizado formando el aducto  $[M+H]^+$  con señal  $m/z$  522,2300.

En cuanto a las modalidades de adquisición pulso y trampa, los mejores resultados fueron obtenidos utilizando la modalidad trampa, puesto que este modo permitió optimizar mediante los parámetros “IG Exit Low” y “Trap/Pulse Delay” las señales en un intervalo de masas deseado, a diferencia con el modo pulso donde se monitorea por igual todo el intervalo de adquisición fijado por el método ( $m/z$  100-1000). En la modalidad trampa se optimizaron manualmente los valores correspondientes a los parámetros IG Exit Low y Trap/Pulse Delay utilizando los valores 18 y 36  $\mu$ s, respectivamente, tiempos que permiten que moléculas cargadas se mantengan retenidas en el hexapolo del espectrómetro de masas por un tiempo determinado en micro segundos concentrando los iones deseados y retardando el envío de estos iones al analizador TOF produciendo una disminución de la línea base y por lo tanto un aumento de la sensibilidad para el intervalo de masas deseado.

Con la optimización de estos parámetros se procedió a estudiar las mejores condiciones de derivatización en forma simultánea para los 9 estrógenos utilizando infusión directa para monitorear la intensidad de los analitos en cada experimento como también utilizando un método cromatográfico inicial no optimizado que permitió separar los 9 estrógenos pero sin la sensibilidad óptima para cada estrógeno.

### **4.3. Optimización de la derivatización.**

#### **4.3.1. Diseño experimental Doehlert.**

Al evaluar cómo afectan los factores; concentración de cloruro de dansilo, tiempo de reacción y el pH de la solución de carbonato ácido de sodio ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mediante un diseño Doehlert, se pudo observar que la concentración de derivatizante tuvo un efecto positivo y significativo ( $p \text{ value} < 0,05$ ) en la derivatización de todos los analitos. Cuando se utilizó la concentración de 1

mg/mL se obtuvo la mayor respuesta analítica y se favoreció la formación de un único producto de derivatización, a concentraciones inferiores a 1 mg/mL se obtuvieron subproductos de derivatización provenientes de los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2, este último efecto pudo ser observado al inyectar el extracto derivatizado utilizando un método cromatográfico obtenido desde *Anari y colaboradores* (2002) [44]. En el cromatograma de la Figura 15 se muestra la señal correspondiente a la señal  $m/z$  522,2300.

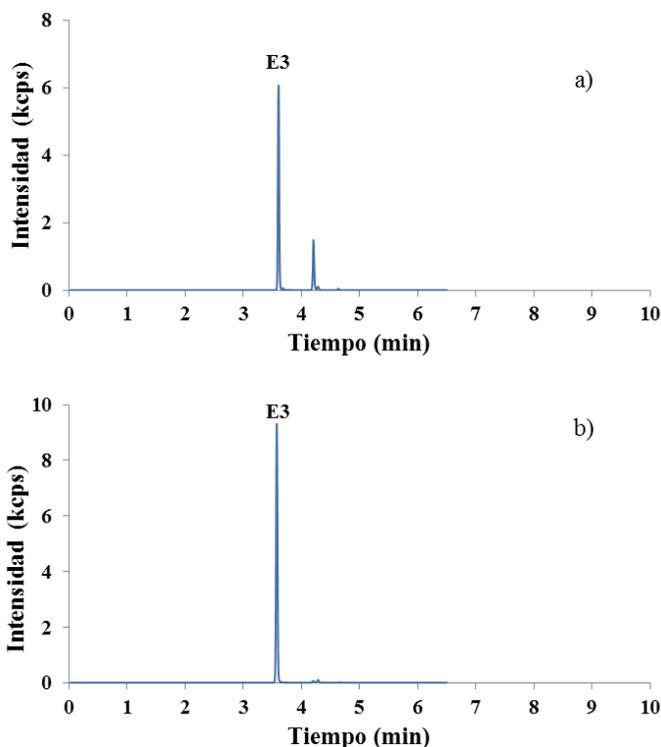


Figura 15. Cromatograma del ion extraído (EIC) de  $m/z$  522,2300, proveniente de un multiestándar de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  derivatizado con dos concentraciones de cloruro de dansilo. a) 0,1 mg/mL y b) 1 mg/mL.

Donde la señal cromatográfica más grande corresponde a E3 derivatizado, mientras que la más pequeña corresponde a un subproducto de derivatización de 2-OHE2 y 4-OHE2, obtenido cuando estos analitos son derivatizados solo en un grupo hidroxilo del anillo aromático que presenta la misma masa molecular que E3 derivatizado pero con un tiempo de retención de 4,2 min. Esta última especie

semi-derivatizada desaparece cuando la concentración de derivatizante es de 1 mg/mL. Lo mismo ocurre para los compuestos 2-OHE1 y 4-OHE1 con señal  $m/z$  520,2158 que coinciden con la señal correspondiente a 16-OHE1. La obtención de subproductos se debe a que la reacción de derivatización necesita que el agente derivatizante se encuentre en exceso respecto a los analitos ya que la reacción presenta un bajo rendimiento, principalmente para los compuestos que se derivatizan con 2 grupos dansilos, como los pares de isómeros 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2, ya que consumen una mayor cantidad de derivatizante como también presentan un mayor impedimento estérico a la reacción, necesitando desplazar el equilibrio hacia la formación del producto aumentando la cantidad de reactivo. Para las concentraciones evaluadas de derivatizante, solo la concentración de 1 mg/mL permitió obtener un único producto de derivatización para estos isómeros. Por otra parte, el pH tuvo un efecto negativo y significativo a valores sobre 9,5, mientras que el tiempo no fue significativo en el intervalo estudiado por lo que se fijó en 5 min el tiempo para la reacción de derivatización. El gráfico de superficie de respuesta de la Figura 16 muestra que las condiciones óptimas para todos los analitos fueron: concentración de cloruro de dansilo 1 mg/mL, pH entre 8 y 9,5 y tiempo de derivatización de 5 min.

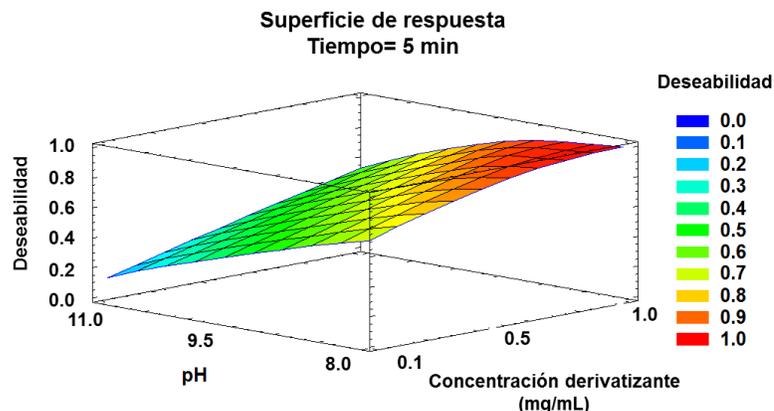


Figura 16. Superficie de respuesta del estudio de derivatización usando un diseño Doehlert.

Para ver detalladamente en qué analitos existe diferencia significativa al modificar el pH de la solución de carbonato ácido de sodio ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), se realizó un análisis estadístico (LSD) de Fisher, mostrando diferencias significativas al variar entre pH 8 y 11, a pH 11 la mayoría de los compuestos se vieron afectados negativamente en la derivatización, afectando principalmente a los catecol estrógenos. Para los analitos E1, E2, y E3 la mejor respuesta se obtuvo cuando el pH del medio de derivatización fue de 9,5, y para los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y 16-OHE1 se obtuvieron buenas respuestas entre pH 8 y 9,5, siendo significativamente mayores para 2-OHE1 y 16-OHE1 a pH 8, como se muestra en la Figura 17. Considerando el grupo de analitos se decidió utilizar un pH de 9,5 para obtener la mayor sensibilidad.

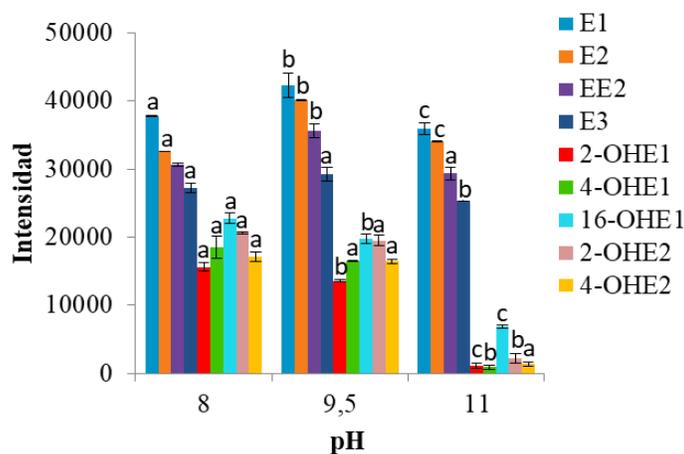


Figura 17. Efecto del pH de la solución de  $\text{NaHCO}_3$  ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) utilizado en la derivatización. Entre distintos pH, misma letra indica que no hay diferencia significativa y con distinta letra indican diferencia significativa.

La disminución de la señal a pH alcalino principalmente para los catecol estrógenos puede deberse a una rápida oxidación de estos compuestos en este medio, indicando que estos compuestos deberían ser protegidos como en otros estudios mediante la utilización de antioxidantes como ácido ascórbico [36]. Otra posible causa de la disminución de la respuesta en pH alcalino podría ser la inactivación del derivatizante al formar un enlace entre el azufre del cloruro de dansilo y los  $\text{OH}^-$  del medio de reacción, impidiendo que reaccione con los átomos de oxígeno ( $\text{O}^-$ ) de los estrógenos, efecto que se intensifica en los catecol estrógenos ya que como se mencionó anteriormente estos necesitan 2 moléculas de derivatizante por cada molécula de estos estrógenos en comparación con E1, E2, EE2, E3 y 16-OHE1 que se derivatizan con mayor facilidad por necesitar solo 1 grupo dansilo.

#### 4.3.2. Concentración de la solución de carbonato ácido de sodio.

Al evaluar la concentración de la solución de carbonato ácido de sodio en la reacción de derivatización entre 5 y  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , se observó que hay un aumento en la respuesta analítica cuando se utiliza una concentración de 50

$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$  respecto a  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaHCO}_3$ , luego a  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  la respuesta permanece constante. Este efecto se puede deber a que durante la reacción de derivatización puede haber variaciones del pH, donde el  $\text{NaHCO}_3$  a una concentración de  $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  puede no ser suficiente para mantener estable el pH, produciéndose una derivatización menos eficiente, a diferencia de lo ocurrido en concentraciones de 50 y  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se seleccionó la concentración  $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  de carbonato ácido de sodio para asegurar un pH constante del medio durante la reacción ya que en el caso de muestras complejas estas podrían aportar con interferentes que podrían modificar el pH óptimo afectando la derivatización.

#### **4.3.3. Temperatura de evaporación.**

Al aplicar temperaturas de 20, 40 y  $50^\circ\text{C}$  durante la evaporación de 10 mL de estándar ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada hormona), se pudo observar que existe un efecto negativo y significativo cuando se evapora con temperaturas de 40 y  $50^\circ\text{C}$ , en la Figura 18 se puede ver que nuevamente los catecol estrógenos son los compuestos que se ven mayormente afectados, mostrando ser inestables ante la exposición a temperaturas de 40 y  $50^\circ\text{C}$  por un periodo de tiempo de 60 min aproximadamente. Debido a que la utilización de calor durante la concentración mediante corriente de nitrógeno se hace necesaria para acortar los tiempos de la metodología, es que se probó utilizar ácido ascórbico como agente antioxidante esta etapa, a modo de estabilizar los catecol estrógenos durante la evaporación y posterior derivatización.

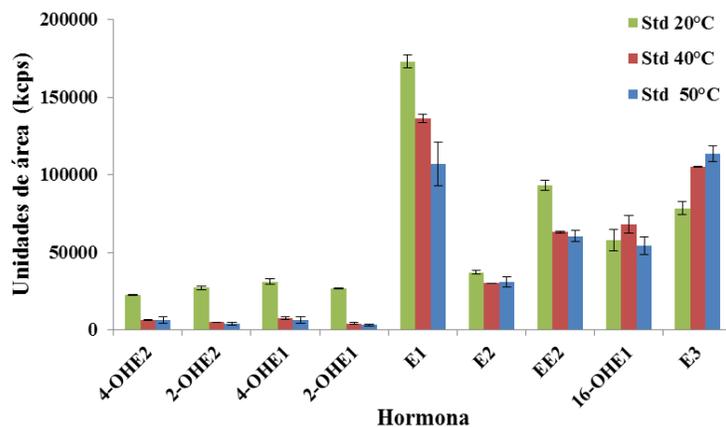


Figura 18. Efecto de la temperatura de evaporación sobre 10 mL de multiestándar de estrógenos ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### 4.3.4. Antioxidante en la derivatización.

Al utilizar ácido ascórbico en concentraciones entre 0,0 y 0,2% p/v en 10 mL de multiestándar ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada analito en metanol), evaporar la solución resultante y luego derivatizar el residuo con cloruro de dansilo, solo se obtuvieron las señales esperadas para los 9 compuestos estudiados cuando no se utilizó el antioxidante, mostrando un efecto opuesto a lo esperado, sin embargo, la explicación a este efecto se debe al alto residuo salino que se obtiene al evaporar los 10 mL de multiestándar con ácido ascórbico. Si bien el antioxidante se utilizó en concentraciones igual o menores que el 0,2% p/v, al evaporar los 10 mL de multiestándar y luego reconstituir en 200  $\mu\text{L}$ , se produce una concentración de 50 veces, por lo que al utilizar el ácido ascórbico en concentración de 0,2% p/v en el estándar se traduce a una concentración del 10% en el extracto final de derivatización, que en masa corresponde a 20 mg de ácido ascórbico, siendo esta cantidad 24 veces más que la cantidad de  $\text{NaHCO}_3$  (0,84 mg) contenida en los 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaHCO}_3$   $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  que se utiliza para mantener el pH en la derivatización. En la segunda prueba de derivatización donde se agregó el antioxidante en la solución tampón de carbonato ácido de sodio ( $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,

pH 9,5) utilizada en la derivatización, se obtuvieron señales para todos los analitos, como se puede observar en la Figura 19, donde existe un efecto positivo al utilizar el antioxidante, siendo 0,04% p/v de ácido ascórbico en la solución 100 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 9,5, la condición óptima, mejorando considerablemente la señal de 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 en relación a no utilizar ácido ascórbico, en cambio los analitos E1, E2 y EE2 se ven favorecidos levemente con la utilización de ácido ascórbico, solo 16-OHE1 y E3 disminuyen su intensidad, por lo que considerando la respuesta de todos los analitos hay una mejora de la respuesta al utilizar ácido ascórbico al 0,04% p/v en la solución de carbonato ácido de sodio. Se puede observar que al aumentar la concentración sobre el 0,08% las señales disminuyen progresivamente, esto se debe a que el pH de la solución podría modificarse a valores ácidos afectando a la reacción de derivatización, debido a la estabilización del protón ácido en la molécula sin derivatizar de cada estrógeno, impidiendo que se forme el producto de derivatización.

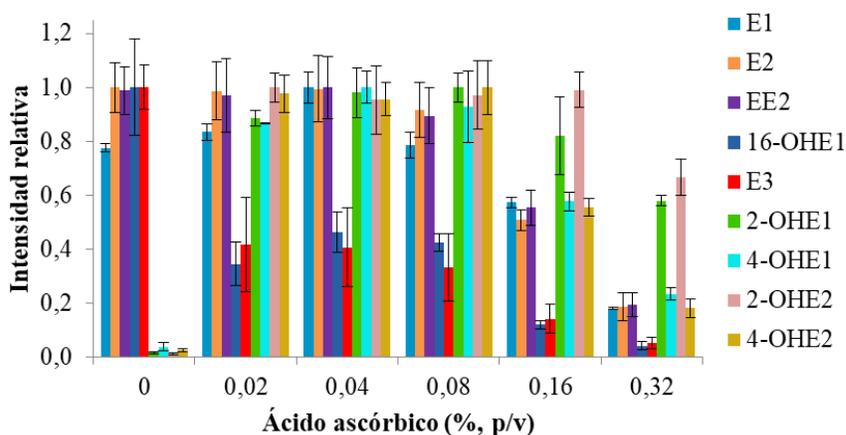


Figura 19. Cantidad de ácido ascórbico (% p/v) en la solución 100 mmol·L<sup>-1</sup> de NaHCO<sub>3</sub> utilizada para derivatizar los estrógenos.

Una vez definidas las mejores condiciones de derivatización para los 9 estrógenos se realizó una comparación de las señales obtenidas para cada analito utilizando la metodología desarrollada y la utilizada por *Anari y colaboradores* [44]. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Donde se puede observar, que con la metodología desarrollada se incrementó la señal de los catecol estrógenos entre 10 y 26 veces.

Tabla 2. Intensidad de las señales de los estrógenos derivatizados de acuerdo a la metodología de Anari et al. 2002 y a la metodología optimizada.

Analito	Método de derivatización de Anari [44]				Método de derivatización optimizado			
	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup>	Intensidad	<i>m/z</i> [M+2H] <sup>2+</sup>	Intensidad	<i>m/z</i> [M+H] <sup>+</sup>	Intensidad	<i>m/z</i> [M+2H] <sup>2+</sup>	Intensidad
<b>E3</b>	522,2300	3172	-	-	522,2300	2759	-	-
<b>16-OHE1</b>	520,2158	1402	-	-	520,2158	3431	-	-
<b>E2</b>	506,2346	15206	-	-	506,2346	15315	-	-
<b>EE2</b>	530,2351	12849	-	-	530,2351	12283	-	-
<b>E1</b>	504,2191	11780	-	-	504,2191	13340	-	-
<b>4-OHE2</b>	755,2869	7	378,1438	259	755,2869	660	378,1438	2884
<b>2-OHE2</b>	755,2866	ND	378,1436	167	755,2866	754	378,1436	3851
<b>4-OHE1</b>	753,2697	24	377,1362	398	753,2697	737	377,1362	3799
<b>2-OHE1</b>	753,2674	10	377,1362	159	753,2674	567	377,1362	4093

Intensidades de una solución estándar de 25 µg·L<sup>-1</sup> de cada analito.

ND = No detectado

#### **4.4. Estudio de diferentes medios de dilución de los analitos derivatizados.**

Con las mejores condiciones de derivatización, se diluyó el producto de derivatización (200  $\mu\text{L}$ ) con 800  $\mu\text{L}$  de diferentes medios para evaluar cómo afecta a la ionización a través de infusión directa, evaluando acetonitrilo, metanol, ácido fórmico y ácido acético, estos 2 últimos en concentraciones entre 0,1 y 0,3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , también se evaluó diluir en mezclas entre cada ácido y cada fases orgánica. De las fases evaluadas, las mezclas entre fases orgánicas y ácido fórmico fue la que mostró mayor intensidad de la señal, particularmente en ácido fórmico 0,3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  con acetonitrilo. El pH de la solución de ácido fórmico 0,3  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  fue 2,1, siendo el más ácido en comparación a las otras concentraciones utilizadas de ácido fórmico 0,003 (pH 3,2) y 0,03 (pH 2,6), donde un efecto debido al pH fue reflejado en el espectro de masas con cada concentración de ácido utilizada, como el que se ejemplifica en la Figura 20 para 2-OHE1.

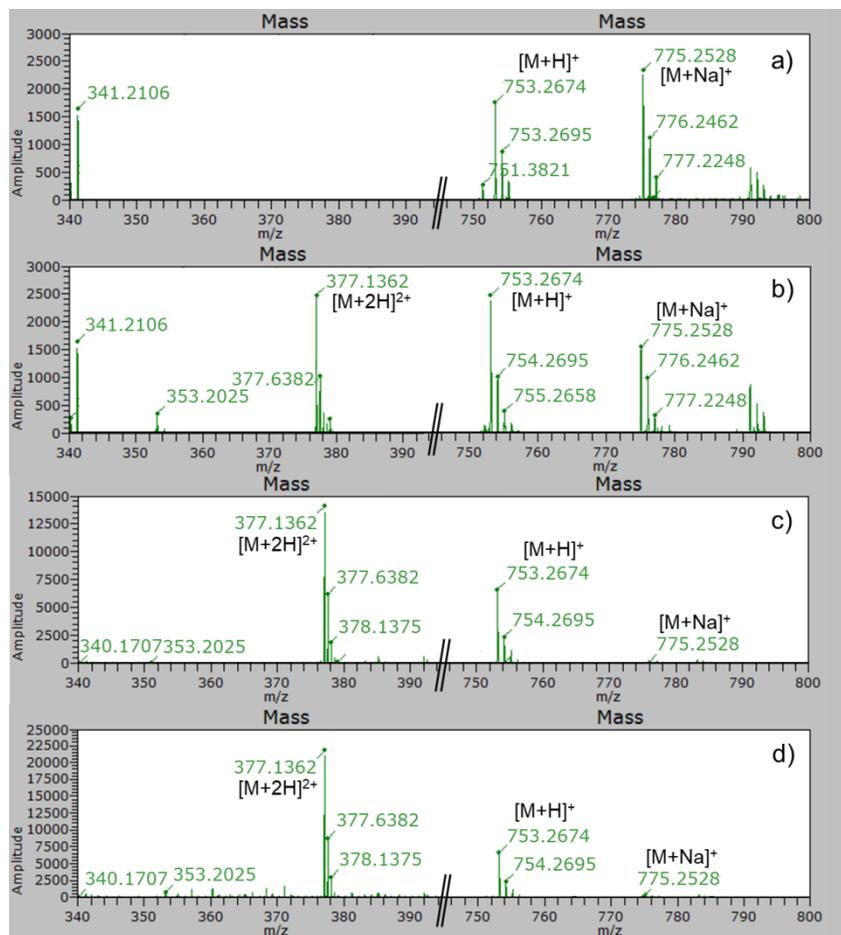


Figura 20. Espectro MS de 2-OHE1 en las formas  $[M+2H]^{2+}$  con  $m/z = 377,1362$ ,  $[M+H]^+$  con  $m/z = 753,2674$ , y  $[M+Na]^+$  con  $m/z = 775,2528$ , obtenido por infusión directa en el sistema TOF/MS a diferentes medios. a) Acetonitrilo/0,003 mol·L<sup>-1</sup> ácido fórmico (12:1), b) acetonitrilo/0,03 mol·L<sup>-1</sup> ácido fórmico (12:1) and c) acetonitrilo/0,3 mol·L<sup>-1</sup> ácido fórmico (12:1) y d) acetonitrilo/0,3 mol·L<sup>-1</sup> ácido fórmico (3:1).

Los espectros MS de 2-OHE1 derivatizado, son el resultado de una ionización influenciada por el pH y por la concentración de iones Na<sup>+</sup> en el medio de disolución, en la Figura 20a, la señal predominante correspondiente a 2-OHE1 fue  $m/z$  775,2528 que se explica por la formación del aducto con Na<sup>+</sup> provenientes del NaHCO<sub>3</sub> utilizado en la derivatización, formando la especie  $[M+Na]^+$  similar a la reportada para 2-OHE2 en otro estudio [36]. En el caso de la Figura 20b, la concentración del ácido fórmico fue 10 veces mayor a la

utilizada en la Figura 20a, produciéndose las señales 753,2674 y 775,2497 correspondientes a  $[M+H]^+$  y  $[M+Na]^+$ , mientras que en el caso de la Figura 20c, la concentración del ácido es 100 veces mayor al de la Figura 20a, produciéndose predominantemente las especies  $[M+2H]^{2+}$  y  $[M+H]^+$ . Debido a que cada uno de los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 al estar totalmente derivatizados con cloruro de dansilo, poseen dos grupos funcionales aminas, que presentan propiedades ácido-base con constantes de acidez expresada en término de pKa entre 4,26 y 4,86, por lo tanto, ambos estarían protonados a un pH cercano a 2, que es obtenido utilizando ácido fórmico  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . En la Figura 20d se puede observar que además las señales son mejoradas cuando aumenta la proporción de ácido fórmico en la mezcla con acetonitrilo, demostrando la importancia de la concentración del ácido en la ionización.

#### **4.5. Espectros MS de los 9 estrógenos en estudio.**

Los espectros de masas obtenidos para cada uno de los analitos en las condiciones optimizadas de derivatización se observan en la Figura 21 y 22, donde para 2-OHE1 la señal 753,2674 está muy cercana del ruido siendo necesario hacer un zoom para lograr ver la señal en el espectro MS Figura 22a.

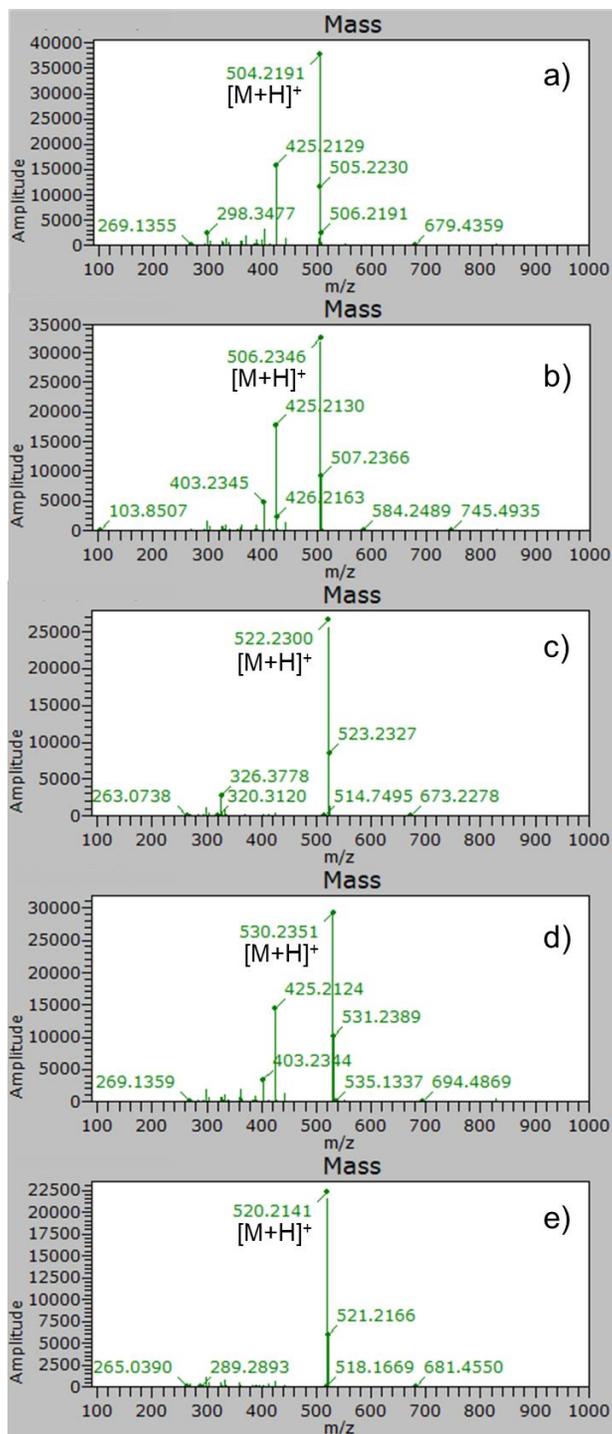


Figura 21. Espectro de masas de los estrógenos a) E1  $m/z$  504,2191, b) E2  $m/z$  506,2346, c) E3  $m/z$  522,2300, d) EE2  $m/z$  530,2351y e) 16-OHE1  $m/z$  520,2141.

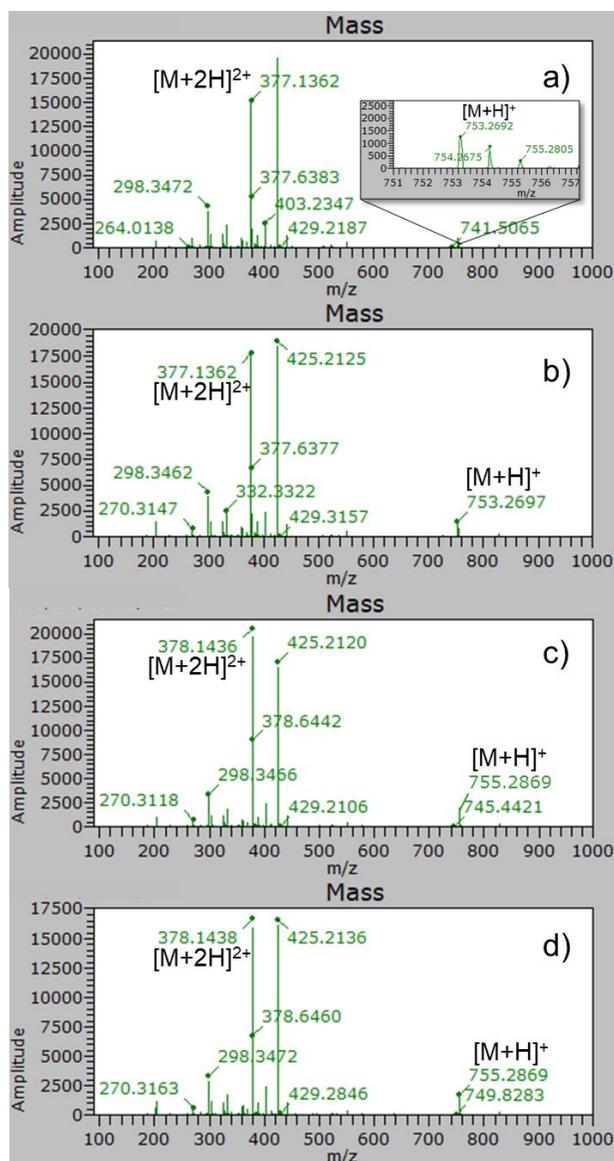


Figura 22. Espectro de masas de los compuestos doblemente derivatizados de la forma  $[M+H]^+$  y  $[M+2H]^{2+}$ , respectivamente. a) 2-OHE1  $m/z = 753,2692$  y  $377,1362$  b) 4-OHE1  $m/z = 753,2692$  y  $377,1362$  c) 2-OHE2  $m/z = 755,2869$  y  $378,1436$  y d) 4-OHE2  $m/z = 755,2869$  y  $378,1438$ .

En la Figura 23, se observa la relación isotópica de señales que equidistan en 0,5 unidades  $m/z$  de los respectivos compuestos, lo que ayuda a comprobar que las señales antes mencionadas provienen de los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 derivatizados y doblemente cargados en la forma  $[M+2H]^{2+}$ .

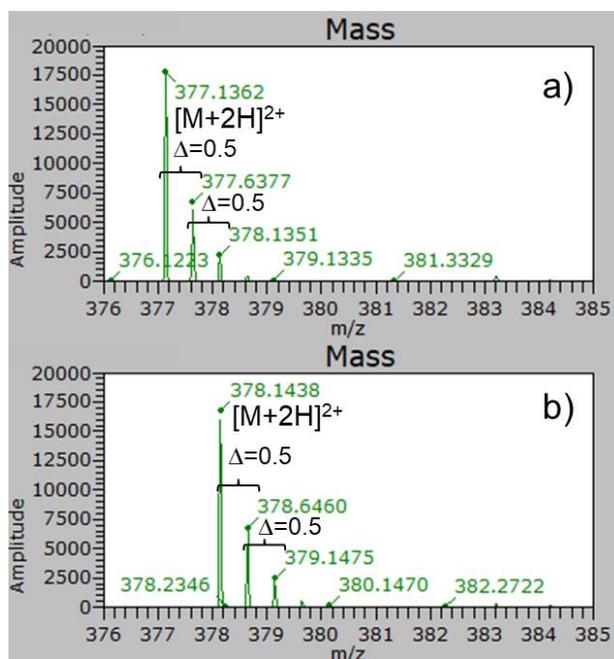


Figura 23. Zoom a espectro MS que muestra la relación isotópica. a) 2-OHE1  $m/z = 377,1362$  y b) 2-OHE2  $m/z = 378,1436$ .

#### 4.6. Evaluación de fases móviles en LC-MS.

La separación cromatográfica podría no ser necesaria para analitos que se determinan mediante diferentes señales  $m/z$  al utilizar espectrometría de masas, como ocurre para E1, E2, EE2, 16-OHE1 y E3. Sin embargo, para los pares de isómeros 2-OHE1 y 4-OHE1 como también para 2-OHE2 y 4-OHE2, fue necesario lograr la separación cromatográfica que permitiera cuantificar independientemente estos analitos, ya que estos ionizan de la misma forma  $[M+2H]^{2+}$  generando los mismos iones pseudo-moleculares. Al evaluar las distintas composiciones de fases móviles detalladas en la sección 7.4, con la fase móvil que se obtuvieron mejores resultados en cuanto a separación, sensibilidad y reproducibilidad fue la mezcla fórmico  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /acetonitrilo como se muestra en el cromatograma de la Figura 24.

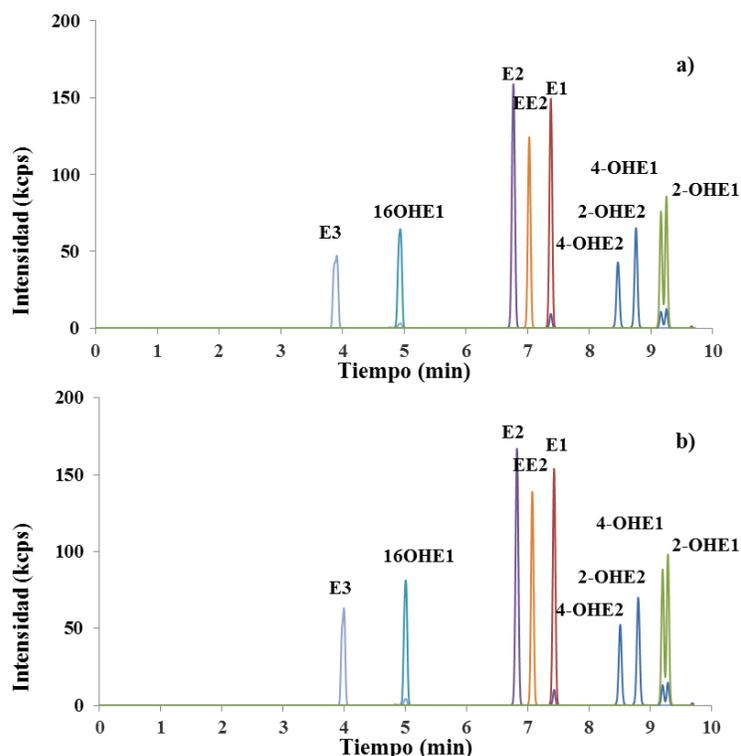


Figura 24. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) derivatizados. Utilizando acetonitrilo como fase orgánica en ambos cromatogramas, y como fase acuosa se utilizó en a) ácido fórmico  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  y b) ácido fórmico  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Por otra parte al utilizar agua/acetonitrilo como fase móvil, se mostraron buenas intensidades para E3, 16-OHE1, E2, EE2 y E1, sin embargo no fue posible resolver los isómeros 2-OHE1 y 4-OHE1 como con la mezcla ácido fórmico  $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ /acetonitrilo, sumado en una pérdida de sensibilidad para los catecol estrógenos como se muestra en el cromatograma de la Figura 25.

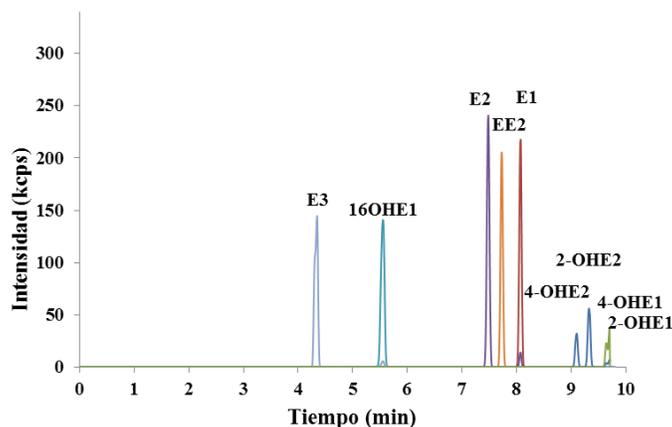


Figura 25. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) derivatizados. Utilizando como fase móvil agua/acetonitrilo.

Por otra parte en esta composición de fase móvil no fue posible reproducir la respuesta obtenida ya que al inyectar los analitos en forma consecutiva las intensidades de todos los analitos fueron decreciendo y los picos cromatográficos perdieron resolución, como se muestra en la Figura 26.

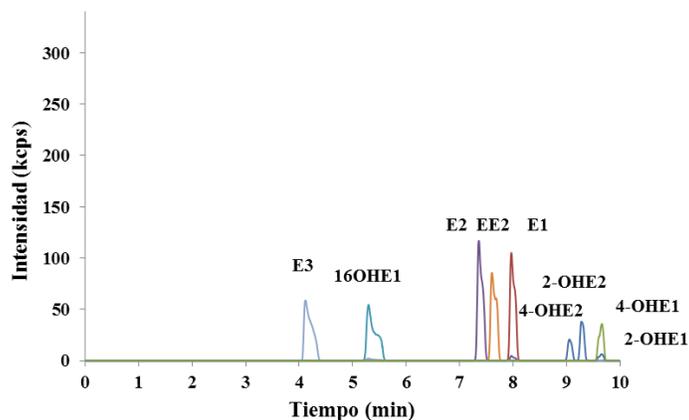


Figura 26. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) derivatizados. Utilizando como fase móvil agua/acetonitrilo, segunda inyección.

La fase ácido fórmico  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ /metanol produjo la elución todos los analitos desde la columna cromatográfica en un tiempo menor a 6 min como se muestra

en el cromatograma de la Figura 27, el menor tiempo de elución de todos los compuestos utilizando metanol en vez de acetonitrilo se debe a que metanol presenta una mayor afinidad con los estrógenos que acetonitrilo, esto debido a la menor polaridad del metanol, sin embargo a pesar de que se puede identificar y cuantificar casi la totalidad de los analitos estudiados (excepto los isómeros 2/4-OHE2 y 2/4-OHE1 que co-eluyeron), la señal analítica usando metanol fue menor a la obtenida con la mezcla de ácido fórmico 0,3 mol·L<sup>-1</sup>/acetonitrilo por lo que se seleccionó la mezcla con acetonitrilo a modo de priorizar la sensibilidad y selectividad por una corrida cromatográfica más corta.

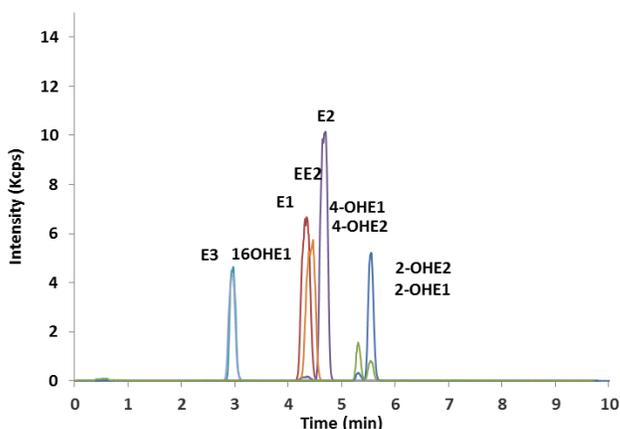


Figura 27. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a (50 µg·L<sup>-1</sup>) derivatizados. Utilizando como fase móvil ácido fórmico 0,3 mol·L<sup>-1</sup>/metanol.

Las diferencias en intensidades de las señales analíticas de los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 con los iones con doble carga  $[M+2H]^{2+}$  y mono cargados  $[M+H]^+$  se muestran en los cromatogramas de la Figura 28.

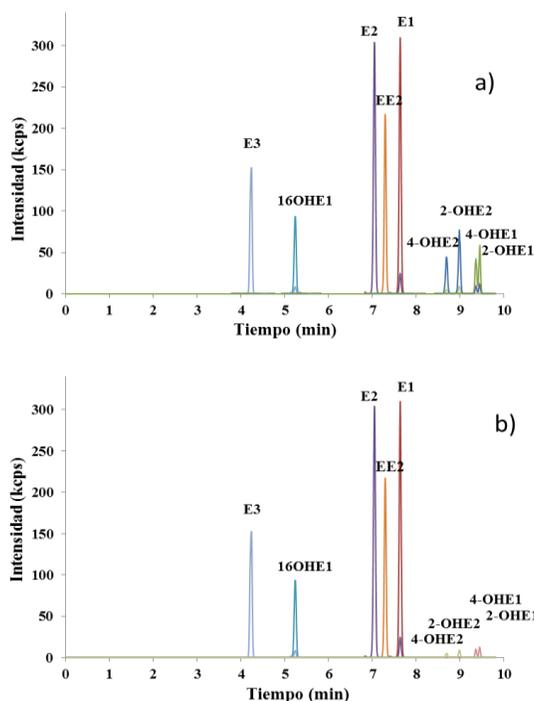


Figura 28. Cromatograma del ion extraído (EIC) de E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1, 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1 y 2-OHE1 a  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a) Doblemente cargado  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  ( $m/z = 377,1362$  y  $378,1438$  para 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2, respectivamente) y b) mono cargado  $[\text{M}+\text{H}]^{+}$  ( $m/z = 753,26$  y  $755,28$  para 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2, respectivamente).

#### 4.7. Error experimental en el sistema LC-TOF/MS.

Para determinar los compuestos en estudio de forma confiable se necesita calcular el error de la señal masa/carga experimental respecto a la teórica para cada compuesto, estas diferencias calculadas en ppm se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Señales  $m/z$  teóricas, experimentales y error experimental de los estrógenos estudiados.

<b>Estrógeno</b>	<b><math>m/z</math> teórico*</b>	<b><math>m/z</math> experimental</b>	<b>Error (ppm)</b>
<b>E3</b>	522,2314	522,2300	2,6
<b>16-OHE1</b>	520,2187	520,2141	5,6
<b>E2</b>	506,2365	506,2346	3,8
<b>EE2</b>	530,2365	530,2351	2,6
<b>E1</b>	504,2217	504,2191	5,2
<b>4-OHE2</b>	378,1452	378,1438	3,7
<b>2-OHE2</b>	378,1452	378,1436	4,2
<b>4-OH-E1</b>	377,1373	377,1362	2,9
<b>2-OH-E1</b>	377,1373	377,1362	2,9
<b>(20,21)<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2</b>	532,2432	532,2404	5,3

\*  $m/z$  calculadas con software Molecular Weight Calculator.

Se observa que los errores experimentales de todos los compuestos no superan los 5,6 ppm, indicando que la identificación de estos compuestos respecto a sus señales  $m/z$  es de alta resolución. Por otra parte la corrida cromatográfica por LC se fijó en 10 min, tiempo en el cual se logró separar totalmente 7 de los 9 analitos de este estudio, sin embargo los compuestos 2-OHE1 y 4-OHE1 a pesar de no estar totalmente resueltos pudieron ser integrados independientemente en el tiempo de la corrida cromatográfica mejor que en otros estudios donde han sido cuantificados como la suma de ambos en un peak cromatográfico en corridas más largas de 16 min utilizando cromatografía líquida ultra rápida (UFLC-MS/MS) con una columna de fase reversa C<sub>18</sub> (2,1 mm x 100 mm, 1,8 $\mu$ m) [12] o resueltos utilizando columnas del doble más largas C<sub>18</sub> (3,0 x 150 mm, 2,7  $\mu$ m) con tiempos de análisis de 35 min [33] o en corridas de 70 min utilizando un HPLC-MS/MS con columna C<sub>18</sub> (2 mm x 150 mm, 4  $\mu$ m) [37].

#### 4.8. Precisión de la metodología de determinación LC-TOF/MS.

La precisión de la metodología de determinación analítica fue evaluada a través de la reproducibilidad de la preparación de 6 multiestándares independientes en una concentración de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para cada hormona, evaluando los tiempos de retención e intensidad de la señal, estos parámetros expresados como desviación estándar relativa, adicionalmente se muestran los tiempos de retención relativos al tiempo de retención del estándar surrogate  $(20,21)^{13}\text{C}_2$  EE2, los valores se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Precisión evaluada a través de la reproducibilidad (n=6) en la determinación de hormonas.

<b>Estrógeno</b>	<b>RSD Área (%)</b>	<b>RSD Tiempo de retención (%)</b>	<b>Tiempo de retención relativo (TRR)</b>
<b>E3</b>	9,3	1,1	0,57
<b>16-OHE1</b>	9,6	1,0	0,71
<b>E2</b>	6,3	0,4	0,97
<b>EE2</b>	6,3	0,4	1,00
<b>E1</b>	9,2	0,3	1,04
<b>4-OHE2</b>	10,2	0,2	1,18
<b>2-OHE2</b>	11,2	0,1	1,22
<b>4-OHE1</b>	13,5	0,1	1,29
<b>2-OHE1</b>	9,1	0,1	1,30
<b><math>(20,21)^{13}\text{C}_2</math> EE2</b>	12,8	0,3	-

#### 4.9. Curva de calibración y estimación del intervalo lineal.

Las curvas de calibración obtenidas para todos los analitos entre 3 y  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  incluyendo el compuesto  $^{13}\text{C}_2$  EE2 utilizado como estándar surrogate en el análisis de muestras complejas, mostraron que los compuestos  $(20,21)^{13}\text{C}_2$  EE2, E1, E2, EE2, E3 y 16-OHE1, presentaron valores de  $R^2$  mayores a 0,992 en el intervalo entre 3 y  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en cambio para los analitos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 los valores de  $R^2$  estuvieron entre 0,988 y 0,991, pudiéndose determinar que estos compuestos poseen un intervalo de linealidad inferior a los estrógenos E1, E2, EE2, E3 y 16-OHE1. En las curvas de

calibración de las Figuras A1 a la A10 del anexo, se puede observar que a concentraciones superiores a los  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  comienzan a presentar un segundo intervalo de linealidad en que la pendiente es superior a la mostrada en concentraciones inferiores a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Por lo anterior para el cálculo de los límites de detección y cuantificación del instrumento, se realizaron curvas de calibración desde la concentración mínima detectable ( $0,25 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) hasta concentraciones no superiores a los  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para cada analito, a modo de minimizar los errores en la estimación de estos parámetros al utilizar curvas de calibración en intervalos de concentraciones muy por encima a las concentraciones de los límites de detección y cuantificación. En la Tabla 5 se muestran las ecuaciones de la recta de las curvas de calibración de cada analito como también el valor de  $R^2$  en el intervalo de concentraciones  $3\text{-}100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Tabla 5. Curva de calibración y coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para cada estrógeno entre 3 y  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

<b>Estrógeno</b>	<b>Ecuación de la recta</b>	<b><math>R^2</math></b>
<b>E3</b>	$y= 7503,1x - 48901$	0,993
<b>16-OHE1</b>	$y= 2774x - 19233$	0,992
<b>E2</b>	$y= 11634x - 74349$	0,991
<b>EE2</b>	$y= 12461x - 77360$	0,992
<b>E1</b>	$y= 15541x - 93628$	0,994
<b>4-OHE2</b>	$y= 669,93x - 4833,3$	0,989
<b>2-OHE2</b>	$y= 1007,3x - 7000,8$	0,991
<b>4-OHE1</b>	$y= 687,65x - 4899,2$	0,988
<b>2-OHE1</b>	$y= 747,81x - 4408,1$	0,988
<b>(20, 21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2</b>	$y= 1411,7x - 9007,9$	0,993

#### **4.10. Curva de calibración para cálculo de límites de detección instrumentales.**

Las curvas de calibración para cada analito obtenidas del análisis en duplicado de multiestándares en concentraciones entre  $0,25$  y  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mostraron una respuesta lineal en el intervalo estudiado con un  $R^2$  mayor a  $0,994$  para todos

los analitos como se muestra en las Figuras A11-A19. Las ecuaciones de la recta junto al límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LDC) obtenidos para los 9 estrógenos estudiados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros obtenidos desde curva de calibración para las hormonas entre 0,25 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Estrógeno	LDI ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	LCI ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Ecuación de la recta	R <sup>2</sup>
<b>E3</b>	0,20	0,65	y= 2375x + 52	0,999
<b>16-OHE1</b>	0,55	1,34	y= 2427x - 383	0,995
<b>E2</b>	0,12	0,39	y= 3427x + 49	0,999
<b>EE2</b>	0,27	0,62	y= 4775x - 474	0,998
<b>E1</b>	0,46	0,92	y= 4840x - 1128	0,994
<b>4-OHE2</b>	1,05	2,30	y= 293x - 126	0,996
<b>2-OHE2</b>	1,01	2,27	y= 847x - 326	0,995
<b>4-OHE1</b>	1,14	2,30	y= 577x - 328	0,995
<b>2-OHE1</b>	0,51	1,01	y= 1032x - 269	0,999

Con los valores de los límites de detección y cuantificación definidos, se comenzó a optimizar la metodología de extracción de estrógenos desde muestras acuosas utilizando RDSE, considerando las concentraciones adecuadas de trabajo para el fortificado de las muestras, teniendo en cuenta el orden de los factores de concentración que podrían ser necesario utilizar de acuerdo a las concentraciones esperadas de los estrógenos en cada matriz.

#### **4.11. Optimización de la técnica de RDSE para estrógenos en muestras acuosas.**

En la optimización de la metodología las muestras acuosas se enriquecieron a una concentración de 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada compuesto aplicando un factor de concentración de 125 veces ya que el volumen inicial de muestra fue 25 mL llegando a un extracto final de 200  $\mu\text{L}$ .

#### 4.11.1. Fases sorbentes.

De las fases sorbentes evaluadas, la que mostró mejores recuperaciones fue la compuesta por estireno divinilbenceno en lámina, extrayendo entre el 37 y 60% de los compuestos E1, E2, EE2, 16-OHE1 y E3. La segunda fase sorbente que entregó buenas recuperaciones absolutas fue la fase C18, con la que se obtuvieron valores entre el 9 y 54%, como se muestra en la Figura 29. De los polímeros sintéticos, los numerados del 1-3 fueron los que mejores resultados mostraron con recuperaciones absolutas entre el 15 y el 58% como se observa en la Figura 30, este grupo de polímeros corresponde a los conformados por N-vinilpirrolidona, este monómero también utilizado en el copolimero de las columnas SPE Oasis HLB, el cual tiene afinidad con grupos polares y genera la retención de los compuestos orgánicos a través de puentes de hidrógeno. Se seleccionó la fase e-DVB lámina por presentar mejores recuperaciones para estos cinco analitos, la buena afinidad de esta fase se puede deber a que los monómeros estireno y divinilbenceno interactúan con compuestos químicos de mediana a baja polaridad, como los son los estrógenos estudiados ( $\text{Log } K_{O/W}$  2,7-4,2). Entre la fase e-DVB en lámina y e-DVB en polvo, la primera forma fue más eficiente, debido a que al estar inmovilizada en el disco rotatorio superficialmente favorece la interacción con los analitos en la matriz, en cambio en e-DVB en polvo la transferencia de masa de los analitos es más lenta debido a que estos deben atravesar tanto la capa estancada de agua como también el soporte de fibra de vidrio para interactuar con el sorbente y ser retenidos. A pesar de que los catecol estrógenos son de características más polares que los compuestos E1, E2 EE2 y 16-OHE1, no difieren en gran cantidad con E3 por lo que se esperaba un comportamiento similar en la extracción, sin embargo, los estrógenos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 no se lograron detectar en estas pruebas.

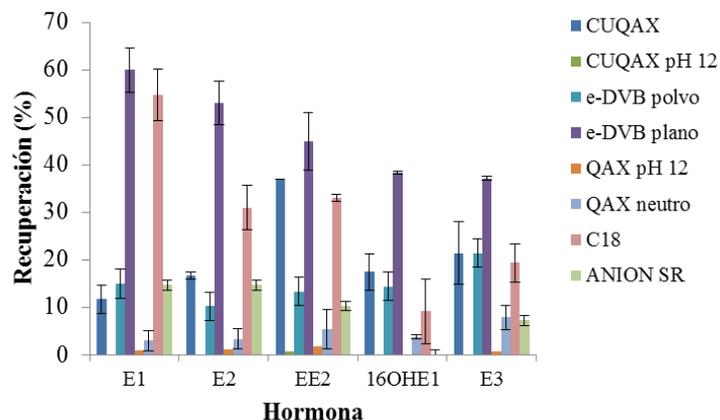


Figura 29. Estudio de fases sorbentes en RDSE para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas.

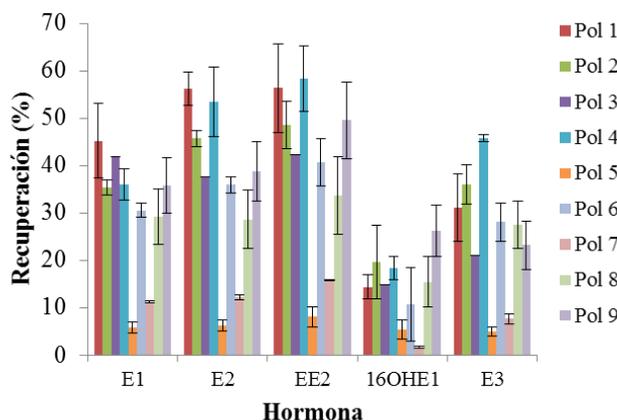


Figura 30. Estudio de fases sorbentes en RDSE utilizando polímeros sintéticos compuestos por N-vinilpirrolidona (Pol 1-3), 1-vinilimidazol (Pol 4-6) y acrilamida (Pol 7-9) en la extracción de estrógenos desde muestras acuosas.

#### 4.11.2. Estudio de fuerza iónica.

Con la fase sorbente e-DVB seleccionada, se estudió el efecto de la fuerza iónica en el medio de extracción para favorecer la recuperación de los compuestos por efecto “salting out”, disminuyendo la solubilidad de los analitos en la muestra por solubilización de la sal cloruro de sodio agregada a la muestra, Para este estudio se agregó la sal en concentraciones entre el 0 y el

10% p/v sobre 25 mL de agua desionizada enriquecida con todos los compuestos a una concentración de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y luego se realizó la extracción por un tiempo de 60 min. En la Figura 31 se puede observar que las respuestas para los analitos E1, E2, EE2, 16-OHE1 y E3 no mejoraron significativamente y tampoco se logró obtener señal analítica para los analitos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 con la utilización de sal, por lo que se determinó no utilizar NaCl en el medio de extracción ya que no afectó significativamente en la señal de los analitos estudiados.

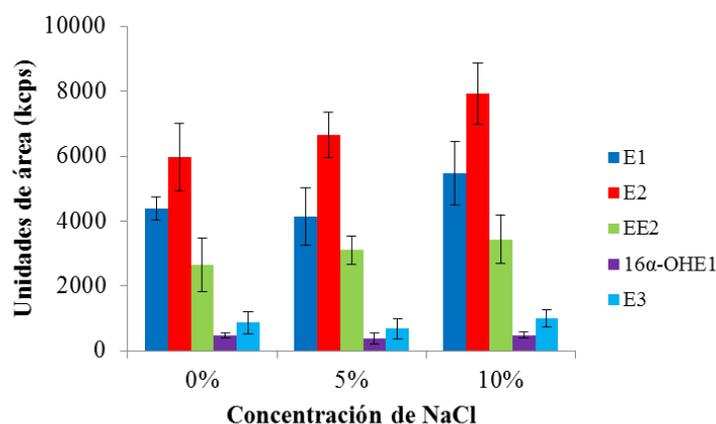


Figura 31. Efecto de la fuerza iónica con NaCl en la extracción de estrógenos desde muestras acuosas utilizando RDSE-e-DVB.

#### 4.11.3. Utilización de ácido ascórbico como agente antioxidante.

Como no se obtuvo respuesta luego de la extracción con RDSE para 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 en los estudios anteriores, hizo suponer que los catecol estrógenos podrían estar transformándose a una forma oxidada al estar en solución acuosa durante el proceso de extracción o inactivarse los sitios activos por los que son derivatizados, evitando la posterior determinación por LC-TOF/MS. Otros investigadores han hecho mención de la necesidad de utilizar ácido ascórbico en todas las etapas de preparación de muestras para proteger a estos compuestos, sobre todo en medios alcalinos [36,37]. Debido a

lo anterior, se utilizó este agente antioxidante en la solución de extracción en una concentración 0,1% p/v. Al realizar extracciones mediante RDSE en muestras acuosas en presencia de ácido ascórbico se logró obtener respuesta de los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 como se muestra en la Figura 32. Para los analitos E1, E2, EE2, 16-OHE1 y E3 se observó una leve disminución en la respuesta analítica cuando se utilizó el antioxidante, sin embargo debido a la buena respuesta obtenida para los catecol estrógenos, se decidió utilizar ácido ascórbico 0,1% p/v en la solución de extracción para el resto de los estudios.

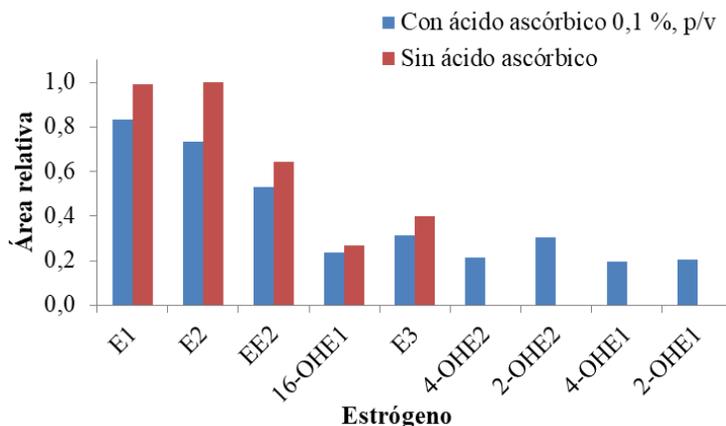


Figura 32. Comparación de la respuesta analítica luego de la extracción de estrógenos mediante RDSE-e-DVB con ácido ascórbico (0,1% p/v) y sin ácido ascórbico en la solución de extracción.

#### 4.11.4. Disolvente de desorción

Al evaluar metanol y acetona como disolventes para la desorción de los analitos desde la fase sorbente e-DVB, se pudo observar que el disolvente metanol fue el que mostró mejores resultados para la serie de analitos, como se muestra en la Figura 33, la diferencia producida entre ambos disolventes se puede deber principalmente a la polaridad de cada uno de ellos, donde metanol es un disolvente polar (índice de polaridad 6,6) que permite una

mejor interacción con los analitos de polaridad intermedia, favoreciendo la disolución de los 9 estrógenos en este medio, en cambio acetona es de características más apolar (índice de polaridad 5,4), lo que produce una menor interacción con los analitos en los 15 minutos utilizados para realizar la desorción desde el disco rotatorio. Se puede observar que al utilizar acetona, las respuestas para los estrógenos E1, E2, EE3, E3 y 16-OHE1 disminuyeron en aproximadamente un tercio respecto a la desorción con metanol, mientras que para los compuestos 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2 la disminución de las señales fue alrededor de 10 veces. Este comportamiento se podría deber a la alta polaridad de los catecol estrógenos como también a que son compuestos menos estables que en acetona podrían oxidarse fácilmente al estar en contacto con oxígeno produciendo otras especies disminuyendo la respuesta en las formas en que los catecol estrógenos son determinados.

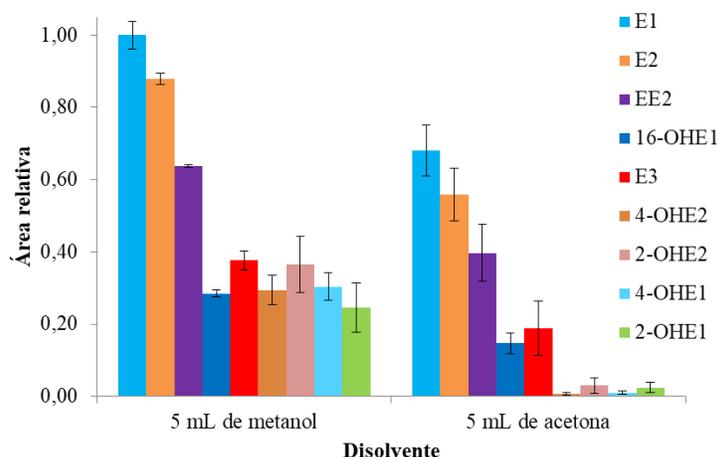


Figura 33. Comparación en la desorción de estrógenos desde RDSE (e-DVB) utilizando 5 mL de disolvente.

#### 4.11.5. pH de la solución de extracción.

Todos los estudios desarrollados previamente a la utilización de ácido ascórbico fueron desarrollados a pH 7, sin embargo al utilizar el ácido ascórbico en concentración 0,1 % p/v el pH de la solución fue de 3,4 y ajustada

a pH 6. Para evaluar si el incremento de las señales fue debido al pH del medio o al efecto del antioxidante se realizó un estudio de pH en presencia de ácido ascórbico 0,1 % p/v ajustando el pH entre 2 y 12, utilizando HCl 0,1 mol·L<sup>-1</sup> y NaOH 0,1 mol·L<sup>-1</sup> para ajustar a pH ácido y básico, respectivamente. En las Figuras 34 y 35, se observa que a pH 6 se obtiene se obtiene la respuesta óptima para la extracción de todos los compuestos. A pH alcalino es posible extraer los compuestos desde la muestra acuosa, sin embargo la respuesta disminuye para todos los analitos a medida que el pH aumenta, este efecto responde a la forma aniónica en que se encuentran los estrógenos a valores de pH cercanos a 10, ya que los valores de pKa están entre 9,6 y 10,4, de esta forma los analitos tienen menos afinidad con la fase sorbente e-DVB, por el aumento de la polaridad de los compuestos y a su vez al encontrarse estos analitos en su forma ionizada se desplaza el equilibrio hacia la fase acuosa, haciéndose más estables en la solución disminuyendo la eficiencia de la extracción.

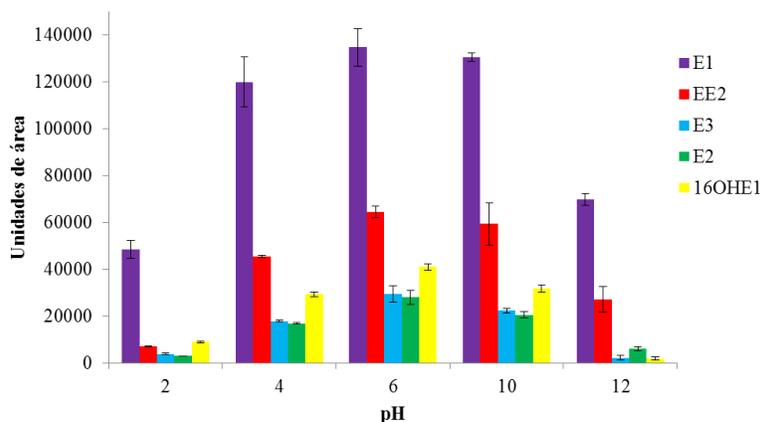


Figura 34. Efecto del pH en la solución de extracción para E1, E2, EE2, E3 y 16-OHE1 utilizando RDSE-e-DVB.

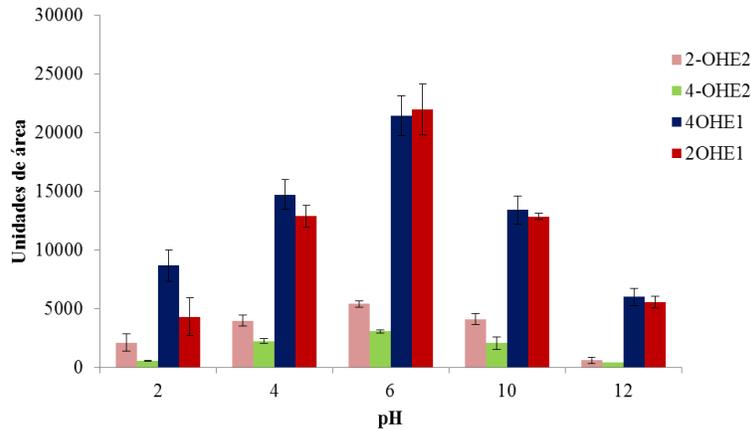


Figura 35. Efecto del pH en la solución de extracción para 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OH utilizando RDSE-e-DVB.

#### 4.11.6. Perfil de extracción.

Manteniendo las mejores condiciones de extracción, es decir, agitando a 3000 rpm, utilizando la fase e-DVB, usando ácido ascórbico 0,1% como antioxidante y ajustando la solución a pH 6, se procedió a realizar un perfil de extracción entre 15 y 150 min, enriqueciendo la muestra con todos los analitos a una concentración de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En las Figura 36 y 37 se puede observar que a los 90 min de extracción se comienza a alcanzar el equilibrio de distribución del analito entre la fase sorbente y la fase acuosa, aumentando levemente la respuesta luego de 90 min, por lo tanto se fija 90 min como tiempo óptimo de extracción.

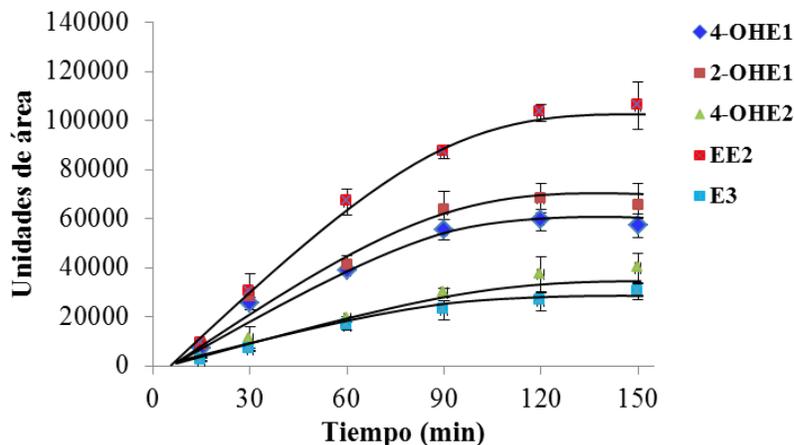


Figura 36. Perfil de extracción de 4-OHE1, 2-OHE1, 4-OHE2, EE2 y E3 desde muestras acuosas mediante RDSE-e-DVB.

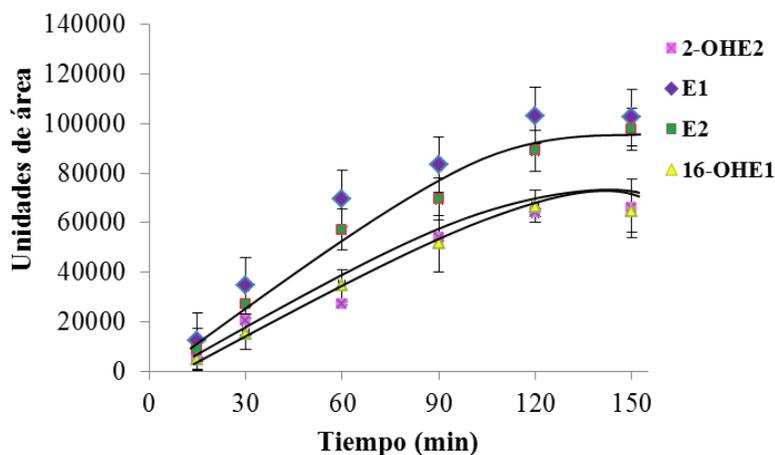


Figura 37. Perfil de extracción de 2-OHE2, E1, E2 y 16-OHE1 desde muestras acuosas mediante RDSE-e-DVB.

#### 4.11.7. Validación de la metodología RDSE.

##### 4.11.7.1. Linealidad.

El método desarrollado fue aplicado en muestras fortificadas de agua desionizada como en muestras fortificadas de agua residual, donde se obtuvieron valores de  $R^2$  entre 0,987 y 0,999, mostrando que el método es adecuado para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas tanto en

matrices sin interferentes como en matrices acuosas de alta complejidad, como efluentes de aguas residuales. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

#### **4.11.7.2. Evaluación del efecto matriz.**

Se calculó el efecto matriz en muestras de efluente, mediante la comparación de las pendientes obtenidas para cada analito en el ensayo de linealidad en agua desionizada y efluente de agua residual, donde se consideraron las pendientes obtenidas en agua desionizada fortificada, como referencia de ausencia de matriz. En la Tabla 7 se muestran los resultados de las pendientes obtenidas en agua desionizada y en agua de efluente, donde se puede observar que el efecto matriz fue negativo para todos los compuestos, que correspondieron a supresiones entre el -22,9 y -47,6%. Este efecto se puede deber a una disminución en la recuperación de estos compuestos en presencia de los interferentes propios de un efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales, como también a la disminución en la eficiencia de la derivatización en presencia de interferentes de la matriz, en base a los resultados se determinó que para cuantificar los estrógenos en este tipo de muestras complejas fue necesario hacer una calibración en matriz, como también hacer adición estándar, ya que si se utiliza una calibración externa para realizar la cuantificación, se podría producir una subestimación de las concentraciones reales.

#### **4.11.7.3. Exactitud y precisión del método.**

En la Tabla 8 se muestran los valores de exactitud (recuperación absoluta) y precisión del método, expresados a través de la recuperación en porcentaje y desviación estándar relativa (RSD), respectivamente. Las recuperaciones absolutas entre el 43 y 60% para los estrógenos en agua potable y entre el 24 y 43% en agua residual, que se muestran en la Tabla 8, son comúnmente

obtenidas para técnicas de extracción basadas en el equilibrio, como ocurre en la técnica RDSE. De los resultados obtenidos en ambos tipos de muestras (agua potable y efluente) se observó que en el caso del efluente existió una disminución en la recuperación de todos los analitos, producto de la competencia entre los analitos y los componentes de la matriz por interactuar con los sitios activos de la fase sorbente, de esta forma la cantidad de estrógenos extraídos en efluente disminuye en comparación con la muestra de agua potable. Por otra parte la desviación estándar relativa en agua potable estuvo entre el 4 y 11%, y en el efluente entre el 4 y el 12%, se observó que la matriz influyó principalmente en la recuperación de los estrógenos y no en la precisión, siendo ambos intervalos de desviación estándar relativa aceptados para el nivel de concentración de trabajo ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), ya que según la ecuación de Horwitz [77] para metodologías aplicadas a muestras en concentraciones de  $40 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  los valores de RSD aceptados son de hasta un 52%. Al calcular la razón de Horwitz obtenida entre RSD experimental y RSD estimado de la ecuación de Horwitz, se obtienen valores entre 0,21 y 0,24 para todos los analitos, como el valor de “HorRat” o valor de la razón de Horwitz es menor a 1, se dice que los valores de RSD obtenidos experimentalmente fueron mejores de los esperados para el nivel de concentración evaluado.

#### **4.11.7.4. Límites de detección y cuantificación en agua residual.**

Los límites de detección y cuantificación del método para determinar estrógenos desde efluentes de agua residual se muestran en la Tabla 7, donde se puede observar que los límites de detección van desde 0,001 a  $0,012 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mientras que los límites de cuantificación van desde 0,004 a  $0,038 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En base a las concentraciones mínimas cuantificables podría ser posible detectar y cuantificar estrógenos en muestras de efluentes u otro tipo de muestra acuosa

medioambiental. Para estos tipos de matrices es necesario contar con métodos altamente sensibles puesto que debido al alto potencial endocrino que muestran estos compuestos, incluso al nivel de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  pueden causar impacto en los organismos expuestos a estrógenos.

Tabla 7. Figuras analíticas del método y efecto matriz (EM) en efluente de agua residual utilizando RDSE-e-DVB.

<b>Estrógeno</b>	Agua desionizada		Efluente de PTAR				
	Ecuación de calibración (n=5)	R <sup>2</sup>	Ecuación de calibración (n=5)	R <sup>2</sup>	LD (µg·L <sup>-1</sup> )	LC (µg·L <sup>-1</sup> )	EM (%)
<b>E3</b>	y=167030x-2811	0,999	y=128848x-238	0,990	0,012	0,038	-22,9
<b>16-OHE1</b>	y=160717x-3124	0,987	y=104741x+1032	0,995	0,003	0,009	-34,8
<b>E2</b>	y=324696x+508	0,990	y=251640x+411	0,998	0,004	0,012	-22,5
<b>EE2</b>	y=299301x-4266	0,989	y=206764x+3136	0,990	0,004	0,012	-30,9
<b>E1</b>	y=351485x-488	0,993	y=237965x+1758	0,998	0,003	0,010	-32,3
<b>4-OHE2</b>	y=268260x-28	0,989	y=154929x+89	0,990	0,010	0,032	-42,2
<b>2-OHE2</b>	y=357808x-129	0,994	y=257766x+75	0,990	0,007	0,020	-28,0
<b>4-OHE1</b>	y=284867x-137	0,990	y=168135x+486	0,990	0,002	0,006	-41,0
<b>2-OHE1</b>	y=224575x-3497	0,999	y=117664x+1805	0,998	0,001	0,004	-47,6

Tabla 8. Recuperación absoluta y repetibilidad del método (n=5) en muestras de agua potable y efluente.

<b>Estrógeno</b>	Agua potable enriquecida a 0,040 µg·L <sup>-1</sup>		Agua efluente enriquecida a 0,040 µg·L <sup>-1</sup>	
	Recuperación absoluta (%)	RSD (%)	Recuperación absoluta (%)	RSD (%)
<b>E3</b>	43	11	28	6
<b>16-OHE1</b>	60	1	24	7
<b>E2</b>	59	6	40	8
<b>EE2</b>	52	9	43	12
<b>E1</b>	60	9	24	5
<b>4-OHE2</b>	59	4	24	4
<b>2-OHE2</b>	49	6	28	5
<b>4-OHE1</b>	58	8	29	7
<b>2-OHE1</b>	50	6	28	5

Para mejorar la exactitud del método en ambos tipos de aguas se decidió realizar alternativamente un calibrado en matriz, de esta forma las recuperaciones quedan expresadas como recuperaciones relativas con valores cercanos al 100% como se muestra más adelante en la Tabla 9 y 10 para agua potable y residual, respectivamente. Se puede observar que realizando un calibrado en matriz las recuperaciones para la serie de compuestos estudiados van en entre el 85 y 119% en agua potable y entre el 88 y el 118% en efluente de PTAR, con valores de RSD entre el 2 y 15% y entre el 5 y 16% para agua potable y de efluente, respectivamente.

#### **4.11.8. Análisis de efluentes de aguas residuales de plantas de tratamiento La Farfana y El Trebal.**

En los efluentes analizados se logró detectar la presencia de 3 de los 9 estrógenos estudiados, correspondiente a E1, E2 y EE2, los cuales mediante el acoplamiento TOF/MS fueron determinados con un error de determinación de masas de 4,7, -5,3 y -6,6 ppm respectivamente. En el efluente de La Farfana se encontró E1, E2 y EE2, mientras que en el efluente de El Trebal se encontró E1 y EE2, como se muestra en los cromatogramas de las Figuras 38 y 39. En el efluente de La Farfana la concentración de E1 fue de  $0,012 \pm 0,003 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mientras que E2 y EE2 estuvieron bajo el límite de cuantificación del método. En el efluente de la PTAR El Trebal la concentración de E1 fue de  $0,013 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y EE2 estuvo bajo del límite de cuantificación al igual que en el efluente de la PTAR de La Farfana.

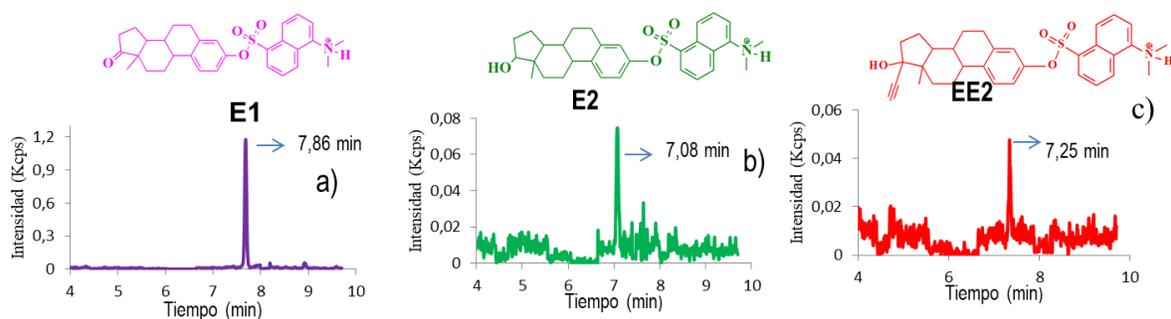


Figura 38. Cromatograma de los analitos E1, E2 y EE2, encontrados en el efluente La Farfana.

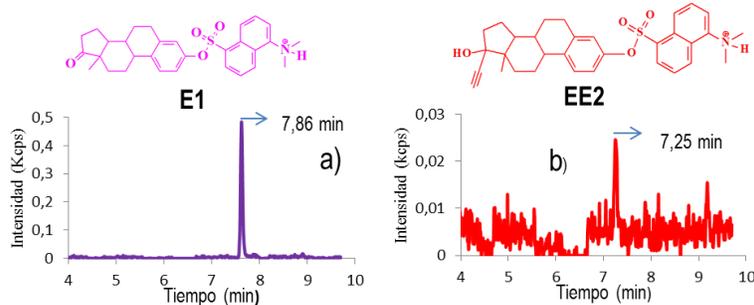


Figura 39. Cromatograma de los analitos E1 y EE2, encontrados en el efluente El Trebal.

Tabla 9. Concentración encontrada, recuperación y RSD para cada compuesto en agua potable tratada con metodología RDSE (e-DVB).

Estrógeno	Concentración	Adicionado		Adicionado	
	Encontrada ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	(0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )		(0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
	Muestra sin fortificar	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)
<b>E3</b>	< LD	96	10	99	8
<b>16-OHE1</b>	< LD	91	2	85	15
<b>E2</b>	< LD	107	10	94	8
<b>EE2</b>	< LD	119	13	102	4
<b>E1</b>	< LD	92	7	96	4
<b>4-OHE2</b>	< LD	117	5	107	7
<b>2-OHE2</b>	< LD	115	11	117	11
<b>4-OHE1</b>	< LD	97	13	103	15
<b>2-OHE1</b>	< LD	108	4	113	15

Tabla 10. Concentración encontrada, recuperación y RSD para cada compuesto en efluente tratado con metodología RDSE (e-DVB).

Estrógeno	Concentración	Adicionado (0,01 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )		Adicionado (0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	
	Encontrada ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)
<b>E3</b>	< LD	102	5	91	9
<b>16-OHE1</b>	< LD	111	16	102	13
<b>E2</b>	< LC	105	10	100	5
<b>EE2</b>	< LD	118	6	87	6
<b>E1</b>	0,012 $\pm$ 0,003 (LF) 0,013 $\pm$ 0,001 (ET)	104	14	97	10
<b>4-OHE2</b>	< LD	79	16	98	8
<b>2-OHE2</b>	< LD	88	10	89	6
<b>4-OHE1</b>	< LD	107	9	88	14
<b>2-OHE1</b>	< LD	86	16	105	11

#### 4.11.9. Extracción de estrógenos desde muestras de agua potable y efluente de agua residual utilizando SPE.

Para realizar una comparación experimental entre los resultados obtenidos con RDSE y una metodología de extracción de estrógenos utilizando SPE, se realizó la extracción de los 9 compuestos estudiados en muestras de agua potable y en un efluente de aguas residuales obtenidas desde plantas de tratamiento de aguas residuales utilizando SPE (C18). Se evaluó la linealidad, los límites de detección y cuantificación del método, el efecto matriz, la exactitud y precisión de esta metodología en las matrices antes señaladas. En la Tabla 11 se puede observar que la metodología SPE fue adecuada para la extracción de estrógenos desde muestras acuosas, mostrando una respuesta lineal entre 0,01 y 5,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  con valores de  $R^2$  mayores que 0,990 para agua potable y agua residual, con límites de detección entre 0,001 y 0,01  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y entre 0,02 y 0,017  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y límites de cuantificación entre 0,003 y 0,032  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y entre 0,006 y 0,058  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para agua potable y agua residual,

respectivamente. Valores que permiten detectar y cuantificar los estrógenos estudiados en el orden de concentración en que estos podrían ocasionar efectos importantes sobre microorganismos que se encuentren expuestos a estrógenos. En cuanto al efecto matriz en efluente de agua residual se obtuvieron valores que van entre el -60,5 al -84,2% (supresión), mientras que en agua potable el efecto matriz estuvo entre el -3,1 y el -7,9% (supresión) (Tabla 11). El alto efecto matriz en efluente de PTAR se debe a que SPE es una técnica exhaustiva que co-extrae gran parte de los interferentes solubles de la matriz, siendo esto una desventaja de las metodologías SPE, que en el caso de llevar etapas adicionales de lavado, podría generar pérdida de parte de los analitos retenidos en la fase sorbente, afectando a la sensibilidad de la metodología. SPE permitió obtener recuperaciones para todos los analitos entre el 87 y el 114 % en agua potable y entre el 85y 118% en efluente de agua residual, como se muestra en las Tablas 12 y 13. Esto debido a la forma de operación de la técnica SPE, donde todo el volumen de la muestra atraviesa el cartucho de extracción favoreciendo la interacción analito-sorbente haciéndola una técnica exhaustiva. En la muestra de efluente analizada por SPE-LC-TOF/MS se logró determinar E1 y E2 en la muestra de agua residual en concentraciones de  $0,007 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y de  $0,041 \pm 0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente, EE2 fue detectado pero su concentración estuvo bajo el límite de cuantificación de la metodología. En la Figura 40 se muestran los cromatogramas de los estrógenos encontrados en la muestra de efluente de la PTAR Mapocho-Trebal.

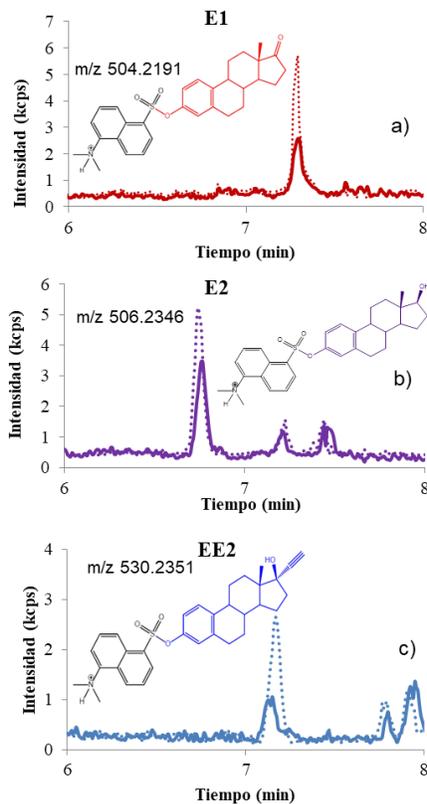


Figura 40. Cromatogramas del ion extraído (EIC) obtenido por LC-TOF/MS de los estrógenos encontrados en efluente de PTAR. E1=  $0,007 \pm 0,001 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , E2=  $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y EE2 < LC Mapocho-Trebal. Líneas punteadas corresponden a cromatogramas de la muestra fortificada a  $0,01 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y líneas continuas al cromatograma de la muestra.

Tabla 11. Figuras analíticas del método y efecto matriz (EM) en agua potable y en efluente de agua residual utilizando SPE C18.

Estrógeno	Agua potable					Efluente de PTAR				
	Ecuación de calibración (n=5)	R <sup>2</sup>	LD (µg·L <sup>-1</sup> )	LC (µg·L <sup>-1</sup> )	EM (%)	Ecuación de calibración (n=5)	R <sup>2</sup>	LD (µg·L <sup>-1</sup> )	LC (µg·L <sup>-1</sup> )	EM (%)
<b>E3</b>	y=1794571x-133558	0,999	0,002	0,006	-4,1	y=738807x-133074	0,995	0,004	0,012	-60,5
<b>16-OHE1</b>	y=2068666x-173550	0,999	0,002	0,007	-5,0	y=562227x-107755	0,990	0,004	0,013	-74,4
<b>E2</b>	y=3513474x-212032	0,998	0,001	0,003	-6,9	y=594641x+50626	0,995	0,002	0,006	-84,2
<b>EE2</b>	y=2310595x-142828	0,999	0,001	0,003	-4,3	y=458441x+58471	0,997	0,002	0,006	-81,0
<b>E1</b>	y=2801420x-115223	0,999	0,001	0,003	-3,1	y=733629x-74388	0,996	0,002	0,006	-74,6
<b>4-OHE2</b>	y=397628x-13144	0,999	0,005	0,016	-4,4	y=83499x-4636	0,996	0,008	0,026	-79,9
<b>2-OHE2</b>	y=1406450x-42239	0,999	0,002	0,007	-7,8	y=342868x-49102	0,990	0,003	0,009	-77,5
<b>4-OHE1</b>	y=490983x-34051	0,999	0,010	0,032	-7,9	y=105888x-14817	0,990	0,017	0,058	-80,1
<b>2-OHE1</b>	y=1849681x+50314	0,999	0,005	0,019	-4,2	y=526329x-36738	0,995	0,008	0,024	-72,7
<b>(20, 21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2</b>	y=2255966x-171380	0,999	0,001	0,003	-4,6	y=520586x+628	0,996	0,002	0,006	-77,9

Tabla 12. Concentración encontrada, valores de recuperación y RSD para cada compuesto en agua potable tratada con metodología SPE (C18).

Estrógeno	Conc. Encontrada	Adicionado (0,1 µgL <sup>-1</sup> )		Adicionado (1,0 µgL <sup>-1</sup> )		Adicionado (4,0 µgL <sup>-1</sup> )	
	(µg·L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)
<b>E3</b>	< LD	90	9,7	93	14	107	15
<b>16-OHE1</b>	< LD	104	16	98	9,7	110	10
<b>E2</b>	< LD	108	7,5	91	6,7	97	6,8
<b>EE2</b>	< LD	108	7,5	92	12	99	8,9
<b>E1</b>	< LD	93	5,5	90	7,3	106	14
<b>4-OHE2</b>	< LD	97	7,3	97	2,8	114	4,3
<b>2-OHE2</b>	< LD	107	16	99	8,9	92	6,3
<b>4-OHE1</b>	< LD	95	7,7	95	4,3	105	4,1
<b>2-OHE1</b>	< LD	98	11	108	8,1	86	4,5
<b>(20,21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2</b>	-	99	6,8	93	12	106	16

Tabla 13. Concentración encontrada, valores de recuperación y RSD para cada compuesto en efluente tratado con metodología SPE (C18).

Estrógeno	Conc. Encontrada	Adicionado (0,1 µgL <sup>-1</sup> )		Adicionado (1,0 µgL <sup>-1</sup> )		Adicionado (4,0 µgL <sup>-1</sup> )	
	(µg·L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)	Recuperación (%) (n=6)	RSD (%)
<b>E3</b>	< LD	98	15	98	15	100	11
<b>16-OHE1</b>	< LD	105	5,6	99	14	101	8,3
<b>E2</b>	0,041±0,010	118	7,4	115	7,3	99	4,7
<b>EE2</b>	< LD	103	13	115	15	99	4,7
<b>E1</b>	0,007±0,001	85	13	99	16	101	8,7
<b>4-OHE2</b>	< LD	103	12	104	11	93	9,6
<b>2-OHE2</b>	< LD	100	13	100	15	104	5,7
<b>4-OHE1</b>	< LD	100	15	100	11	98	9,2
<b>2-OHE1</b>	< LD	100	13	100	15	104	5,7
<b>(20,21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2</b>	-	108	5,4	107	5,3	98	5,3

#### **4.11.10. Comparación de las metodologías RDSE y SPE utilizadas para la determinación de estrógenos en muestras acuosas.**

En la Tabla 14, se muestran algunas metodologías SPE obtenidas desde bibliografía, para la determinación de estrógenos en aguas de río, afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, se puede observar que la metodología adaptada utilizando SPE C18 presenta límites de detección un orden de magnitud superior a las otras metodologías SPE, sin embargo también se puede observar que en estas metodologías se utilizan volúmenes de muestra de 1L con factores de concentración de 1000 a 2000 veces, utilizando 20 veces más volumen de muestra y factores de concentración entre 4 y 50 veces mayores que en la metodología SPE utilizada en este trabajo. Haciendo que por una parte se mejore la sensibilidad al utilizar mayor volumen de muestra pero otra parte se aumenta el tiempo de preparación por muestra, haciendo que la metodología se torne tediosa e incompatible con análisis de rutina, debido a los grandes volúmenes de muestra que se necesitan por cada muestra además del equipamiento necesario para poder realizar repeticiones o ensayos en serie. A pesar de que los factores de concentración son entre 2 y 100 veces más altos utilizando SPE respecto a RDSE, los límites de detección obtenidos no son más bajos en la misma magnitud, esto muestra que al utilizar grandes cantidades de volumen, también se co-extrae una mayor cantidad de interferentes produciendo que la señal analítica de los compuestos no se incremente en forma proporcional al volumen de muestra utilizado, también es posible que parte de los analitos no sea retenida en el cartucho utilizado, puesto que al pasar grandes volúmenes de muestra se podrían eluir parte de los compuestos de interés retenidos de los primeros volúmenes de muestra (efecto *breakthrough*), produciendo pérdidas en la sensibilidad y exactitud de la

metodología. RDSE se presenta como una técnica alternativa, económica, simple y con buenos niveles de sensibilidad, exactitud y precisión que gracias a la fase sorbente e-DVB utilizada en el disco rotatorio permitió extraer simultáneamente los EI, E2, y EE2, como también los principales metabolitos (hidroxilados) de características más polares ( $\text{Log } K_{O/W}$  2,4–2,7) que sus precursores, los cuales no han sido determinados en aguas residuales en investigaciones anteriores.

Tabla 14. Metodologías de determinación de estrógenos en muestras acuosas con SPE y RDSE.

<b>Estrógenos estudiados</b>	<b>Técnica e ionización (+/-)</b>	<b>Matriz y volumen de muestra (mL)</b>	<b>Factor concentración</b>	<b>Intervalo lineal (ng·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>LDM (ng·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ref.</b>
<b>E3, E2, <math>\alpha</math>-E2, EE2 y E1</b>	SPE-UHPLC-Q-TOF/MS (-)	Agua potable y agua de río 1000	2000	0,53 - 500	0,25-0,42	[5]
<b>E1, E2 y EE2</b>	SPE(Oasis HLB)-UHPLC-MS/MS (-)	Afluente y efluente 1000	1000	1000-200000	0,2-1,44 y 0,05-0,49	[28]
<b>E1, E2, EE2 y E3</b>	SPE(C18)-UHPLC-MS/MS (+)	Efluente 1000	12500	100-1000000	0,23-0,52	[42]
<b>E1, E2, EE2, E3, 2-OHE1, 4-OHE1, 16-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2</b>	RDSE(e-DVB)-LC-TOF/MS (+)	Efluente 25	125	5-100	1-12	Este trabajo
<b>E1, E2, EE2, E3, 2-OHE1, 4-OHE1, 16-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2</b>	SPE(C18)-LC-TOF/MS (+)	Efluente Agua potable 50	250	10-5000	2-17	Este Trabajo [78]

## 4.12. Desarrollo de metodologías de extracción y determinación de estrógenos desde leche.

### 4.12.1. Identificación de estrógenos por LC-MS/MS.

Para la identificación de los compuestos estudiados por LC-MS/MS se utilizó el mismo procedimiento de derivatización descrito anteriormente, utilizado para la determinación de estrógenos mediante LC-TOF/MS, en la Tabla 15, se muestran los parámetros utilizados para la cuantificación de los 9 estrógenos estudiados.

Tabla 15. Transiciones y energías de colisión utilizadas para la determinación de estrógenos por LC-MS/MS en modo positivo.

<b>Estrógeno</b>	<b>Precursor (<i>m/z</i>)</b>	<b>Producto (<i>m/z</i>)</b>	<b>Energía de colisión (V)</b>
<b>E3</b>	522,2	171,0	-35
<b>16-OHE1</b>	520,2	171,0	-35
<b>E2</b>	506,2	171,0	-35
<b>EE2</b>	530,2	171,0	-35
<b>E1</b>	504,2	171,0	-35
<b>4-OHE2</b>	378,1	171,0	-35
<b>2-OHE2</b>	378,1	171,0	-35
<b>4-OHE1</b>	377,1	171,0	-35
<b>2-OHE1</b>	377,1	171,0	-35

Se puede observar que todos los compuestos presentan el mismo ion producto, el cual se origina de la fragmentación de los grupos dansilo adheridos en las moléculas originales de cada estrógeno, con rompimiento entre el azufre y los anillos del grupo dansilo, como se ejemplifica para el compuesto dansilado de 2-OHE2, que se muestra en la Figura 41.

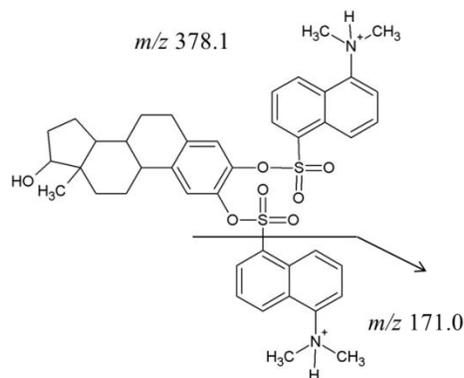


Figura 41. Estructura química de 2-OHE2 derivatizado con dos grupos dansilo y doblemente protonado  $[M+2H]^{2+}$   $m/z$  378,1, precursor  $m/z$  378,1 y el fragmento o ion producto  $m/z$  171,0.

Las transiciones  $753>170$  y  $755>170$  previamente reportadas para 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2, respectivamente, también fueron monitoreadas, sin embargo, las intensidades de estas señales fueron más bajas que las señales encontradas  $377,1>171$  y  $378,1>171$  para estos pares de isómeros, por lo que estas últimas señales fueron las seleccionadas para la determinación mediante LC-MS/MS de 2/4-OHE1 y 2/4-OHE2 en los estudios posteriores.

#### 4.12.2. Metodologías QuEChERS *d*-SPE para la extracción de estrógenos desde leche.

Las metodologías QuEChERS original, citrato y acetato desarrolladas originalmente para la determinación de pesticidas en alimentos, fueron aplicadas para la extracción de estrógenos en leche de bovino. Los primeros resultados mostraron que los estrógenos fueron extraídos, obteniendo recuperaciones que fueron desde el 80 al 138%, mostrando que la extracción con QuEChERS es viable para la determinación de los analitos desde leche. Sin embargo las metodologías establecidas no producen concentración de los analitos, debido a que estas metodologías fueron desarrolladas para determinar plaguicidas que se encontraban en altas concentraciones, prescindiendo de etapas de concentración. El desafío en aquellos casos era obtener extractos limpios y más diluidos, a diferencia de este caso donde los estrógenos están

presentes en concentraciones inferiores a los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y se hace necesario concentrar los analitos con la menor cantidad de interferentes posibles, es por esto que en primera instancia se decidió modificar la proporción entre muestra y acetonitrilo cambiando de la proporción 1:1 (5 mL de muestra y 5 mL de disolvente) a la proporción 2:1 (5 mL de muestra y 2,5 mL de disolvente), introduciendo un primer factor de concentración de 2. Al modificar las proporciones y evaluando nuevamente las metodologías, se determinó que la metodología QuEChERS citrato mostró las mejores recuperaciones, que estuvieron entre un 95 y 112% para todos los compuestos, como se muestra en la Figura 42.

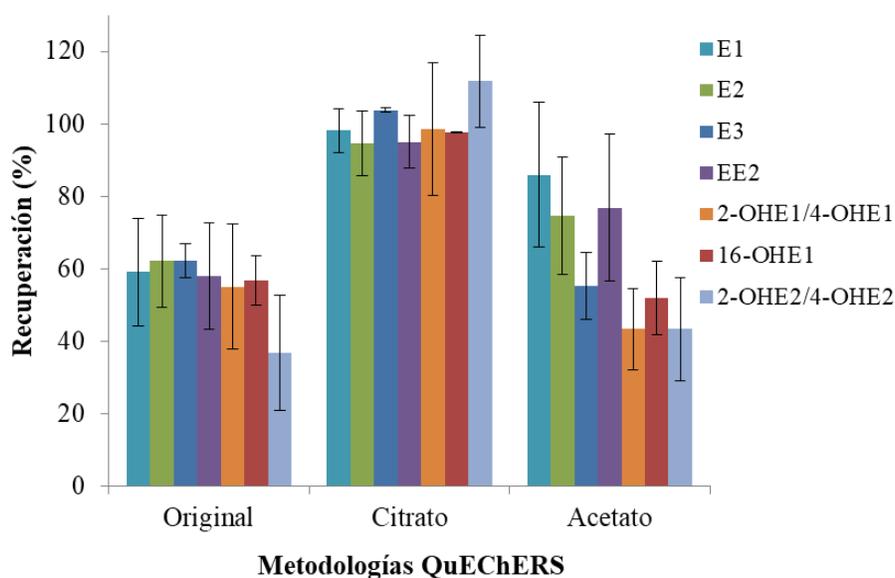


Figura 42. Comparación de metodologías QuEChERS para la extracción de estrógenos desde leche utilizando una proporción 2:1 entre la muestra y acetonitrilo en la extracción.

El uso de acetonitrilo en estas técnicas se debe a que favorece la precipitación de proteínas y por ser más eficiente en la extracción de los analitos que otros disolventes como acetona, acetato de etilo [51] y metanol [79], los cuales extraen estos compuestos con menor eficiencia y con más co-extractivos de

matriz. Al reducir el volumen de acetonitrilo se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para todos los compuestos, teniendo como principal ventaja la inclusión de una etapa de concentración en la extracción, además reduciendo el uso de disolventes orgánicos respecto a la metodología original. Se pudo observar que con la metodología QuEChERS citrato se obtuvieron mayores recuperaciones respecto a la metodología original y a la acetato, este efecto puede deberse al valor de pH 4,1 obtenido en la mezcla entre la muestra, las sales y el acetonitrilo, como también a la cantidad de sales utilizadas (total sales = 3,25 g) en comparación con las metodologías original y acetato, donde los valores de pH fueron de 5,4 (total sales= 2,5 g) y 5,3 (total sales = 2,5 g) respectivamente. Un pH más ácido favorece la precipitación de proteínas obteniéndose un extracto más limpio que interfiere en menor medida en la extracción y en la determinación, produciendo menor supresión de la señal en el espectrómetro de masas, por otra parte en la metodología citrato se utiliza una mayor cantidad de sales respecto a las otras dos metodologías, lo que favorece la partición por efecto “salting out”, además una mayor cantidad de sales favorece la separación de la fase acuosa de la fase orgánica, causando que los analitos migren hacia la fase de acetonitrilo aumentando la recuperación.

#### **4.12.3. Comparación en limpieza utilizando QuEChERS *d*-SPE y QuEChERS SPE.**

Debido a que una mejor limpieza del extracto puede generar una señal analítica mayor, se comparó la recuperación y la respuesta instrumental de la metodología de extracción con QuEChERS, utilizando como “clean up” dos metodologías diferentes, una utilizando *d*-SPE (PSA y MgSO<sub>4</sub>) y otra con SPE (sorbente HLB). Utilizando 1 mL de extracto, mediante el acoplamiento de QuEChERS/*d*-SPE y QuEChERS/SPE, las recuperaciones de los estrógenos estudiados estuvieron entre 95 y 112% y entre 84 y 107, respectivamente,

como se muestra en la Figura 43, con una diferencia solo para E3. Sin embargo, cuando se utilizó SPE como técnica de limpieza para el extracto obtenido de QuEChERS, las señales analíticas fueron entre 2 y 8 veces mayores que las obtenidas usando *d*-SPE a la misma concentración, como se muestra en la Figura 44, aunque puede haber una disminución en la recuperación de E3, la sensibilidad es mejor para todos los compuestos al usar SPE como técnica de limpieza. Por otro lado, con SPE es posible utilizar una mayor cantidad de extracto sin aumentar la cantidad de sorbente, pudiendo aumentar el factor de concentración de la metodología.

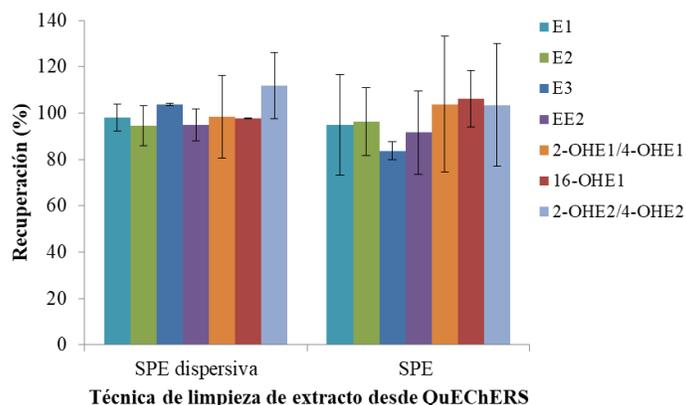


Figura 43. Recuperación de estrógenos desde 10 mL de leche utilizando QuEChERS citrato usando *d*-SPE y SPE para la limpieza, tomando 1 mL de extracto en ambos acoplamientos.

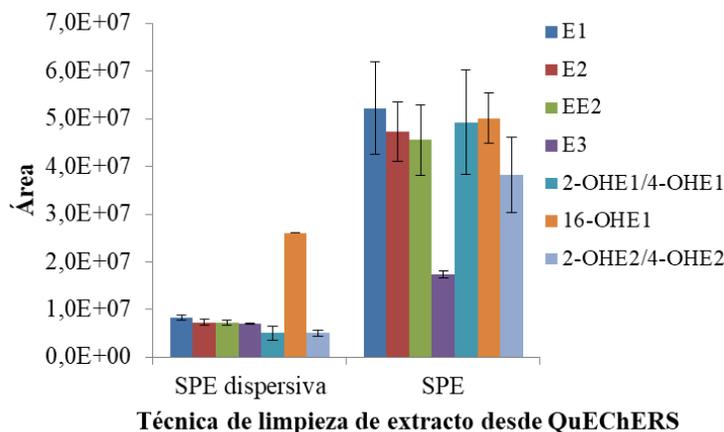


Figura 44. Intensidad de la señal de estrógenos desde 10 mL de leche extraídos utilizando QuEChERS citrato y limpieza usando *d*-SPE y SPE, tomando 1 mL de extracto en cada caso.

#### 4.12.4. Optimización de la metodología QuEChERS-SPE.

La técnica SPE se evaluó como una limpieza del extracto obtenido de QuEChERS porque además de posibilitar limpiar el extracto también permite concentrar los analitos simultáneamente, a diferencia de las metodologías en las que se usa *d*-SPE como limpieza no es posible concentrar los analitos. Como las concentraciones de estrógenos en la leche pueden ser inferiores a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , los estrógenos podrían no ser detectados sin una etapa de concentración. Cuando 1 mL de extracto obtenido de la extracción con QuEChERS se diluyó a 25 mL con agua y se cargó en SPE, las recuperaciones fluctuaron entre 84 y 107%, lo que muestra que la cantidad de acetonitrilo resultante en la solución final (4% v/v) no afecta en la extracción usando SPE. Luego, al aumentar el volumen de extracto a 2 y 4 mL, manteniendo el volumen de 25 mL de dilución, se obtuvieron recuperaciones entre 61 y el 107% y entre 58 y el 129%, respectivamente, disminuyendo solo las recuperaciones para los analitos menos polares como E1, E2 y EE2, sin embargo al utilizar 2 mL de extracto las intensidades de las señales aumentaron al doble respecto a utilizar 1 mL, mientras que para 4 mL de extracto las

recuperaciones disminuyeron ligeramente pero en este caso las señales analíticas no se incrementaron proporcionalmente al volumen de extracto, lo que muestra que existe un efecto de la matriz que afecta la posterior determinación de todos los analitos, por otra parte, el utilizar 4 mL de extracto resultó menos reproducible ya que se obtuvieron desviaciones cercanas al 30%, esto se debió a la dificultad de tomar solo la fase de acetonitrilo que contiene los analitos sin poder evitar que esta se mezcle con la fase acuosa saturada en sales, afectando en forma irregular en cada preparación. Se seleccionó utilizar 2 mL ya que resultó en un aumento de la sensibilidad por aumento en el factor de concentración respecto a tomar 1,0 mL de extracto, y semejante en intensidad a la obtenida al utilizar 4 mL, además 2 mL mostró una adecuada reproducibilidad con valores de RSD menores al 19%.

Para disminuir aún más el efecto aportado por la matriz aportado por grasas, sales y otros componentes de la matriz, se eluyó desde la columna SPE con acetonitrilo en concentraciones de 60, 80 y 100% (v/v). Los índices de polaridad para cada una de estas mezclas de acetonitrilo y agua fueron calculados mediante la Ecuación 9.

$$P'_{AB} = \emptyset_A P'_A + \emptyset_B P'_B$$

Ecuación 9.

Donde;  $P'_{AB}$  es el índice de la polaridad de la mezcla de los componentes A y B,  $P'_A$  y  $P'_B$  son los índices de polaridades de los disolventes puros A y B, respectivamente, mientras que  $\emptyset_A$  y  $\emptyset_B$  son las fracciones de los componentes A y B en la mezcla, respectivamente. Utilizando los índices de 10,2 para agua y 5,8 para acetonitrilo.

En las Figuras 45 y 46 se puede observar que al utilizar 1 mL de 100% acetonitrilo (índice de polaridad de 5,8) para eluir los compuestos desde SPE (HLB) se obtienen recuperaciones > 93,1% para los compuestos de menor

polaridad E1, E2, EE2 y 16-OHE1 ( $K_{O/W}$  3,4 – 4,2), mientras que para E3, 2-OHE2, 4-OHE2, 2-OHE1 y 4-OHE1 ( $K_{O/W}$  2,7 – 3,4) se presentaron recuperaciones entre el 62 y el 83%, esta diferencia en las recuperaciones se debe a la competencia existente entre el copolimero HLB y acetonitrilo por los estrógenos, donde los compuestos más apolares tienen mayor afinidad por acetonitrilo, sin embargo acetonitrilo puro no presenta la misma afinidad con los analitos de polaridad intermedia, necesitando aumentar levemente la polaridad para lograr desorber eficientemente los analitos semi-polares. Al utilizar acetonitrilo al 60% (índice de polaridad 7,6) la polaridad de la solución aumenta en un 31% respecto al acetonitrilo puro, sin embargo las recuperaciones estuvieron entre el 46 y el 83% para todos los compuestos aumentándose las recuperaciones para los analitos semi-polares y disminuyendo para los más apolares, mostrando un efecto más equilibrado al utilizar acetonitrilo al 80% (índice de polaridad 6,7), donde se obtuvieron recuperaciones entre el 73 y el 97%, que fueron el intervalo de recuperación más acotado para todos los analitos. Por otra parte se evaluaron las intensidades de las señales analíticas al eluir con cada mezcla anteriormente mencionada, donde al utilizar 60% acetonitrilo las señales analíticas fueron mayores para 4 de los 9 compuestos, lo que se explica por una elución selectiva a compuestos con polaridad intermedia, dejando retenido en la fase sorbente parte del contenido graso de la muestra que afecta a la posterior determinación, sin embargo tomando la condición óptima para el conjunto de analitos se decidió utilizar acetonitrilo al 80% (v/v) como disolvente para eluir los analitos desde la columna SPE, donde de igual forma se ve un incremento en las respuestas analíticas respecto a la utilización de acetonitrilo puro.

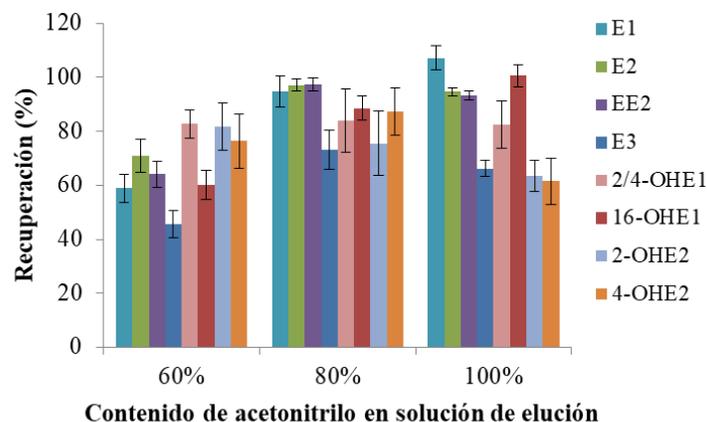


Figura 45. Recuperación de estrógenos eluyendo con diferentes proporciones de acetonitrilo desde columnas SPE (HLB).

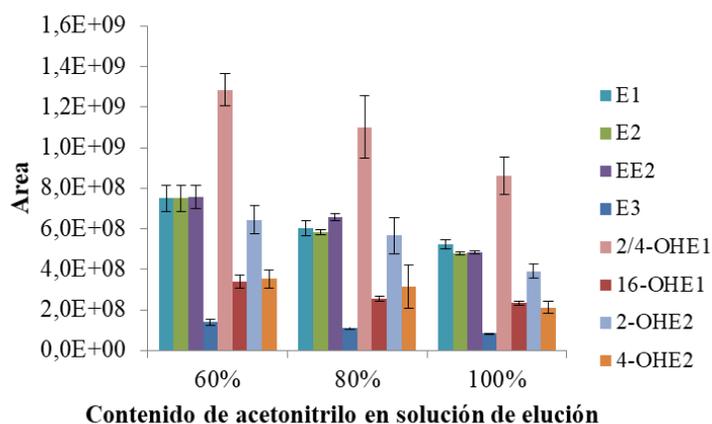


Figura 46. Comparación de la intensidad de la señal analítica obtenida utilizando diferentes proporciones de acetonitrilo en la elución de los estrógenos desde SPE (HLB).

#### 4.12.5. QuEChERS citrato-RDSE.

Al utilizar la técnica RDSE para concentrar y limpiar el extracto obtenido desde la extracción con QuEChERS utilizando 1 mL de extracto y diluido a 25 mL con agua, se logró recuperar los estrógenos entre el 15 y el 33% como se muestra en la Tabla 16, las bajas recuperaciones se pueden deber a que se agitó a 1600 rpm, ya que esta fue la velocidad máxima de agitación entregada por los agitadores que se tuvo disponibles, esta velocidad de agitación no

corresponde a la óptima utilizada cuando se ha utilizado RDSE para la extracción de diversos compuestos en muestras acuosas, puesto que 1600 rpm corresponde a poco más de la mitad de la velocidad óptima utilizada, por ejemplo en la determinación de antiinflamatorios no esteroideos desde aguas [80]. Además RDSE es una técnica basada en el equilibrio por lo que para este tipo de compuestos de mediana a baja polaridad, y en las concentraciones estudiadas ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) presenta un grado de solubilización en agua que a pesar de realizar una extracción con una fase sorbente con afinidad, parte de los estrógenos permanece en solución.

De las técnicas evaluadas, el acoplamiento que presentó mejores parámetros de recuperación y de concentración para todos los analitos fue QuEChERS-SPE, como se puede observar en la Tabla 16, las recuperaciones de este acoplamiento son similares frente a las obtenidas por QuEChERS-*d*-SPE, sin embargo el factor de enriquecimiento utilizando SPE como técnica de limpieza y concentración es 10 veces mayor al obtenido por *d*-SPE, debido a que utilizando SPE en la limpieza, es posible cargar un mayor volumen de muestra (2 mL) en comparación con *d*-SPE (200  $\mu\text{L}$ ), los que al ser eluidos, concentrados y derivatizados en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  aplica un factor de concentración de 20 veces al considerar la primera etapa de concentración producida en la extracción de 10 mL de leche a 5 mL de acetonitrilo.

Tabla 16. Recuperaciones y factores de enriquecimiento de estrógenos para cada metodología evaluada en leche a concentración de 25 µg·L<sup>-1</sup>.

Estrógeno	QuEChERS-citrato SPE (HLB)		QuEChERS-citrato <i>d</i> -SPE		QuEChERS-citrato RDSE e-DVB	
	Recuperación (%)	Factor enriq.	Recuperación (%)	Factor enriq.	Recuperación (%)	Factor enriq.
<b>E3</b>	84 ±4	16,8	104 ±1	2,1	17 ±3	5,1
<b>16-OHE1</b>	107 ±10	21,4	98 ±1	2,0	15 ±4	4,5
<b>E2</b>	96 ±13	19,2	95 ±9	1,9	33±3	9,9
<b>EE2</b>	92 ±16	18,4	95 ±7	1,9	31±4	9,3
<b>E1</b>	95 ±19	19,0	98 ±6	2,0	32 ±6	9,6
<b>4-OHE2</b>	104 ±10	20,8	112 ±6	2,2	29 ±8	8,7
<b>2-OHE2</b>	104 ±10	20,8	112 ±6	2,2	28 ±12	8,4
<b>2/4-OHE1</b>	104 ±11	20,8	99 ±9	2,0	21 ±10	6,3

#### 4.12.6. Validación de la técnica QuEChERS-SPE-LC-MS/MS.

En la Tabla 17 y 18, se muestran algunos parámetros analíticos obtenidos para la metodología optimizada y validada para la determinación de estrógenos en muestras de leche. La metodología mostró buenos niveles de linealidad y de sensibilidad, adecuados para la determinación de estrógenos en los niveles reportados en leche. Por otra parte las recuperaciones fueron cuantitativas para todos los compuestos con valores de RSD menores al 18%.

Por la complejidad de la matriz estudiada se pudo determinar que existe un efecto de supresión de la señal atribuida por el efecto de la matriz, estos valores fueron entre el 47 y el 87%, a pesar de que para algunos analitos como 16-OHE1 y E3, presentan los mayores efectos de matriz estos podrían ser igualmente cuantificados en concentraciones desde los 0,22 y 0,39 µgL<sup>-1</sup>, respectivamente, siendo estas concentraciones posibles de encontrar en leche al aplicar metodologías de hidrólisis que permitan llevar la totalidad de cada estrógeno a su forma libre.

Tabla 17. Curvas de calibración y límites de detección y cuantificación de la metodología propuesta QuEChERS-SPE- LC-MS/MS.

Estrógeno	Curva de calibración (n=6)	Coeficiente R <sup>2</sup>	LD	LC	Intervalo lineal
			(µg·L <sup>-1</sup> )	(µg·L <sup>-1</sup> )	(µg·L <sup>-1</sup> )
<b>E3</b>	y=193886x+2396774	0,993	0,10	0,39	2-60
<b>16-OHE1</b>	y=476687x+862269	0,997	0,06	0,22	2-60
<b>E2</b>	y=1598137x+771295	0,997	0,04	0,15	2-60
<b>EE2</b>	y=1746225x-3011067	0,996	0,02	0,07	2-60
<b>E1</b>	y=1212514x-1315221	0,997	0,02	0,05	2-60
<b>4-OHE2</b>	y=242083+705702	0,992	0,05	0,10	2-60
<b>2-OHE2</b>	y=813057+258590	0,998	0,07	0,16	2-60
<b>2/4-OHE1</b>	y=1441356x-117623	0,993	0,13	0,53	2-60

Tabla 18. Recuperación, RSD y efecto matriz en leche mediante QuEChERS-SPE-LC-MS.

Estrógeno	Concentración de fortificación				
	0,5 µg L <sup>-1</sup> (n=6)		2,0 µg L <sup>-1</sup> (n=6)		EM (%)
	Recuperación (%)	RSD (%)	Recuperación (%)	RSD (%)	
<b>E3</b>	116	12	90	18	84
<b>16-OHE1</b>	115	7	107	4	76
<b>E2</b>	123	13	113	16	70
<b>EE2</b>	107	12	113	16	66
<b>E1</b>	106	16	111	18	69
<b>4-OHE2</b>	107	17	112	11	47
<b>2-OHE2</b>	108	17	112	11	47
<b>2/4-OHE1</b>	115	7	107	17	60

En la Tabla 19, se muestran algunos parámetros importantes de metodologías en que se ha utilizado QuEChERS para la extracción de estrógenos desde leche, la metodología desarrollada en este trabajo mostró ser eficiente en la extracción y determinación de los 9 estrógenos estudiados en muestras de leche obteniendo límites de detección y cuantificación entre 0,02 y 0,13 µg·L<sup>-1</sup> y entre 0,05 and 0,53 µg·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Es importante destacar que en

la etapa de preparación de muestra, la metodología propuesta tiene factores de enriquecimiento más alto que las otras metodologías QuEChERS mostradas en la Tabla 19, mejorando los límites de detección y cuantificación de los compuestos E1, E2 y EE2 (valores entre 0,02-0,04 y 0,05-0,15  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente) comparados con los valores de límites de detección y cuantificación que van entre 0,28 y 0,33  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  y entre 0,92 y 1,1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  para E1, E2 y EE2, usando instrumentaciones, como UPLC-Q-TOF/MS [51], o valores similares comparados con 0,03-0,1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  y 0,1-0,4  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  usando analizador de triple cuadrupolo (QqQ) [79]. Por otra parte, la metodología presentada incorpora los metabolitos hidroxilados que en otras metodologías QuEChERS no fueron estudiados, además de disminuir las cantidades de reactivos y disolventes utilizadas, contribuyendo con las directrices de la química verde, sin afectar las recuperaciones de los compuestos estudiados, que fueron entre el 90 y el 123% evaluadas a dos niveles de concentración (0,5 y 2,0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### **4.12.7. Análisis de muestras reales de leche de bovino.**

De las muestras de bovino analizadas fue posible detectar la presencia solo de E1 en la muestra de leche proveniente de la vaca en gestación (7 meses) Figura 47, mientras que en la muestra de leche de vaca que no se encontraba en gestación no se logró detectar ningún analito. En la muestra que se detectó y cuantificó E1, la concentración fue de 0,094  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en su forma libre, concentración que podría corresponder al 10% del total de este compuesto en la muestra [22], puesto que el resto podría encontrarse en formas conjugadas y que sería necesario hidrolizar la muestra para cuantificar el contenido total.

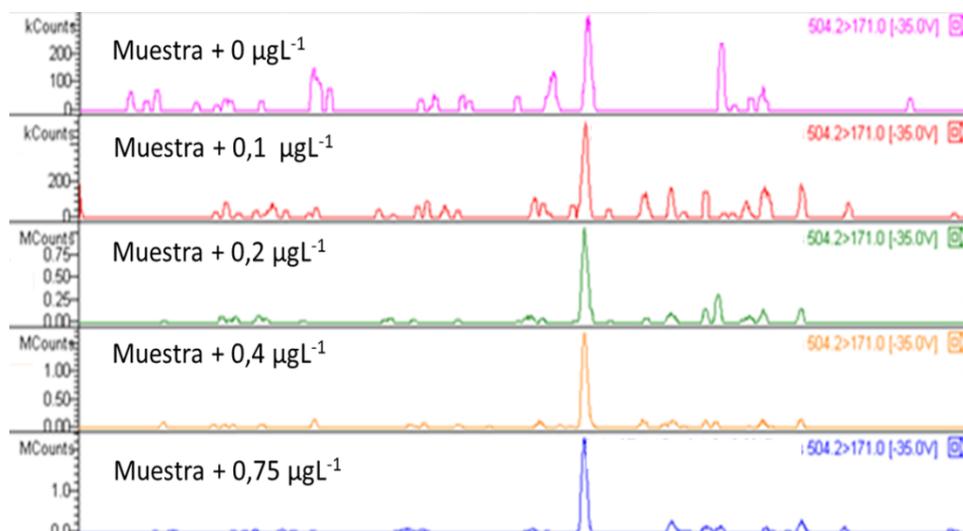


Figura 47. Cromatogramas de E1 en la muestra de leche analizada mediante adición de estándar.

Con estos resultados se genera la posibilidad de estudiar un mayor número de muestras de leche donde las vacas productoras se encuentren en distintas etapas de lactancia y gestación, de tal forma de poder determinar los periodos en que algunos estrógenos se elevan considerablemente y también analizar leches obtenidas desde supermercados y concluir si es que se están realizando malas prácticas agrícolas como la administración de estrógenos sintéticos, la utilización de estrógenos naturales para mejorar fertilidad sin esperar la depleción del compuesto antes de continuar con la extracción de leche, como también la extracción indiscriminada de leche sin respetar los periodos de gestación avanzada (> 7 meses).

Se aplicó la metodología de extracción a muestras adquiridas desde locales comerciales de Santiago, a las cuales se les realizó hidrólisis enzimática antes de la extracción para poder determinar el contenido total de estrógenos. Se pudo determinar E1 en una concentración de  $0,086 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en la muestra 1 y  $0,096$  en la muestra 3, mientras que en la muestra 2 se encontró  $1,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  E1. En la Figura 48 se muestra el cromatograma superpuesto obtenido de cada

muestra. Por otra parte en las mismas muestras analizadas sin la etapa de hidrólisis solo se detectó E1 en las muestras de leche 2 y 3, encontrándose en concentraciones bajo el límite de cuantificación.

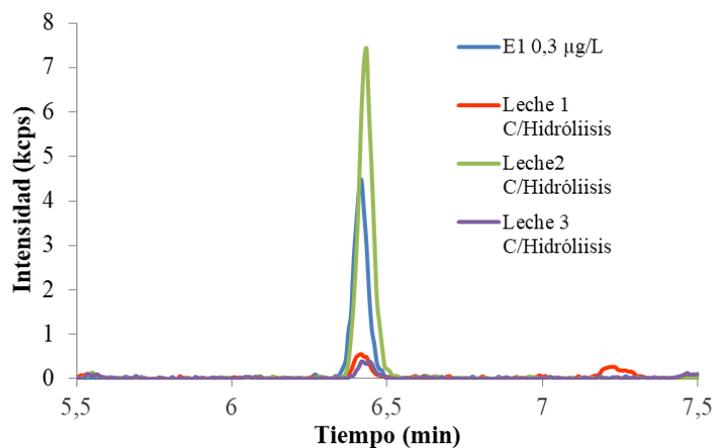


Figura 48. Cromatograma del ion extraído de E1  $m/z$  504,2191 luego de la hidrólisis enzimática en muestras de leche.

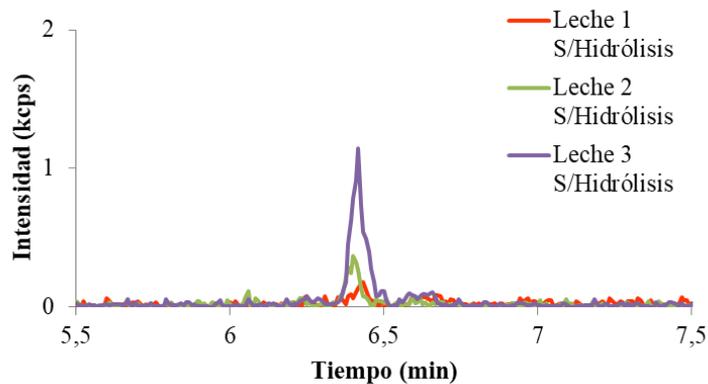


Figura 49. Cromatograma del ion extraído de E1  $m/z$  504,2191 sin hidrólisis enzimática en muestras de leche.

**Tabla 19.** Comparación con otras metodologías QuEChERS utilizadas para la determinación de estrógenos en leche de bovino.

<b>Estrógenos</b>	<b>Metodología</b>	<b>Instrumento</b>	<b>Factor de enriquecimiento</b>	<b>Hidrólisis enzimática</b>	<b>LD/LC (ppb)</b>	<b>Concentración encontrada (ppb)</b>	<b>Ref.</b>
<b>E1, E2 y E3</b>	QuEChERS citrato/d-SPE	UHPLC-Q-TOF/MS	2	No	0,28-0,33/ 0,92-1,1	N.D.	[51]
<b>E1, E2, EE2 y E3</b>	QuEChERS/d-SPE	UHPLC-MS/MS	4 – 6	No	0,03-0,1/ 0,1-0,4	E2 < LC	[79]
<b>E1, E2, EE2, E3, 2-OHE1, 4-OHE1, 16-OHE1 2-OHE2 y 4-OHE2</b>	QuEChERS citrato/SPE	HPLC-MS/MS LC-TOF/MS	18 – 25	No/Si	0,02-0,13/ 0,05-0,53	E1 libre = 0,094 En vaca 7 meses de gestación	Este trabajo

#### **4.13. Extracción de estrógenos desde muestras de orina.**

Se evaluó extraer los estrógenos directamente desde 25 mL de muestra de orina enriquecida con los analitos a una concentración de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , observándose que luego de la extracción por 60 min, la fase sorbente mostró una intensa coloración amarilla, producida por el componente urobilina que se encuentra presente en la orina, el cual se concentró en la fase sorbente e-DVB como se muestra en la Figura 49a), a modo de comparación en la Figura 49b) se puede ver la fase e-DVB previo a la extracción. Este componente de la matriz produjo un importante efecto de supresión, puesto que al momento de la determinación por LC-TOF/MS, no fue posible detectar las señales correspondientes a los estrógenos estudiados. El efecto de supresión se atribuyó a dos posibles casos, primero, a una derivatización no eficiente en presencia de los componentes aportados por la matriz, donde la urobilina se encuentra altamente concentrada en relación a los estrógenos estudiados, y podría consumir el agente derivatizante (cloruro de dansilo), ya que posee en su estructura química grupos funcionales amino e hidroxilos que pueden reaccionar con el derivatizante, y segundo, por una extracción poco eficiente debido a la competencia entre los estrógenos y los componentes de la matriz por los sitios activos de la fase sorbente. Para evaluar el primer caso, se realizaron extracciones sobre alícuotas de orina (blanco) no fortificada con los estrógenos, luego se realizó la desorción y se fortificó el extracto con los 9 estrógenos, a modo de asegurar su presencia y la de todos los componentes aportados por la matriz, a continuación se evaporó hasta sequedad, se derivatizó y se realizó la medición en el sistema LC-TOF/MS, donde nuevamente no se obtuvieron las señales de los compuestos estudiados. En base a los resultados se confirmó la existencia de un importante efecto matriz de supresión, lo que explicó la ausencia de señales aun cuando la extracción de estrógenos hubiera sido posible, por lo que se necesitó disminuir los

interferentes, ya sea diluyendo la muestra o agregando etapas de limpieza que los eliminen o reduzcan selectivamente, sin afectar la recuperación de los analitos de interés, permitiendo una adecuada derivatización y posterior determinación.

#### **4.13.1. Optimización de la metodología de extracción.**

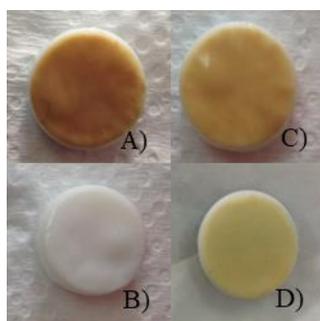
##### **4.13.1.1. Volumen de muestra.**

Al evaluar el volumen de muestra usando 1, 2, 5, 7,5 y 10 mL de orina diluidos a 25 mL con ácido ascórbico 0,05% p/v, se pudo observar que al utilizar 1, 2 y 5 mL de muestra se logró obtener señal analítica para los compuestos estudiados. Mientras que con 7,5 y 10 mL de muestra, no se logró obtener señales para los estrógenos, debido a la mayor concentración de interferentes. A pesar de que al utilizar un mayor volumen de muestra generalmente produce un aumento en la sensibilidad de la metodología, en orina la alta concentración de interferentes, principalmente la de urobilina produjo el efecto inverso. De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo determinar que es conveniente utilizar unos pocos mililitros de muestra de orina y diluirlos en un medio acuoso para la determinación de los estrógenos, adicionalmente, se contemplaron etapas de limpieza para disminuir la cantidad de urobilina co-extraída para mejorar la respuesta de los analitos.

##### **4.13.1.2. Clean up post extracción utilizando mezclas de metanol/agua.**

Al evaluar una limpieza utilizando mezclas de metanol/agua al 20 y 40% v/v para remover parte de los interferentes co-extraídos en la fase sorbente en forma previa a la desorción de los estrógenos, se observó que ambas mezclas ayudaron a disminuir la coloración amarilla en la fase e-DVB, en comparación a la desorción directa utilizando metanol sin diluir. En las Figuras 49c) y 49d) se muestra la diferencia en la coloración luego de la extracción desde 5 mL de orina diluida con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% sin limpieza post extracción y con

limpieza post extracción utilizando metanol al 20%, respectivamente. En cuanto a la utilización de soluciones al 20 y 40% metanol se observó que al utilizar la dilución de metanol al 20% v/v, se obtuvieron señales analíticas más intensas que al utilizar metanol al 40% v/v, debido a que al aumentar el contenido de metanol en la mezcla, la solución se torna más lipofílica, produciendo la elución desde el sorbente tanto de los interferentes como también de parte de los estrógenos. De esta forma, se determinó que para obtener un extracto reducido de interferentes es posible hacer una limpieza del sorbente e-DVB post extracción, introduciendo el disco rotatorio en 5 mL de metanol al 20% v/v y manteniéndolo en agitación a 2000 rpm por 5 min.



**Figura 50.** Disco rotatorio con fase sorbente e-DVB. A) Post extracción desde 25 mL de orina. B) fase sorbente previo a la extracción. C) utilizando 5 mL de orina diluidos con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% p/v y D) utilizando 5 mL de orina diluidos con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% p/v con clean up post extracción utilizando metanol al 20% v/v.

#### **4.13.1.3. Clean up simultáneo a la extracción.**

Alternativamente a la metodología de limpieza post extracción, se evaluó la utilización de sorbentes que pudieran extraer selectivamente los interferentes aportados por la orina en forma simultánea a la extracción de los estrógenos con RDSE. De los sorbentes evaluados, el sorbente carbón activado no fue adecuado para ser utilizado en forma dispersiva, ya que en medio acuoso no se distribuyó de forma homogénea, aglomerándose en la superficie de la solución,

produciendo una inadecuada interacción con los componentes de la muestra. Además, al momento de retirar el disco rotatorio desde la solución de extracción, el carbón activado se adhirió a la fase e-DVB, traspasándose y afectando a las siguientes etapas de la metodología, por lo que los ensayos realizados con este sorbente no fueron considerados. En la Figura 50 se observó que 100 mg del sorbente PSA fueron efectivos en la remoción de interferentes, y cuando se utilizaron 200 mg de PSA en vez de 100 mg de PSA, se obtuvieron señales más intensas para todos los analitos. Por otra parte cuando se utilizó la mezclas de sorbentes PSA/C18 prácticamente no se obtuvieron señales analíticas para la serie de estrógenos, mientras que con el sorbente florisil, se mejoró la respuesta respecto a no utilizar clean up, sin embargo las señales fueron menos intensas que al utilizar 100 y 200 mg de PSA.

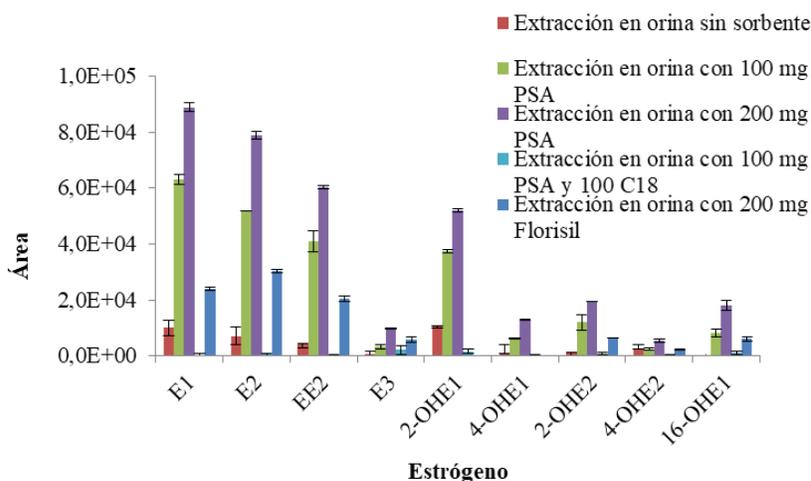


Figura 51. Comparación en la señal analítica sin clean up y utilizando PSA, mezclas PSA/C18 y florisil en clean up durante la extracción con RDSE (e-DVB).

La posibilidad de remover los interferentes de la muestra de orina usando PSA, se explica por las interacciones electroestáticas que tiene este sorbente con los interferentes polares de la muestra. La estructura de la urobilina que se muestra

en la Figura 51, contiene grupos hidroxilos que son desprotonados a pH en torno a 6, ya que los valores de pKa de estos grupos funcionales están en torno a 3,9, por lo que la urobilina se presenta cargada negativamente en el medio de extracción, presentando una alta polaridad una alta solubilidad en agua. Por otra parte, a pH 6 el sorbente PSA se encuentra protonado en la amina primaria como en la secundaria, adquiriendo cargas positivas, entonces, a través de las cargas negativas de la urobilina y las cargas positivas del PSA se produce la interacción electroestática que permite la retención de este interferente, sin embargo PSA no interactúa con los estrógenos ya que a pH 6 los estrógenos se encuentran en su forma neutra mostrando una polaridad intermedia a apolar, donde no se ve favorecida la interacción con PSA, pudiéndose limpiar selectivamente este interferente aportado por la matriz.

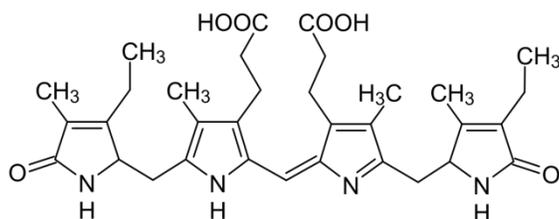


Figura 52. Estructura química de urobilina.

Por otra parte, la menor respuesta obtenida al utilizar la mezcla de PSA/C18 en el clean up se debió a que el sorbente C18 de características más apolares que PSA, removió interferentes apolares como también los estrógenos estudiados, por lo que C18 no fue adecuado para ser utilizado en el clean up en forma simultánea a la extracción para compuestos de mediana polaridad. La utilización de florisil logró reducir parte de los interferentes mostrando una mejora en la respuesta de los analitos sin embargo este sorbente correspondiente a un silicato de magnesio no presenta cargas que logren retener la urobilina como lo logra PSA.

Utilizando 200 mg de PSA, se evaluó aumentar en 1 mL el volumen de muestra, sin embargo se observó que se produce una disminución en la señal analítica para la mayoría de los compuestos con excepción de E3 y 16-OHE1, que muestran una leve mejora en la respuesta al aumentar el volumen de muestra. El efecto negativo se explica por la incapacidad de los 200 mg de PSA para remover con la misma eficiencia los interferentes de un mayor volumen de orina, produciendo que la derivatización y posterior determinación de los analitos se vea afectada por una mayor cantidad de interferentes como se muestra en la Figura 52. En la derivatización los analitos que se ven mayormente afectados por la presencia de interferentes son aquellos que necesitan dos moléculas de derivatizante por molécula de estrógeno, como lo son los catecol estrógenos, mientras que, los analitos que necesitan solo una molécula de derivatizante por molécula de estrógeno se ven menormente afectados, particularmente los de mayor polaridad como lo son E3 y 16-OHE1, este último efecto se debe a que estos analitos presentan mayor solubilidad en el medio de derivatización (polar) por lo que pueden interactuar de mejor forma que aquellos analitos de menor polaridad, y por lo tanto pueden ser derivatizados en forma más rápida favoreciendo la cantidad de moléculas derivatizadas en comparación con el resto de los estrógenos.

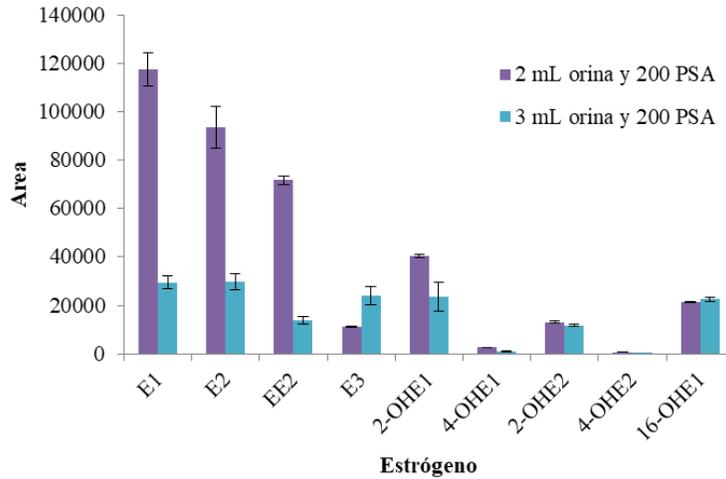


Figura 53. Comparación del volumen de muestra de orina utilizando 200 mg de PSA durante la extracción con RDSE (e-DVB).

Por otra parte al mantener el volumen de muestra y aumentar la cantidad de PSA se puede observar que se produce un aumento de la señal analítica, una cantidad de 300 mg de PSA fue seleccionada como la condición óptima, puesto que cantidades mayores elevan los costos de la metodología y también afectan a la rotación equilibrada del disco afectando a la reproducibilidad de la metodología. En la Figura 53 se puede observar como aumenta la señal analítica al utilizar una mayor cantidad de PSA durante la extracción de estrógenos con RDSE (e-DVB), mientras que en la Figura 54 se puede observar visualmente como se retiene la coloración amarilla en el sorbente PSA luego de la extracción.

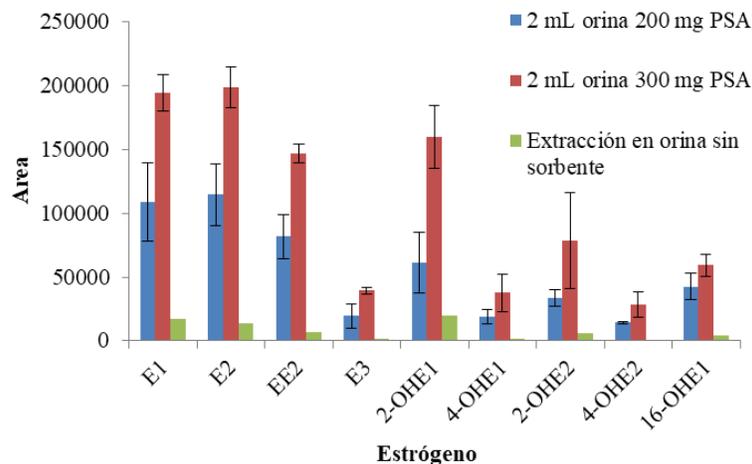


Figura 54. Extracción de estrógenos desde orina utilizando RDSE e-DVB y PSA en distintas cantidades.



Figura 55. PSA post extracción desde orina a la izquierda y antes de la extracción a la derecha.

#### 4.13.1.4. Evaluación de la pérdida de estrógenos durante el clean up con PSA.

Para verificar si PSA retuvo parte de los estrógenos en la limpieza simultánea a la extracción, se fortificó con los estrógenos una alícuota de ácido ascórbico 0,05% p/v (sin matriz orina) y se realizó la extracción con RDSE utilizando 300 mg de PSA durante la extracción, en forma paralela se realizó una extracción en otra alícuota fortificada con los estrógenos al mismo nivel de concentración pero sin la utilización de PSA, los resultados mostraron que las intensidades obtenidas para los 9 estrógenos fueron prácticamente iguales como se observa en la Figura 55, determinando que PSA no afecta en la extracción de los estrógenos, siendo un agente de limpieza adecuado para la extracción de estrógenos desde orina utilizando RDSE-e-DVB.

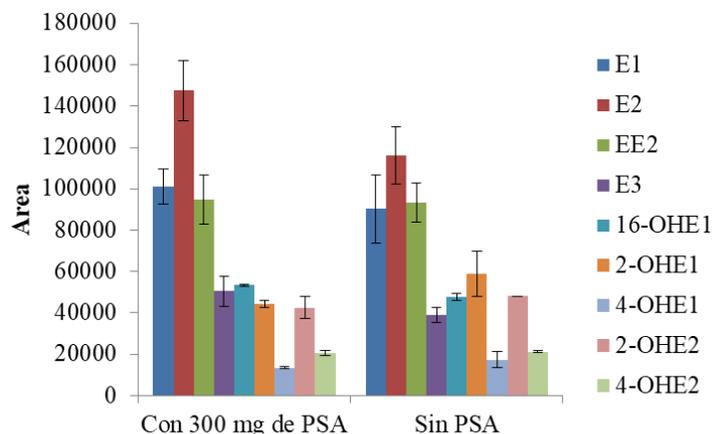


Figura 56. Extracción de estrógenos ( $1,0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) desde ácido ascórbico 0,05% con RDSE (e-DVB) con y sin PSA.

#### 4.13.1.5. Perfil de extracción.

El perfil de extracción realizado entre 15 y 120 min de extracción, mostró que existe un máximo de extracción en 60 min, luego de este tiempo la respuesta comienza a disminuir, este efecto se puede deber a que en este tiempo la extracción de los estrógenos comienza a llegar al equilibrio, mientras que la cantidad de interferentes que no logra extraerse en PSA permanece en solución y continua extrayéndose en la fase de e-DVB, produciendo un efecto de supresión de las señales analíticas en tiempos superiores a 60 min, como se muestra en la Figura 56. Por lo anterior se consideró como tiempo óptimo de extracción 60 min.

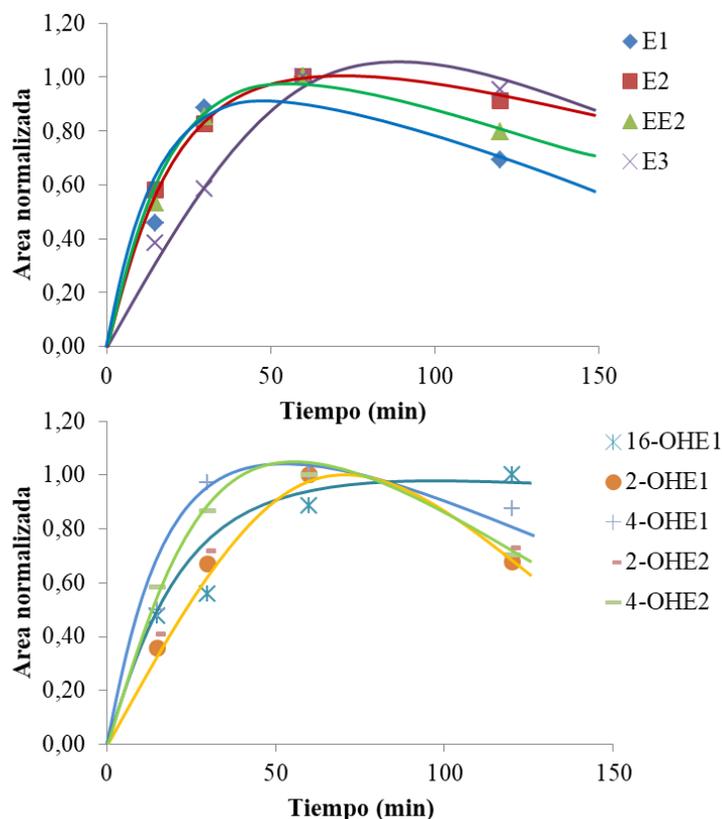


Figura 57. Perfil de extracción de estrógenos desde 2 mL de orina diluida con 20 mL de ácido ascórbico 0,05% p/v, utilizando RDSE-e-DVB y PSA.

#### 4.13.2. Validación de la metodología de extracción de estrógenos desde muestras de orina.

##### 4.13.2.1. Efecto matriz.

Al evaluar el efecto matriz por comparación de las pendientes obtenidas en disolvente y en extractos fortificados en concentraciones entre 5 y 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  utilizando RDSE-e-DVB y clean up con 300 mg de PSA, se pudo determinar que existe un efecto matriz que va desde el -23 al -42% (supresión de las señales), como se muestra en la Tabla 20. Estos valores de EM están responden a lo visualizado en la superficie de la fase sorbente de e-DVB luego de la extracción, donde persiste una leve coloración amarilla producto de la urobilina, aunque es extraída en menor cantidad, la cantidad remanente afecta en las etapas de

derivatización como de determinación a los estrógenos en los porcentajes mencionados.

Tabla 20. Comparación de pendiente y efecto matriz de los estrógenos en orina.

<b>Estrógeno</b>	<b>Pendiente disolvente</b>	<b>Pendiente matriz</b>	<b>EM (%)</b>
<b>E3</b>	1814	1053	-42
<b>16-OHE1</b>	2195	1360	-38
<b>E2</b>	5057	3076	-39
<b>EE2</b>	4316	2798	-35
<b>E1</b>	3612	2239	-38
<b>4-OHE2</b>	140	107	-24
<b>2-OHE2</b>	278	189	-32
<b>4-OHE1</b>	192	131	-32
<b>2-OHE1</b>	428	330	-23
<b>(20,21)<sup>13</sup>C<sub>2</sub> (EE2)</b>	4234	2649	-37

#### **4.13.2.2. Linealidad.**

Al evaluar la linealidad de la metodología de extracción en muestras de orina blanco enriquecidas entre 0,5 y 200  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se obtuvieron coeficientes de determinación ( $R^2$ ) entre 0,990 y 0,998, como se muestra en la Tabla 21, valores aceptables en consideración de la complejidad de la matriz y los niveles de concentración utilizados.

#### **4.13.2.3. Exactitud y precisión.**

Los resultados de exactitud y precisión de la metodología evaluada en las concentraciones de 0,5 y 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , se muestran en la Tabla 22, donde se puede observar que las recuperaciones estuvieron entre el 72 y 130%, mientras que la precisión expresada como desviación estándar relativa estuvo entre el 8,1 y el 17%.

Los valores de exactitud obtenidos fueron considerados adecuados considerando la complejidad de la matriz, mientras que la precisión con valores menores al

20% fueron considerados aceptable de acuerdo al nivel de concentración de evaluación de este parámetros.

#### 4.13.2.4. Límites de detección y cuantificación.

Los límites de cuantificación para los 9 estrógenos, fueron obtenidos a través de la mínima concentración de fortificación de una muestra de orina de niño pre púber (matriz blanco), donde los valores de exactitud (recuperación) estuvieron entre el 70 y 130%, con valores de desviación estándar relativa (RSD) menores al 20%. Los límites de detección fueron obtenidos al dividir por 3 los valores de los límites de cuantificación obtenidos para cada analito, los valores de los parámetros anteriormente mencionados para cada analito se muestran en la Tabla 22.

Tabla 21. Curvas de calibración, límites de detección y cuantificación de la metodología de extracción de estrógenos en orina.

<b>Estrógeno</b>	<b>Ecuación (n=6)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LD (µg/L)</b>	<b>LC (µg/L)</b>
<b>E3</b>	y = 6097x-7465	0,998	0,10	0,30
<b>16-OHE1</b>	y = 8260x-21049	0,992	0,10	0,30
<b>E2</b>	y= 15692x-29372	0,996	0,10	0,30
<b>EE2</b>	y = 14867x-24218	0,997	0,10	0,30
<b>E1</b>	y= 17103x-29133	0,997	0,10	0,30
<b>4-OHE2</b>	y = 1103x-1738	0,990	0,13	0,50
<b>2-OHE2</b>	y = 3025x+2916	0,998	0,13	0,50
<b>4-OHE1</b>	y= 1104x+1286	0,996	0,13	0,50
<b>2-OHE1</b>	y = 4920x+7953	0,998	0,13	0,50
<b>(20,21)<sup>13</sup>C<sub>2</sub> EE2</b>	y = 15573x-35510	0,992	-	-

Tabla 22. Valores de recuperación y de RSD de la metodología de extracción de estrógenos en orina a dos niveles de concentración.

<b>Estrógeno</b>	<b>0,5 µg/L</b> (n=4)	<b>RSD</b> (n=4)	<b>10 µg/L</b> (n=4)	<b>RSD</b> (n=4)
<b>E3</b>	88	12	105	17
<b>16-OHE1</b>	86	8,3	105	11
<b>E2</b>	72	9,5	103	16
<b>EE2</b>	106	16	103	12
<b>E1</b>	76	12	98	8,1
<b>4-OHE2</b>	103	12	112	13
<b>2-OHE2</b>	130	17	106	11
<b>4-OHE1</b>	114	16	113	11
<b>2-OHE1</b>	122	17	102	12

#### **4.13.2.5. Determinación de estrógenos libres, conjugados y totales aplicando hidrólisis enzimática.**

Se aplicó la metodología de hidrólisis enzimática a muestras de orina de un hombre de 29 años, una mujer de 29 años que no consume estrógenos, dos mujeres embarazadas con 27 y 28 semanas de gestación, una mujer de 35 años que consume anticonceptivos con EE2 como principio activo y mujer de 53 años en periodo de menopausia. Todas las personas que aportaron con muestras de orina para este estudio se encontraban en buen estado de salud al momento de la donación. En la Tabla 23, se muestran las concentraciones encontradas para cada muestra analizada.

Tabla 23. Concentraciones ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de estrógenos libres, totales y conjugados en muestras analizadas.

Estrógeno	Hombre 29 años			Mujer 29 años			Mujer 35 años			Mujer 53 años		
	S/H Libres	C/H-S/H Conj.	C/H Tot.	S/H Libres	C/H-S/H Conj.	C/H Tot.	S/H Libres	C/H-S/H Conj.	C/H Tot.	S/H Libres	C/H-S/H Conj.	C/H Tot.
<b>E3</b>	1,8	1,1	2,8	1,9	11,1	12,9	ND	29,2	29,2	ND	ND	ND
<b>16-OHE1</b>	ND	2,4	2,4	ND	10,0	10,0	ND	32,9	32,9	ND	ND	ND
<b>E2</b>	ND	4,6	4,6	0,9	16,3	17,3	ND	25,7	25,7	7,1	8,0	15,1
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6,7	6,7	ND	ND	ND
<b>E1</b>	1,7	3,7	5,4	1,9	51,3	53,2	ND	276	276	5,2	22,6	27,9
<b>4-OHE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>2-OHE2</b>	ND	ND	ND	ND	2,2	2,2	ND	12,7	12,7	ND	ND	ND
<b>4-OHE1</b>	ND	2,1	2,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>2-OHE1</b>	1,8	0,5	2,3	1,9	9,5	11,4	ND	15,3	15,3	ND	ND	ND
<b>Total</b>	<b>5,3</b>	<b>14,4</b>	<b>19,6</b>	<b>6,6</b>	<b>100</b>	<b>107</b>	<b>-</b>	<b>399</b>	<b>399</b>	<b>12,3</b>	<b>30,6</b>	<b>43,0</b>

<i>Continuación</i>	Embarazada 28 semanas			Embarazada 27 semanas BS		
Estrógeno	S/H Libres	C/H-S/H Conj.	C/H Tot.	S/H Libres	C/H-S/H Conj.	C/H Tot.
<b>E3</b>	2,5	604	607	73,1	1542	1615
<b>16-OHE1</b>	1,9	236	238	16,3	257	273
<b>E2</b>	1,8	85,2	87,0	8,3	260	268
<b>EE2</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<b>E1</b>	2,9	389	392	25,2	315	340
<b>4-OHE2</b>	ND	2,0	2,0	ND	ND	ND
<b>2-OHE2</b>	ND	5,8	5,8	4,4	5,5	9,9
<b>4-OHE1</b>	1,7	5,1	6,8	4,6	10,1	14,7
<b>2-OHE1</b>	1,8	72,0	73,8	10,4	54,6	65,0
<b>Total</b>	<b>12,7</b>	<b>1328</b>	<b>1412</b>	<b>142</b>	<b>2444</b>	<b>2586</b>

(S/H: Sin hidrólisis enzimática; C/H: Con hidrólisis enzimática)

#### **4.13.2.6. Comparación de la cantidad de estrógenos libres y conjugados en las muestras analizadas.**

De la Tabla 23 se puede observar que los estrógenos que se encontraron con mayor frecuencia fueron E1 y E2, encontrándose en el 100% de las muestras analizadas, E3, 2-OHE1 y 16-OHE1 se encontraron en el 83% de las muestras analizadas, sin embargo estuvieron ausentes en las muestras pertenecientes a la mujer de 52 años, en periodo de menopausia. Por otra parte, 4-OHE2 y EE2 fueron los que se encontraron con menor frecuencia, solo en el 17% de las muestras. 4-OHE2 es uno de los metabolitos de E2 que se ha relacionado con el desarrollo de cáncer [12], en las muestras analizadas, este fue detectado con menor frecuencia, posiblemente a que la ruta metabólica de E2 que podría ir dirigida hacia otras formas hidroxiladas como 2-OHE2, o también 4-OHE2 podría haber sido metabolizado, obteniendo finalmente 4-metoxiestradiol producto de la metilación de uno los grupos hidroxilos de 4-OHE2, siendo estas formas inertes o incluso protectoras para el organismo frente al desarrollo de enfermedades cancerosas. Por su parte, EE2 por ser un estrógeno sintético que es utilizado como activo de métodos anticonceptivos, no debería estar presentes en el organismo de las personas que no lo utilizan, salvo a que sea por algún tipo de contaminación. De las muestras analizadas EE2 solo fue encontrado en la muestra de orina de la mujer de 35 años, la cual se administra este estrógeno sintético en píldoras anticonceptivas, sin embargo este estrógeno solo fue detectado luego de someter la muestra de orina al tratamiento enzimático, reflejando que este analito también es metabolizado por el organismo en sus formas conjugadas, para ser eliminado a través de la orina, mientras que en su forma libre los residuos de EE2 podrían encontrarse en concentraciones bajo el límite de detección de la metodología. En cuanto a la cantidad de estrógenos en las muestras de orina, el estrógeno que se detectó en mayor concentración fue

E3, en concentraciones totales que van desde 2,8 hasta los 1615,4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , donde las menores concentraciones encontradas estuvieron en las muestras de orina de hombre de 29 años, mientras que las mayores concentraciones fueron encontradas en muestras de mujeres embarazadas de 27 y 28 semanas de gestación. La concentración encontradas de E3 en orina de hombre fue 4,6 veces menor que la encontrada en una mujer de la misma edad no gestante, mientras que en su forma libre la concentración fue de 1,76 y 1,85  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para hombre y mujer, respectivamente, siendo la forma conjugada en la que se aprecia una mayor diferencia entre ambos sexos, donde la concentración encontrada del estrógeno E3 conjugado fue 10,4 veces mayor en orina de mujer que en la de hombre. El porcentaje de conjugación resultó ser distinto en ambas muestras comparadas, ya que la cantidad de E3 que se encontró en la muestra de hombre correspondió en un 62,2 y 37,8%, en su forma libre y conjugada, respectivamente, mientras que en la muestra de mujer se encontró en el 14,3 y 85,7%, respectivamente. En la mujer de 35 años la concentración de E3 fue de 29,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , encontrándose solo luego de la hidrólisis enzimática, mientras que en la muestra de la mujer menopáusica no se logró detectar este analito, la mujer de 35 años presentó una concentración de E3 2,3 veces mayor que la mujer de 29 años, siendo esta diferencia normal entre distintas muestras de orina de mujer. En contraste, la ausencia de este estrógeno en muestras de mujer de 52 años de debe a su condición de menopáusica, donde es conocido que los niveles hormonales disminuyen considerablemente (alrededor del 90%) debido a la atrofia del útero[12], produciendo una serie de síntomas propios del climaterio. De los estrógenos detectados, E3 fue el estrógeno que presentó la mayor diferencia de concentraciones, produciéndose entre la mujer menopáusica y las mujeres en etapa de gestación. En otras investigaciones E3 en hombres se ha encontrado en concentraciones entre 1,0 y 16,4  $\mu\text{g}/24\text{h}$  [11], considerando que

una persona excreta aproximadamente 2 L de orina al día podríamos estimar que la concentración de E3 en orina de hombre está entre 0,5 y 8,2  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . En este trabajo en hombre se encontró una cantidad de 2,83  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor que se asemeja con los valores previamente reportados. Por otra parte, en mujeres, E3 ha sido encontrado en concentraciones de 720  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en orina de mujer de aproximadamente 32 semanas de gestación [81], sin embargo en esta investigación se encontraron valores más altos, siendo estos entre 12,94 y 1615,96  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , donde los mayores valores fueron encontrados en mujeres con 27 y 28 semanas de gestación. E1 fue encontrado en concentraciones totales de 5,4 - 53,2 - 276,8 - 27,9 - 391,6 - 339,9  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en muestras de hombre de 29 años, mujer de 29 años, mujer de 35 años, mujer menopáusica y mujeres embarazadas de 28 y 27 semanas de gestación, respectivamente, se puede observar que la orina de hombre contiene aproximadamente 10 veces menos que la cantidad de E1 encontrada en orina de una mujer de la misma edad, por otra parte E1 se encontró 5,2 veces más en la mujer de 35 años que en la mujer de 29 años. La menor concentración de E1 se encontró en la mujer menopáusica, esto debido a que al igual que E3, E1 es producido en el útero, el cual por su estado menopáusico disminuye la producción de estos compuestos. Un caso totalmente opuesto fueron las muestras de mujeres embarazadas donde se encontraron las mayores concentraciones de estrógenos, E1 hasta 392  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , siendo entre 1,4 y 7,4 veces mayor la concentración en orina respecto a las otras muestras analizadas de mujeres pre menopáusicas. En la Figura 57 se puede apreciar las cantidades de E1 encontradas en cada muestra analizada, tanto en su forma libre como conjugada. Estos valores de E1 son similares a los encontrados en muestras de orina de mujeres embarazadas con aproximadamente 33 semanas de gestación donde se encontraron concentraciones entre 328 y 580  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [81,82]. En todas las muestras de orina en que se encontró E1, sobre el 68% correspondió

a las formas conjugadas de E1. El comportamiento de E2 fue similar al de E1, aunque las concentraciones encontradas en las muestras analizadas estuvieron entre 4,6 y 268  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , donde también se encontró E2 predominantemente en su forma conjugada, estando entre el 53 y el 100% de las concentraciones encontradas en estas formas. Lo anterior muestra la importancia de realizar el tratamiento enzimático a las muestras debido a que se puede estimar la cantidad total de estrógenos en las distintas muestras. Los gráficos del resto de los analitos en cuanto a la proporción libre y conjugada encontrada se puede observar en las Figuras A33-A40.

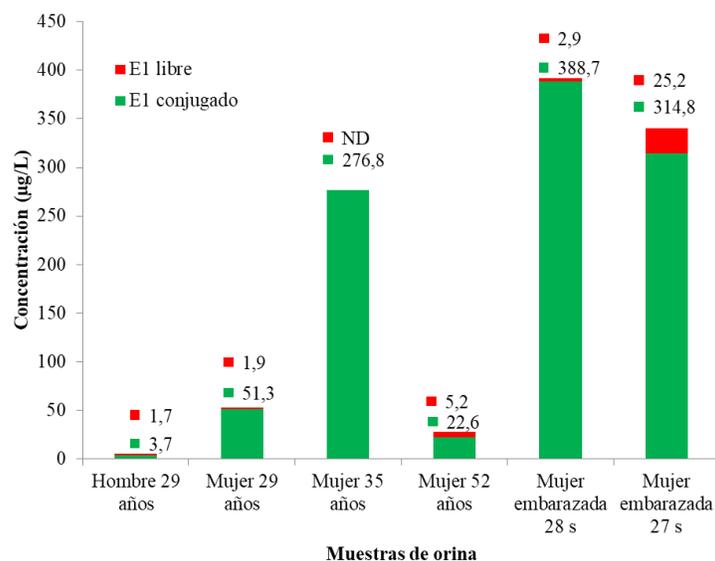


Figura 58. Concentraciones encontradas de E1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

El método desarrollado utilizando la técnica RDSE con e-DVB y limpieza simultánea con PSA en modo d-SPE, fue adecuado para la determinación de la cantidad total de estrógenos en muestras de orina, presentando límites de detección y cuantificación adecuados respecto a la concentración que estos compuestos se encuentran en personas de distintas edades, género y estados de salud como embarazo o en climaterio. Por otra parte la determinación mediante

LC-TOF/MS permitió determinar estos compuestos con la selectividad adecuada para diferenciar cada estrógeno como también los metabolitos hidroxilados. Estos últimos correspondientes a la forma de metabolización mayormente relacionada con enfermedades en humanos y animales, otra ventaja del acoplamiento TOF/MS es que permite buscar otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra que no fueron monitoreados durante la cromatografía, sin embargo la información espectral queda disponible para análisis posteriores como lo que ocurre para otras formas de metabolización de estrógenos como la generación de cada compuesto metilado (formas menos activas) en los grupos OH. Mediante el cálculo de la masa molecular exacta de cada uno de los posibles compuestos es posible realizar la búsqueda antes mencionada, donde a modo de ejemplo se muestra en las Figuras 58 y 59 los compuestos 4-metoxiestradiol y 2-metoxiestradiol con  $m/z$  535,2392, como también el compuesto 2-metoxiestrona con  $m/z$  533,2220, todos derivatizados con cloruro de dansilo y detectados según la forma  $[M+H]^+$ . Sin embargo para poder cuantificar estos compuestos es necesario disponer de los respectivos estándares analíticos.

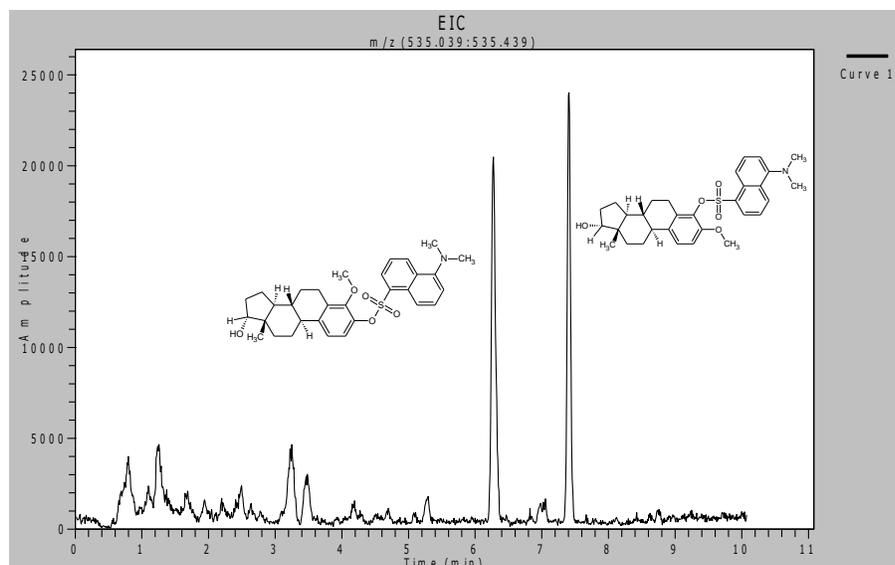


Figura 59. Cromatograma del ion extraído para  $m/z$  535,2392, correspondiente a la señal del metabolito 4-metoxiestradiol derivatizado, mediante análisis no dirigido obtenido desde muestra de mujer embarazada con 27 semanas de gestación.

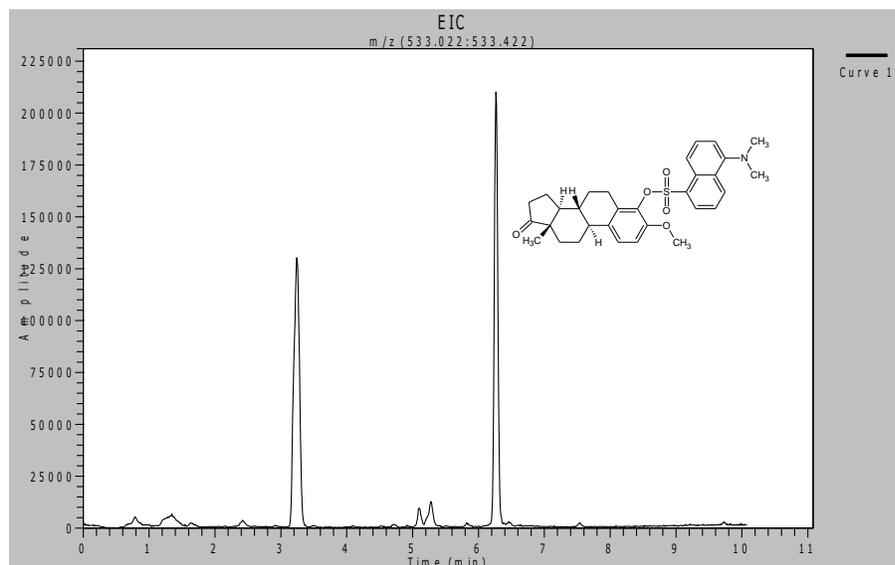


Figura 60. Cromatograma del ion extraído para  $m/z$  533,2220, correspondiente a la señal del metabolito 2-metoxiestrona derivatizado, mediante análisis no dirigido obtenido desde muestra de mujer embarazada con 27 semanas de gestación.

## 5. CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una metodología analítica para la medición de 8 estrógenos naturales y 1 sintético simple, rápida y con buenos niveles de linealidad y sensibilidad, mediante espectrometría de masas. Se obtuvieron las señales  $m/z$  377,1362, 377,1362, 378,1436 y 378,1438 para 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 y 4-OHE2, respectivamente, correspondiente a la forma  $[M+2H]^{2+}$  no reportadas con anterioridad, las cuales mostraron ser más abundantes que las señales reportadas para estos mismos compuestos en la forma  $[M+H]^+$ , de esta forma se mejoró considerablemente la sensibilidad en la detección de los catecol estrógenos, aspecto importante considerando que estos son los compuestos más estrechamente relacionados con el desarrollo de los distintos tipos de cánceres, los cuales dependiendo de la matriz pueden encontrarse en concentraciones desde el orden de los  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La técnica RDSE con la fase sorbente e-DVB permitió extraer y pre concentrar estrógenos desde muestras de alta complejidad como efluentes de aguas residuales, pudiéndose detectar E1, E2 y EE2 en efluentes de plantas de tratamiento en concentraciones trazas, pudiendo cuantificar E1 en concentraciones de 12 y 13  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en los efluentes analizados. Las propiedades analíticas del método desarrollado fueron similares a los obtenidos al utilizar una técnica altamente desarrollada como SPE, donde figuras analíticas como; exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación fueron del mismo orden.

Por otra parte RDSE no fue la técnica que presentó mejores resultados para ser utilizada en la extracción de estrógenos desde muestras de leche, debido al alto contenido de grasas que contiene la muestra. La metodología QuEChERS citrato fue eficiente en la extracción de estrógenos desde leche, mientras que la técnica

SPE (HLB) utilizada en el clean up, fue la más eficiente en cuanto limpieza del extracto obtenido y capacidad de concentrar los analitos, otorgando la sensibilidad necesaria para la determinación de estrógenos en leche.

Por otra parte se logró desarrollar una metodología de extracción de estrógenos desde orina utilizando RDSE e-DVB, logrando reducir los interferentes principalmente polares que se co-extraen desde la orina con el sorbente PSA, pudiendo cuantificar estrógenos en orina desde  $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

En las muestras de leche y orina, los estrógenos se encontraron principalmente en las formas conjugadas menos activas (glucurónidos y sulfatos de estrógenos), siendo necesario aplicar una metodología de hidrólisis enzimática previa a la extracción con QuEChERS y RDSE, en muestras de leche y de orina respectivamente, para dar cuenta de la totalidad de este tipo de compuestos.

La espectrometría de masas fue una herramienta fundamental para el análisis de estrógenos en muestras complejas, presentando buena selectividad y sensibilidad tanto al utilizar analizadores de triple cuadrupolo como de tiempo de vuelo. Por otra parte el analizador TOF permitió detectar la presencia de otro tipo de metabolitos de estrógenos presentes en muestras de orina analizadas, dando la proyección de abarcar mas productos de metabolización de estrógenos a modo de poder hacer un perfil completo de la ruta metabólica en el organismo.

Finalmente, se puede concluir que existe presencia de estrógenos en aguas residuales de la Región Metropolitana y biológicas como en leche, aunque en ambos casos las concentraciones son bajas (trazas), estos podrían estar provocando daños al medio ambiente puesto que son la familia de compuestos químicos con mayor potencial endocrino encontrados en el medio ambiente.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] K. Kozłowska-Tylingo, J. Namieśnik, T. Górecki, Determination of Estrogenic Endocrine Disruptors in Environmental Samples—A Review of Chromatographic Methods, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 40 (2010) 194–201. doi:10.1080/10408347.2010.490488.
- [2] Q. Gao, D. Luo, M. Bai, Z.-W. Chen, Y.-Q. Feng, Rapid determination of estrogens in milk samples based on magnetite nanoparticles/polypyrrole magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 8543–8549. doi:10.1021/jf201372r.
- [3] A. Khedr, A.M. Alahdal, Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis of ten estrogen metabolites at sub-picogram levels in breast cancer women, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1031 (2016) 181–188. doi:10.1016/j.jchromb.2016.07.051.
- [4] H.-X. Wang, Y. Zhou, Q.-W. Jiang, Simultaneous Analysis of Nine Estrogens in Milk Powder with Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry, *Chinese J. Anal. Chem.* 39 (2011) 1323–1328. doi:10.1016/S1872-2040(10)60469-0.
- [5] H.X. Wang, Y. Zhou, Q.W. Jiang, Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry, *Microchem. J.* 100 (2012) 83–94. doi:10.1016/j.microc.2011.09.010.
- [6] P.B. DeLaune, P.A. Moore, 17 $\beta$ -Estradiol in Runoff As Affected By Various Poultry Litter Application Strategies, *Sci. Total Environ.* 444 (2013) 26–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.11.054.
- [7] T.Y. Fang, S.M. Praveena, C. deBurbure, A.Z. Aris, S.N.S. Ismail, I. Rasdi, Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - A review, *Chemosphere.* 165 (2016) 358–368. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.09.051.
- [8] H.C. Chen, H.W. Kuo, W.H. Ding, Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction, *Chemosphere*. 74 (2009) 508–514. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.09.089.
- [9] Z. hua Liu, G. ning Lu, H. Yin, Z. Dang, H. Littier, Y. Liu, Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 149–164. doi:10.1016/j.trac.2014.09.003.
- [10] F. Qin, Y.Y. Zhao, M.B. Sawyer, X.-F. Li, Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water., *Anal. Chim. Acta.* 627 (2008) 91–8. doi:10.1016/j.aca.2008.07.036.
- [11] J. Robles, J. Marcos, N. Renau, L. Garrostas, J. Segura, R. Ventura, B. Barceló, A. Barceló, O.J. Pozo, Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta*. 169 (2017) 20–29. doi:10.1016/j.talanta.2017.03.032.
- [12] J. Huang, J. Sun, Y. Chen, Y. Song, L. Dong, Q. Zhan, R. Zhang, Z. Abliz, Analysis of multiplex endogenous estrogen metabolites in human urine using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A case study for breast cancer, *Anal. Chim. Acta.* 711 (2012) 60–68. doi:10.1016/j.aca.2011.10.058.
- [13] S. Reddy, C.R. Iden, B.J. Brownawell, Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 7032–7038. doi:10.1021/ac050699x.
- [14] M. Kuster, M. José López De Alda, D. Barceló, Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 790–798. doi:10.1016/j.trac.2004.08.007.
- [15] Y. Corrotea, N. Aguilera, L. Honda, P. Richter, Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry[1] Y. Corrotea, N. Aguilera, L. Honda, P. Richter, Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction a, *Anal. Lett.* 2719 (2015) 1344–1358.

doi:10.1080/00032719.2015.1098653.

- [16] B. Huang, B. Wang, D. Ren, W. Jin, J. Liu, J. Peng, X. Pan, Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake catchment, China, *Environ. Int.* 59 (2013) 262–273. doi:10.1016/j.envint.2013.06.018.
- [17] I.-C. Beck, R. Bruhn, J. Gandrass, W. Ruck, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea, *J. Chromatogr. A.* 1090 (2005) 98–106. doi:10.1016/j.chroma.2005.07.013.
- [18] Y. Shahbazi, H. Malekinejad, H. Tajik, Determination of naturally occurring estrogenic hormones in cow's and river buffalo's meat by HPLC-FLD method, *J. Food Drug Anal.* 24 (2016) 457–463. doi:10.1016/j.jfda.2016.02.014.
- [19] B. Socas-Rodríguez, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, A. V. Herrera-Herrera, M. ángel Rodríguez-Delgado, Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 44 (2013) 58–77. doi:10.1016/j.trac.2012.10.013.
- [20] D.W. Farlow, X. Xu, T.D. Veenstra, Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 1327–1334. doi:10.1016/j.jchromb.2009.01.032.
- [21] B. Socas-Rodríguez, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, Hollow-fiber liquid-phase microextraction for the determination of natural and synthetic estrogens in milk samples, *J. Chromatogr. A.* 1313 (2013) 175–184. doi:10.1016/j.chroma.2013.05.028.
- [22] H. Malekinejad, P. Scherpenisse, A.A. Bergwerff, Naturally occurring estrogens in processed milk and in raw milk (from gestated cows), *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9785–9791. doi:10.1021/jf061972e.
- [23] X. Xu, F. Liang, J. Shi, X. Zhao, Z. Liu, L. Wu, Y. Song, H. Zhang, Z. Wang, Determination of hormones in milk by hollow fiber-based stirring extraction bar liquid-liquid microextraction gas chromatography mass

- spectrometry, *Anal. Chim. Acta.* 790 (2013) 39–46. doi:10.1016/j.aca.2013.06.035.
- [24] Y. Yang, B. Shao, J. Zhang, Y. Wu, H. Duan, Determination of the residues of 50 anabolic hormones in muscle, milk and liver by very-high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877 (2009) 489–496. doi:10.1016/j.jchromb.2008.12.054.
- [25] C. Farke, E. Rattenberger, S.U. Roiger, H.H.D. Meyer, Bovine colostrum: determination of naturally occurring steroid hormones by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)., *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1423–1427. doi:10.1021/jf103751z.
- [26] A. Shareef, M.J. Angove, J.D. Wells, Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradi, *J. Chromatogr. A.* 1108 (2006) 121–128. doi:10.1016/j.chroma.2005.12.098.
- [27] M.J. López De Alda, D. Barceló, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 892 (2000) 391–406. doi:10.1016/S0021-9673(00)00068-6.
- [28] S. Liu, G.-G. Ying, J.-L. Zhao, F. Chen, B. Yang, L.-J. Zhou, H.-J. Lai, Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry., *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 1367–1378. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.014.
- [29] P. Labadie, E.M. Hill, Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1141 (2007) 174–181. doi:10.1016/j.chroma.2006.12.045.
- [30] W. Yan, L. Zhao, Q. Feng, Y. Wei, J.-M. Lin, Simultaneous Determination of Ten Estrogens and their Metabolites in Waters by Improved Two-Step

SPE Followed by LC–MS, *Chromatographia*. 69 (2009) 621–628. doi:10.1365/s10337-009-0957-7.

- [31] S. Barreca, M. Busetto, L. Colzani, L. Clerici, D. Daverio, P. Dellavedova, S. Balzamo, E. Calabretta, V. Ubaldi, Determination of estrogenic endocrine disruptors in water at sub-ng L<sup>-1</sup> levels in compliance with Decision 2015/495/EU using offline-online solid phase extraction concentration coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Microchem. J.* 147 (2019) 1186–1191. doi:10.1016/j.microc.2019.04.030.
- [32] A. Salvador, C. Moretton, A. Piram, R. Faure, On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants, *J. Chromatogr. A.* 1145 (2007) 102–109. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.055.
- [33] X. Li, A.A. Franke, Improved profiling of estrogen metabolites by orbitrap LC/MS, *Steroids*. 99 (2014) 84–90. doi:10.1016/j.steroids.2014.12.005.
- [34] G.-W. Lien, C.-Y. Chen, G.-S. Wang, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations., *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 956–66. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.023.
- [35] A. Khedr, A.M. Alahdal, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis of ten estrogen metabolites at sub-picogram levels in breast cancer women, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1031 (2016) 181–188. doi:10.1016/j.jchromb.2016.07.051.
- [36] X. Xu, T.D. Veenstra, S.D. Fox, J.M. Roman, H.J. Issaq, R. Falk, J.E. Saavedra, L.K. Keefer, R.G. Ziegler, Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chem.* 77 (2005) 6646–6654. doi:10.1021/ac050697c.
- [37] X. Xu, L.K. Keefer, R.G. Ziegler, T.D. Veenstra, A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitative analysis of

- urinary endogenous estrogen metabolites., *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1350–1355. doi:10.1038/nprot.2007.176.
- [38] H. Tomšíková, J. AUFARTOVÁ, P. Solich, L. Nováková, Z. Sosa-Ferrera, J.J. Santana-Rodríguez, High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 34 (2012) 35–57. doi:10.1016/j.trac.2011.11.008.
- [39] U. Bussy, Y.W. Chung-Davidson, T.J. Buchinger, K. Li, W. Li, High-sensitivity determination of estrogens in fish plasma using chemical derivatization upstream UHPLC–MSMS, *Steroids.* 123 (2017) 13–19. doi:10.1016/j.steroids.2017.04.003.
- [40] M.S. Ferreira, A.M.M. Arruda, G.T. Pepi, A.C. Martho, P.M. Maximiano, L.S.O.B.O. Ricci, M.F. Riccio, A.C. Noboli, P. Serafim, High sensitivity method validated to quantify estradiol in human plasma by LC–MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1064 (2017) 109–114. doi:10.1016/j.jchromb.2017.09.005.
- [41] H.J. Huang, P.H. Chiang, S.H. Chen, Quantitative analysis of estrogens and estrogen metabolites in endogenous MCF-7 breast cancer cells by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879 (2011) 1748–1756. doi:10.1016/j.jchromb.2011.04.020.
- [42] G.W. Lien, C.Y. Chen, G.S. Wang, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 956–966. doi:10.1016/j.chroma.2008.12.023.
- [43] L.P. and K.P.-T. Szabolcs Szarka, Vien Nguyen, NIH Public Access, 72 (2011) 181–204. doi:10.1038/nature13314.A.
- [44] M.R. Anari, R. Bakhtiar, B. Zhu, S. Huskey, R.B. Franklin, D.C. Evans, Derivatization of ethinylestradiol with dansyl chloride to enhance electrospray ionization: Application in trace analysis of ethinylestradiol in rhesus monkey plasma, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4136–4144. doi:10.1021/ac025712h.

- [45] M. Adeel, X. Song, Y. Wang, D. Francis, Y. Yang, Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review, *Environ. Int.* 99 (2016) 107–119. doi:10.1016/j.envint.2016.12.010.
- [46] H. Lan, N. Gan, D. Pan, F. Hu, T. Li, N. Long, L. Qiao, An automated solid-phase microextraction method based on magnetic molecularly imprinted polymer as fiber coating for detection of trace estrogens in milk powder, *J. Chromatogr. A.* 1331 (2014) 10–18. doi:10.1016/j.chroma.2014.01.016.
- [47] G. Gao, S. Li, S. Li, Y. Wang, P. Zhao, X. Zhang, X. Hou, A combination of computational–experimental study on metal-organic frameworks MIL-53(Al) as sorbent for simultaneous determination of estrogens and glucocorticoids in water and urine samples by dispersive micro-solid-phase extraction coupled to UPLC-MS/MS, *Talanta.* 180 (2018) 358–367. doi:10.1016/j.talanta.2017.12.071.
- [48] H. Liu, L. Qiao, N. Gan, S. Lin, Y. Cao, F. Hu, J. Wang, Y. Chen, Electro-deposited poly-luminol molecularly imprinted polymer coating on carboxyl graphene for stir bar sorptive extraction of estrogens in milk, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1027 (2016) 50–56. doi:10.1016/j.jchromb.2016.05.022.
- [49] Y. Hu, Y. Fan, G. Li, Preparation and evaluation of a porous monolithic capillary column for microextraction of estrogens from urine and milk samples online coupled to high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A.* 1228 (2012) 205–212. doi:10.1016/j.chroma.2011.08.057.
- [50] S.C. Fleck, N.C. Twaddle, M.I. Churchwell, D.R. Doerge, P. Pande, J.G. Teeguarden, Comparative estrogenicity of endogenous, environmental and dietary estrogens in pregnant women I: Serum levels, variability and the basis for urinary biomonitoring of serum estrogenicity, *Food Chem. Toxicol.* 115 (2018) 511–522. doi:10.1016/j.fct.2018.03.017.
- [51] X. Tan, Z. Li, L. Deng, S. Zhao, M. Wang, Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS, *J. Integr. Agric.* 15 (2016) 2163–2174. doi:10.1016/S2095-3119(16)61386-2.

- [52] C. Blasco, C. Van Poucke, C. Van Peteghem, Analysis of meat samples for anabolic steroids residues by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1154 (2007) 230–239. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.090.
- [53] L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn, Polydimethylsiloxane rod extraction, a novel technique for the determination of organic micropollutants in water samples by thermal desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1025 (2004) 17–26. doi:10.1016/j.chroma.2003.08.058.
- [54] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747. doi:10.1002/(sici)1520-667x(1999)11:10<737::aid-mcs7>3.0.co;2-4.
- [55] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1303–1311. doi:10.1016/j.jpba.2006.02.037.
- [56] X. Huang, D. Yuan, B. Huang, Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection, *Talanta.* 75 (2008) 172–177. doi:10.1016/j.talanta.2007.10.052.
- [57] A. Stopforth, B. V. Burger, A.M. Crouch, P. Sandra, The analysis of estrone and 17 $\beta$ -estradiol by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 856 (2007) 156–164. doi:10.1016/j.jchromb.2007.05.025.
- [58] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.051.

- [59] P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepúlveda, Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8598–8602. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.044.
- [60] J. Raba, H. a Mottola, Continuous-flow/stopped-flow system incorporating two rotating bioreactors in tandem: application to the determination of alkaline phosphatase activity in serum., *Anal. Chem.* 66 (1994) 1485–1489.
- [61] P. Richter, B. López Ruiz, M. Sánchez-Cabezudo, H. Mottola, Immobilized enzyme reactors. Diffusion/convection, kinetics, and a comparison of packed-column and rotating bioreactors for use in continuous-flow systems, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1701–1705. doi:10.1021/ac950910c.
- [62] F.F. Donato, N.M.G. Bandeira, G.C. dos Santos, O.D. Prestes, M.B. Adaime, R. Zanella, Evaluation of the rotating disk sorptive extraction technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1516 (2017) 54–63. doi:10.1016/j.chroma.2017.08.025.
- [63] H.M. Mohamed, Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 66 (2015) 176–192. doi:10.1016/j.trac.2014.11.010.
- [64] V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter, Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction, *Talanta.* 128 (2014) 486–492.
- [65] V. Manzo, M. Miró, P. Richter, Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine, *J. Chromatogr. A.* 1368 (2014) 64–69. doi:10.1016/j.chroma.2014.09.079.
- [66] A. Cañas, S. Valdebenito, P. Richter, A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma Microextraction Techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2205–2210. doi:10.1007/s00216-014-7628-8.

- [67] L. Jachero, B. Sepúlveda, I. Ahumada, E. Fuentes, P. Richter, Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7711–7716. doi:10.1007/s00216-012-6679-y.
- [68] V. Manzo, O. Navarro, L. Honda, K. Sánchez, M.I. Toral, P. Richter, Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction, *Talanta*. 106 (2013) 305–308.
- [69] P. Richter, A. Cañas, C. Muñoz, C. Leiva, I. Ahumada, Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry, *Anal. Chim. Acta.* 695 (2011) 73–76. doi:10.1016/j.aca.2011.04.009.
- [70] Y. Corrotea, K. Sánchez, M.A. Rubio, P. Richter, Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons From Water Samples Into a Rotating-Disk Microextractor and the Subsequent Determination By Gas, 2 (2014) 2477–2480.
- [71] M. Becerra-Herrera, L. Honda, P. Richter, Ultra-high-performance liquid chromatography-Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater, *J. Chromatogr. A.* 1423 (2015) 96–103.
- [72] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. Schenck, Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [73] S.J. Lehotay, K. Maštovská, A.R. Lightfield, Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables, *J. AOAC Int.* 88 (2005) 615–629.
- [74] E. Fuentes, M.E. Báez, J. Díaz, Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil, *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) 8859–8866. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.082.

- [75] T. Benijts, R. Dams, W. Günther, W. Lambert, A. De Leenheer, Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1358–1364. doi:10.1002/rcm.716.
- [76] P. Dwivedi, X. Zhou, T.G. Powell, A.M. Calafat, X. Ye, Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers, *Chemosphere.* 199 (2018) 256–262. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.01.177.
- [77] W. Horwitz, R. Albert, The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1095–1109.
- [78] L. Honda, M. Becerra-herrera, P. Richter, Liquid chromatography – time-of-flight high-resolution mass spectrometry study and determination of the dansylated products of estrogens and their hydroxylated metabolites in water and wastewater, (2018).
- [79] H. Liu, T. Lin, X. Cheng, N. Li, L. Wang, Q. Li, Simultaneous determination of anabolic steroids and  $\beta$ -agonists in milk by QuEChERS and ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 1043 (2016) 176–186. doi:10.1016/j.jchromb.2016.08.016.
- [80] V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter, Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction, *Talanta.* 128 (2014) 486–492. doi:10.1016/j.talanta.2014.06.003.
- [81] H.L. de Oliveira, L.S. Teixeira, L.A.F. Dinali, B.C. Pires, N.S. Simões, K.B. Borges, Microextraction by packed sorbent using a new restricted molecularly imprinted polymer for the determination of estrogens from human urine samples, *Microchem. J.* 150 (2019) 104162. doi:10.1016/j.microc.2019.104162.

- [82] S.N. do Carmo, J. Merib, E. Carasek, Bract as a novel extraction phase in thin-film SPME combined with 96-well plate system for the high-throughput determination of estrogens in human urine by liquid chromatography coupled to fluorescence detection, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1118–1119 (2019) 17–24. doi:10.1016/j.jchromb.2019.04.037.

## 7. ANEXO

Tabla A1. Polímeros sintéticos evaluados en RDSE.

Polímeros sintéticos	Monómero	Entrecruzador* (%)	Iniciador (%)	Cantidad de disolvente (mL)
1	Vinilpirrolidona	300	3	10
2	Vinilpirrolidona	175	2	6
3	Vinilpirrolidona	50	1	10
4	1-vinilimidazol	50	3	10
5	1 vinilimidazol	300	3	10
6	1 vinilimidazol	175	2	6
7	Acilamida	50	1	10
8	Acilamida	300	1	10
9	Acilamida	175	2	6

(\* ) % Respecto a la cantidad en mol del monómero utilizado en la síntesis.

Tabla A2. Concentración de derivatizante en diseño Doehlert, valores codificados y valores naturales.

Factor experimental	-1	-0,5	0	0,5	1
Concentración derivatizante (mg/mL)	0,1	0,33	0,55	0,88	1

Tabla A3. Tiempo de derivatización en diseño Doehlert, valores codificados y valores naturales.

Factor experimental	-0,866	-0,577	-0,289	0	0,289	0,577	0,866
Tiempo (min)	5	14	23	33	41	53	60

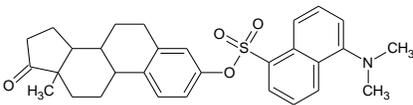
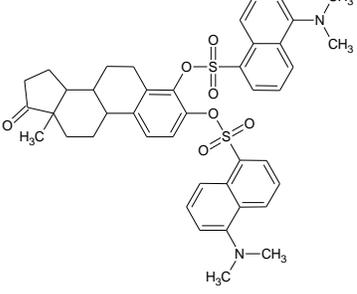
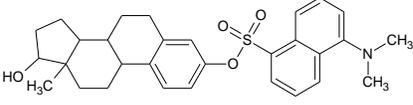
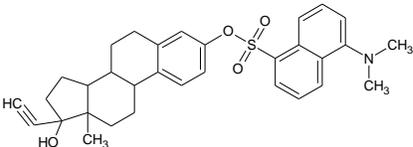
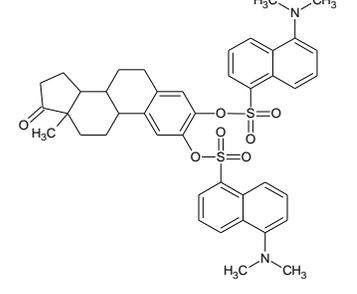
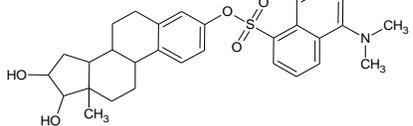
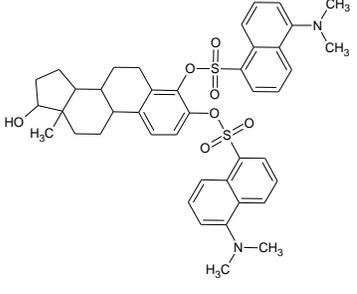
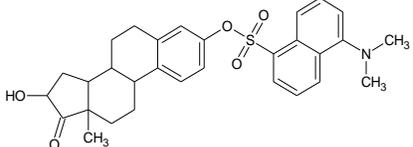
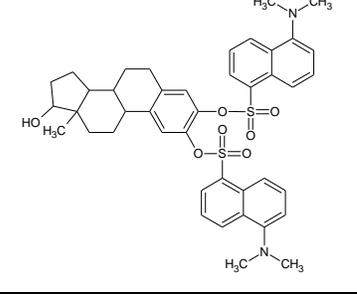
Tabla A4. pH del medio de derivatización en diseño Doehlert, valores codificados y valores naturales.

Factor experimental	-0,816	0	0,816
pH	8	9,5	11

Tabla A5. pH de las muestras de orina analizadas mediante la metodología RDSE e-DVB desarrollada.

<b>Muestras de Orina</b>	<b>pH de la muestra</b>	<b>pH en extracción sin hidrólisis</b>	<b>pH en extracción con hidrólisis</b>
<b>Embarazada</b>	6,9	6,0	5,2
<b>Mujer 29 años no toma anticonceptivos</b>	5,4	6,0	5,2
<b>Hombre 29 años</b>	5,3	6,0	5,2
<b>Mujer 53 años climaterio</b>	5,1	6,0	5,2
<b>Niño 5 años</b>	6,2	6,0	nd

Tabla A6. Estructura química de los estrógenos dansilados.

Estrógeno	Estructura Química	Estrógeno	Estructura Química
E1		4-OHE1	
E2			
EE2		2-OHE1	
E3		4-OHE2	
16-OHE1		2-OHE2	

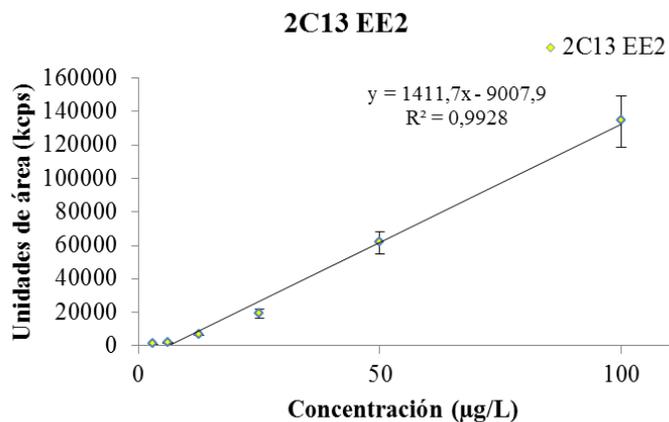


Figura A1. Curva de calibración de estándar  $^{13}\text{C}_2$  EE2 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

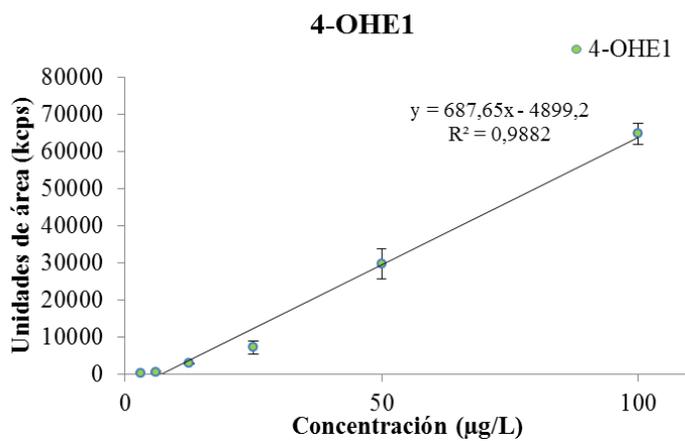


Figura A2. Curva de calibración de estándar 4-OHE1 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

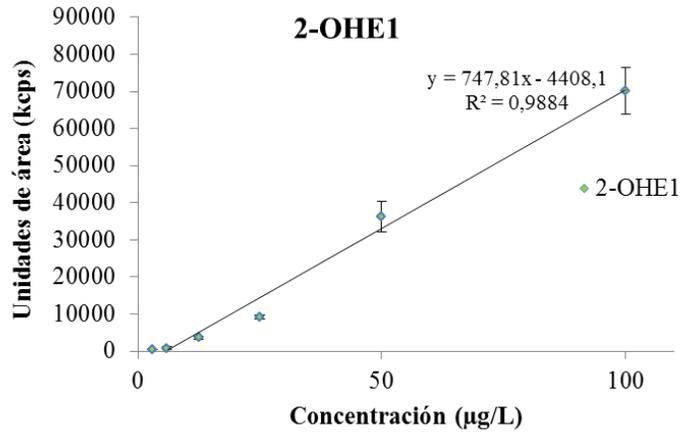


Figura A3. Curva de calibración de estándar 2-OHE1 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

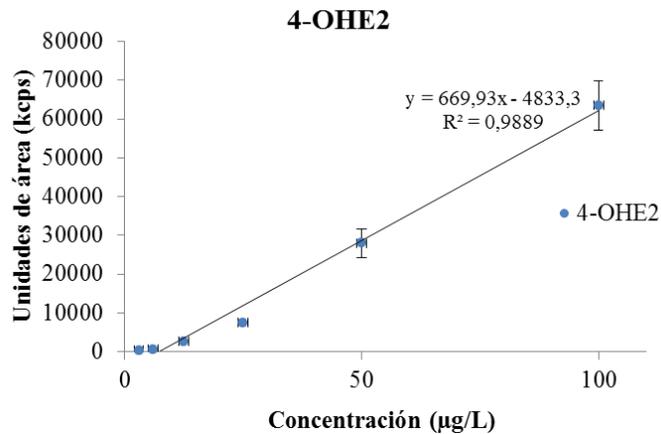


Figura A4. Curva de calibración de estándar 4-OHE2 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

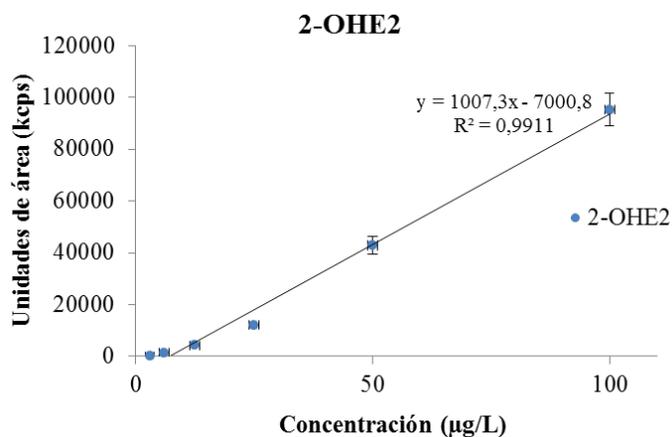


Figura A5. Curva de calibración de estándar 2-OHE2 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

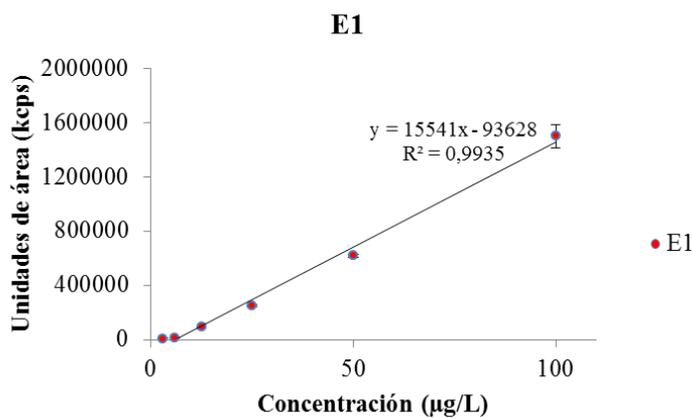


Figura A6. Curva de calibración de estándar E1 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

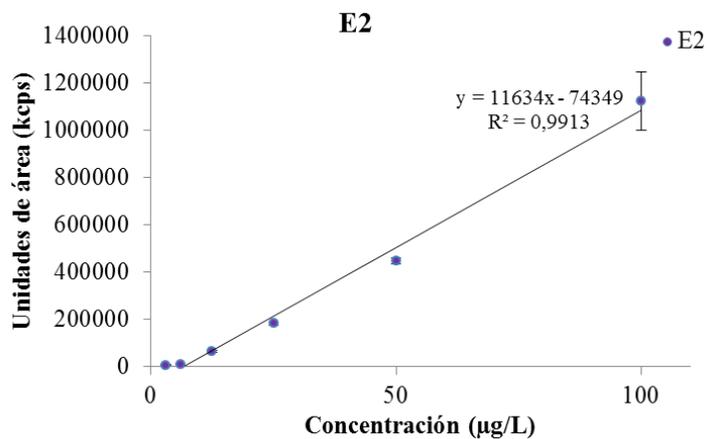


Figura A7. Curva de calibración de estándar E2 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

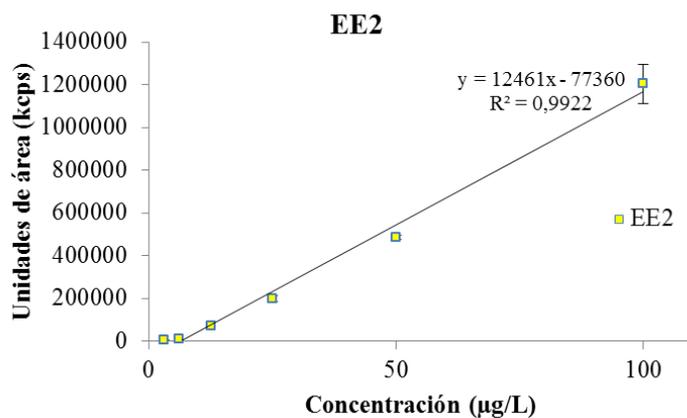


Figura A8. Curva de calibración de estándar EE2 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

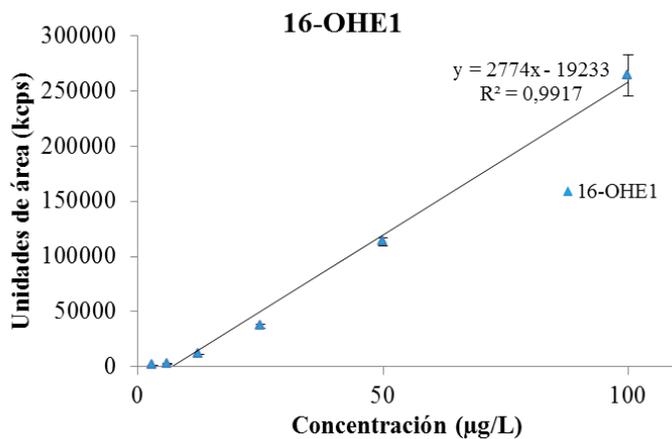


Figura A9. Curva de calibración de estándar 16-OHE1 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

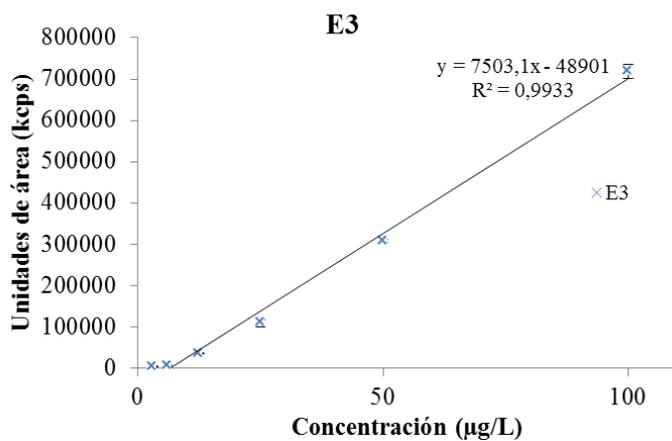


Figura A10. Curva de calibración de estándar E3 dansilado en concentraciones entre 3 y 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  mediante LC-TOF/MS.

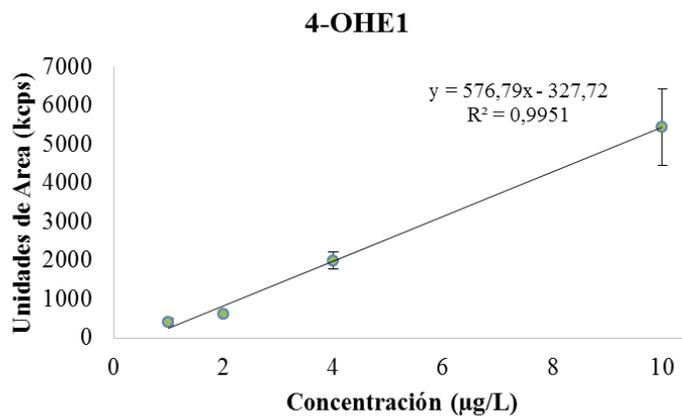


Figura A11. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 4-OHE1 (1-10 µg·L<sup>-1</sup>).

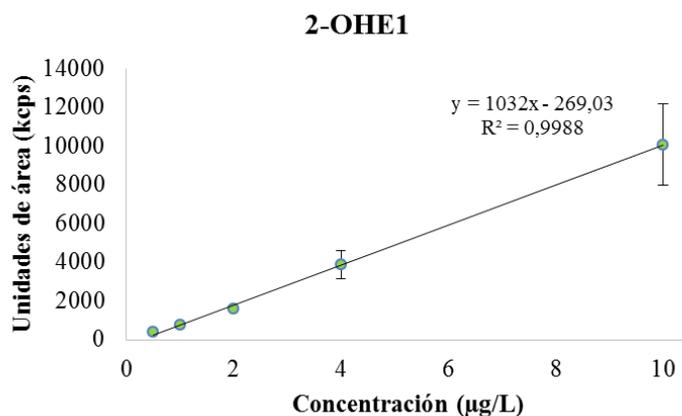


Figura A12. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 2-OHE1 (0,5-10 µg·L<sup>-1</sup>).

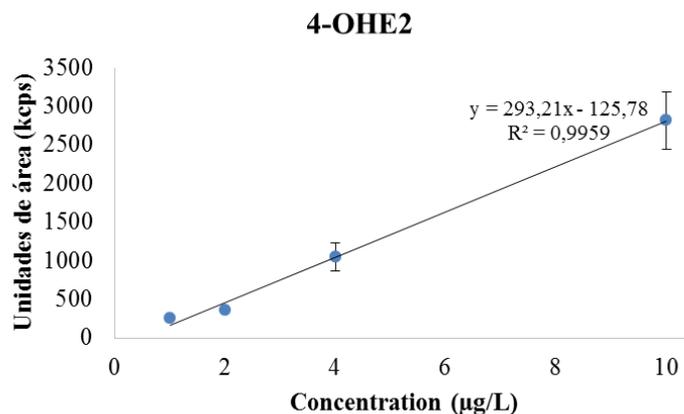


Figura A13. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 4-OHE2 (1-10 µg·L<sup>-1</sup>).

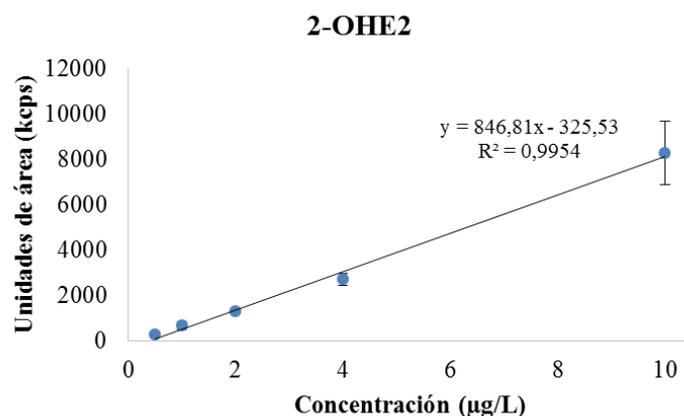


Figura A14. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 2-OHE2 (0,5-10 µg·L<sup>-1</sup>).

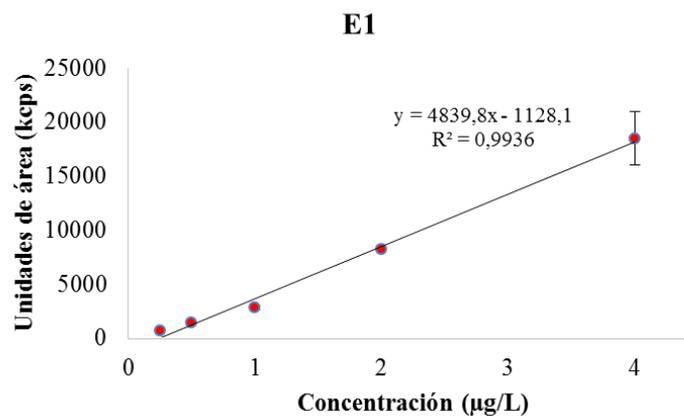


Figura A15. Figura A5. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de E1 (0,5-4 µg·L<sup>-1</sup>).

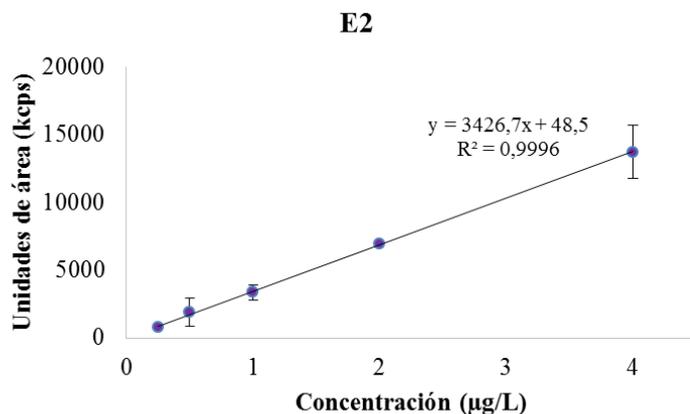


Figura A16. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de E2 (0,25-4 µg·L<sup>-1</sup>).

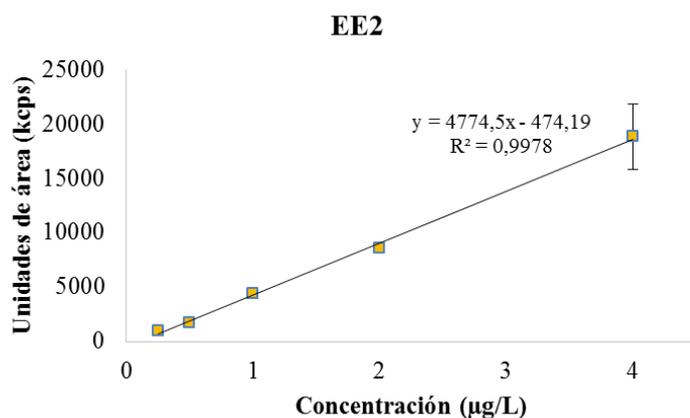


Figura A17. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de EE2 (0,25-4 µg·L<sup>-1</sup>).

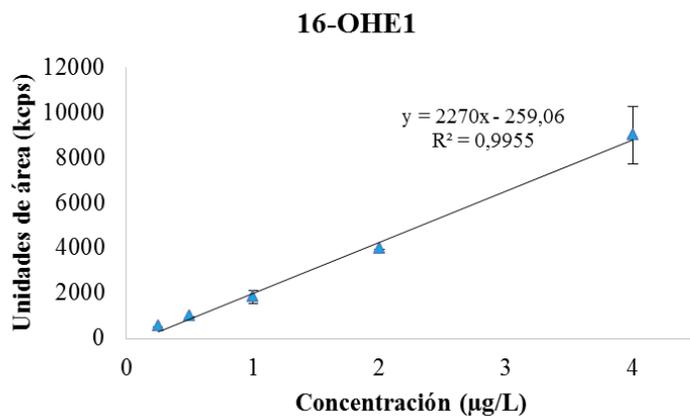


Figura A18. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de 16-OHE1 (0,25-4 µg·L<sup>-1</sup>).

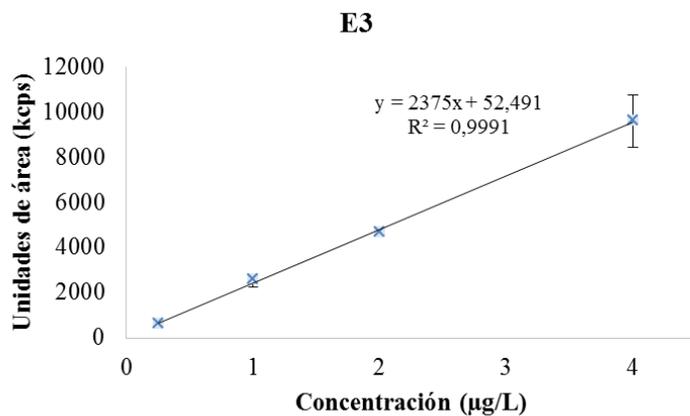


Figura A19. Curva de calibración para estimación de límite de detección instrumental en LC-TOF/MS de E3 (0,25 - 4 µg·L<sup>-1</sup>).

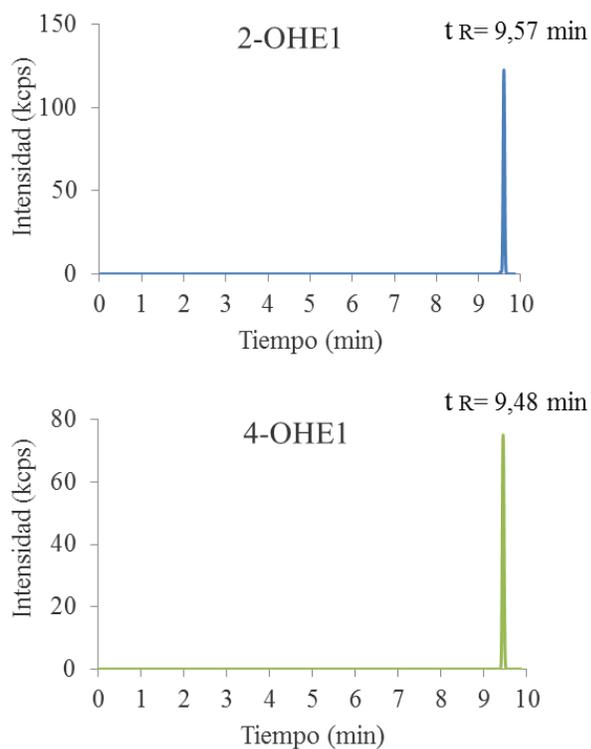


Figura A20. Cromatogramas de 2-OHE1 y 4-OHE1 inyectados independientemente.

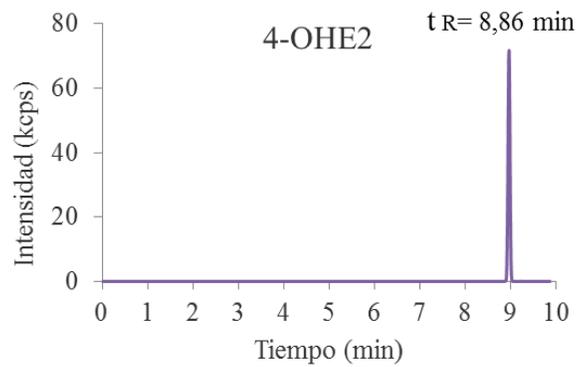
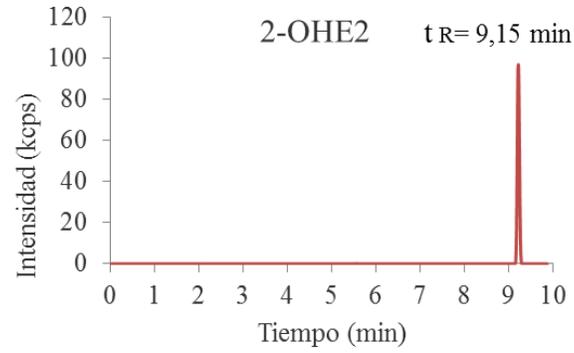


Figura A21. Cromatograma de 2-OHE2 y 4-OHE2 inyectados independientemente.

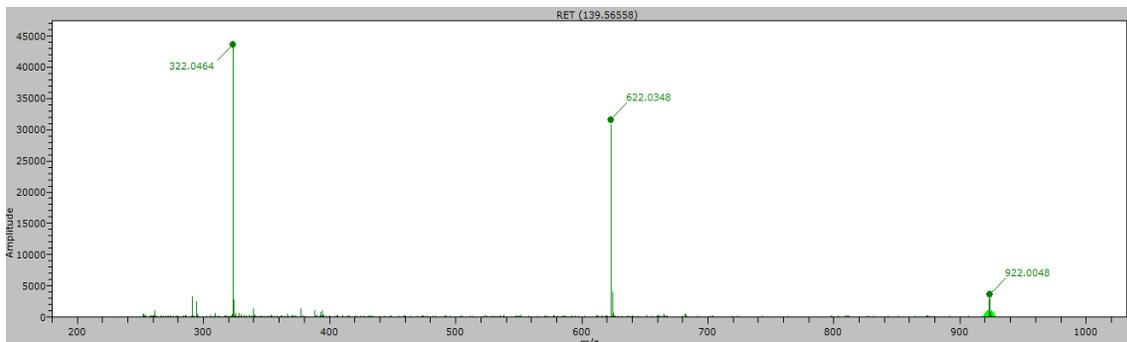


Figura A22. Señales  $m/z$  de la solución de calibración para el sistema ESI-TOF/MS.

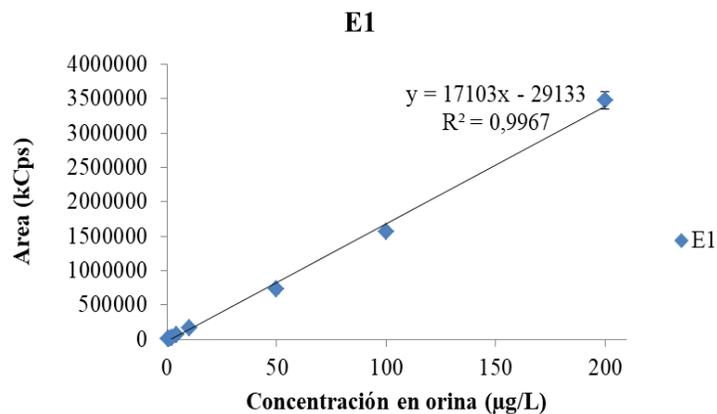


Figura A 23. Curva de calibración de E1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

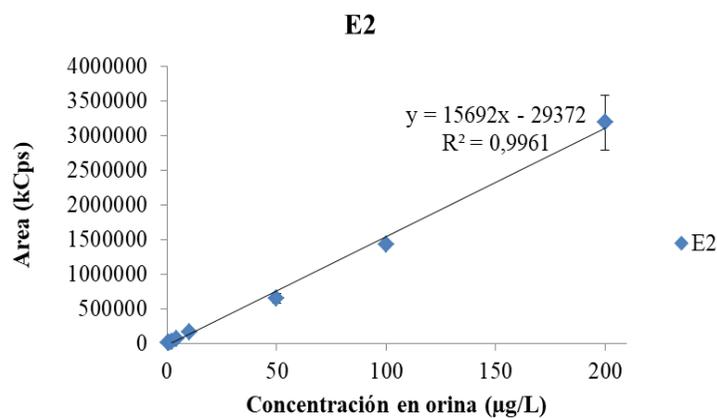


Figura A 24. Curva de calibración de E2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

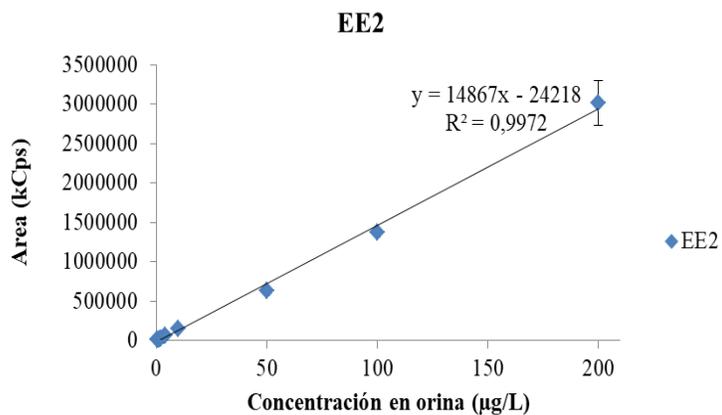


Figura A 25. Curva de calibración de EE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

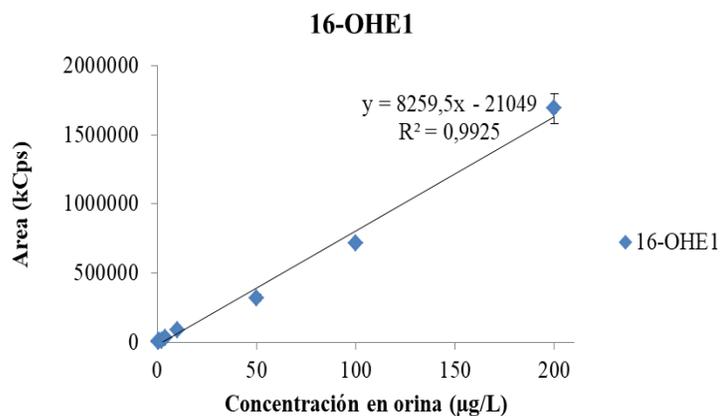


Figura A 26. Curva de calibración de 16-OHE1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

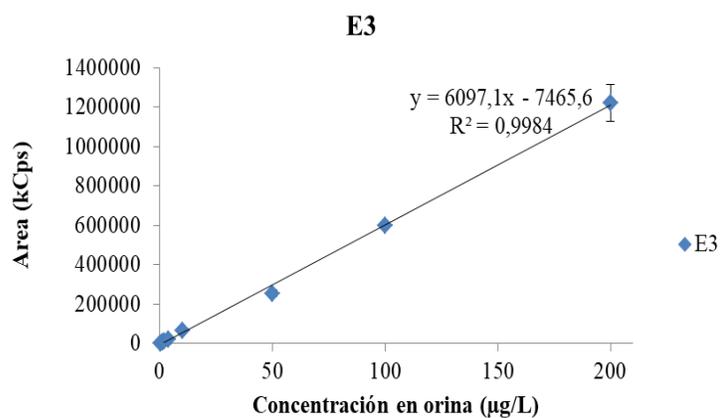


Figura A 27. Curva de calibración de E3 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

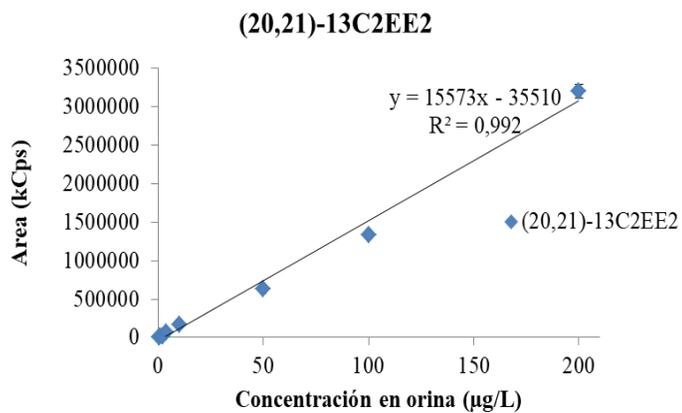


Figura A 28. Curva de calibración de(20,21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

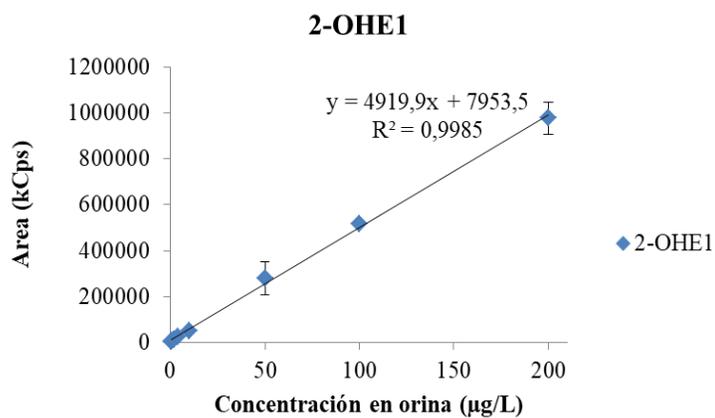


Figura A 29. Curva de calibración de 2-OHE1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

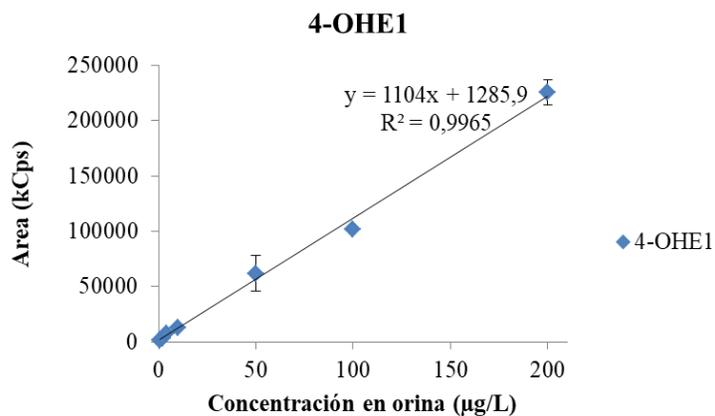


Figura A 30. Curva de calibración de 4-OHE1 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

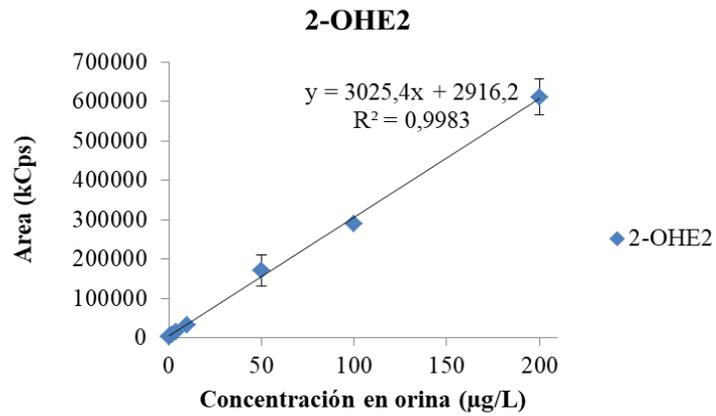


Figura A 31. Curva de calibración de 2-OHE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

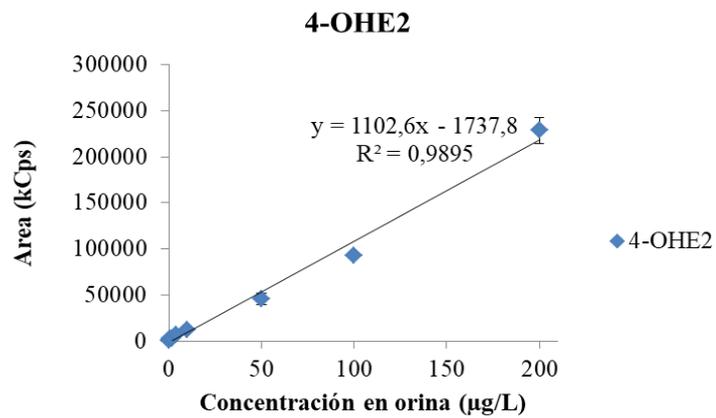


Figura A 32. Curva de calibración de 4-OHE2 en orina utilizando RDSE-e-DVB.

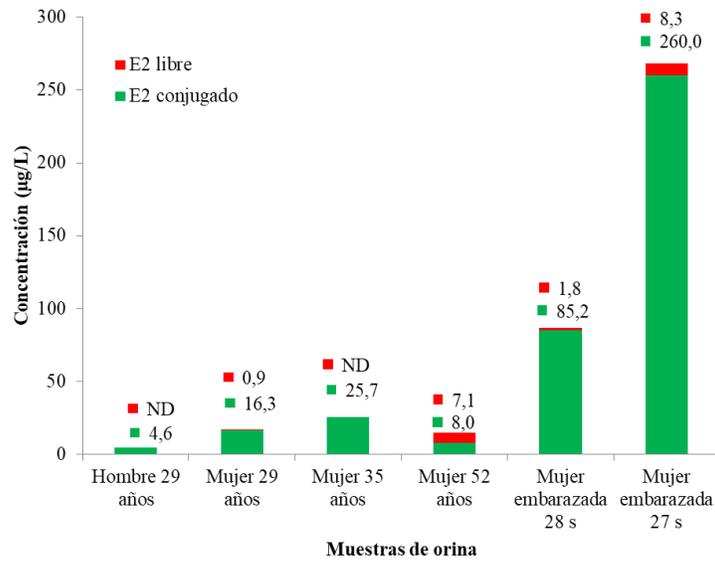


Figura A 33. Concentraciones encontradas de E2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

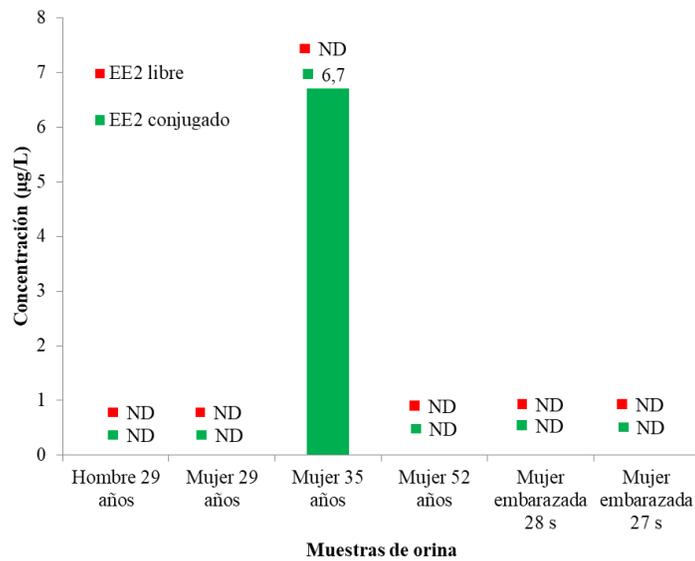


Figura A34. Concentraciones encontradas de EE2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas

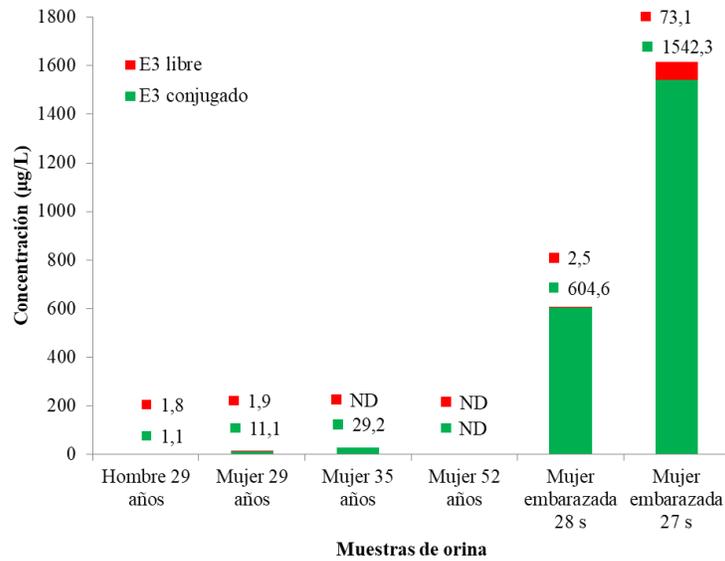


Figura A35. Concentraciones encontradas de E3 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

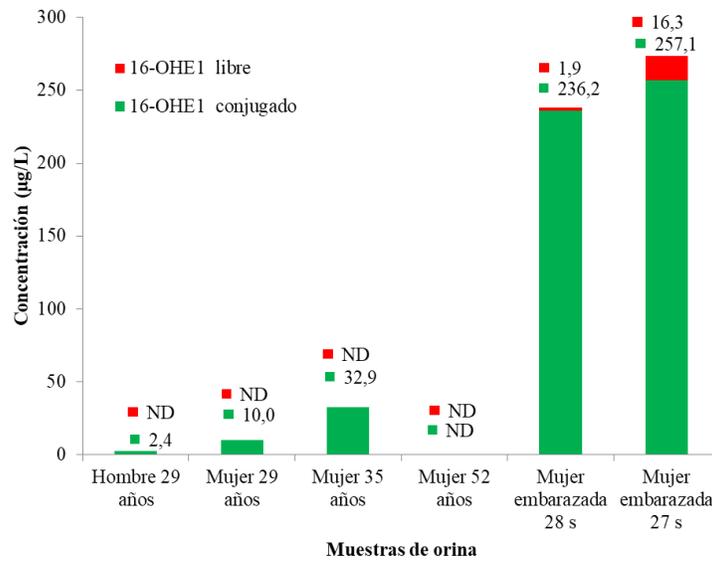


Figura A 36. Concentraciones encontradas de 16-OHE1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

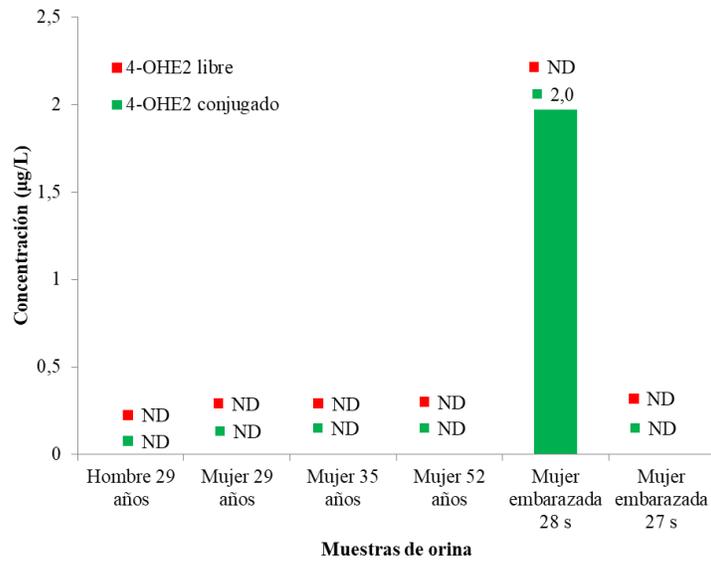


Figura A 37. Concentraciones encontradas de 4-OHE2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

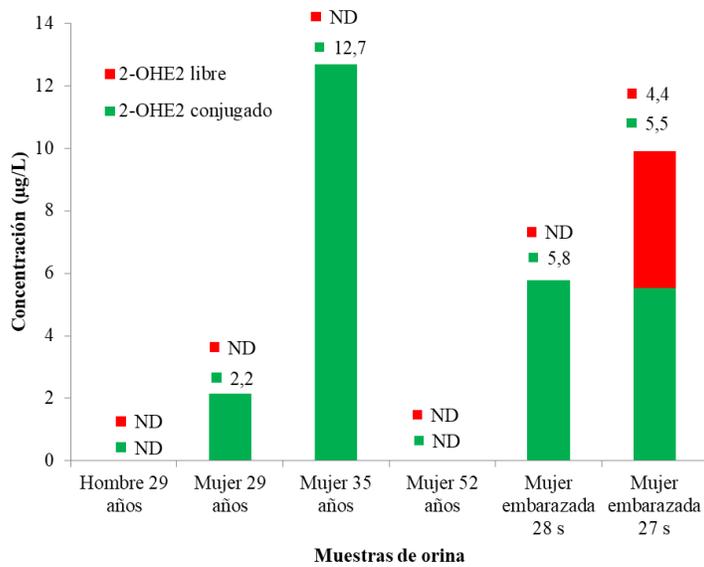


Figura A 38. Concentraciones encontradas de 2-OHE2 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

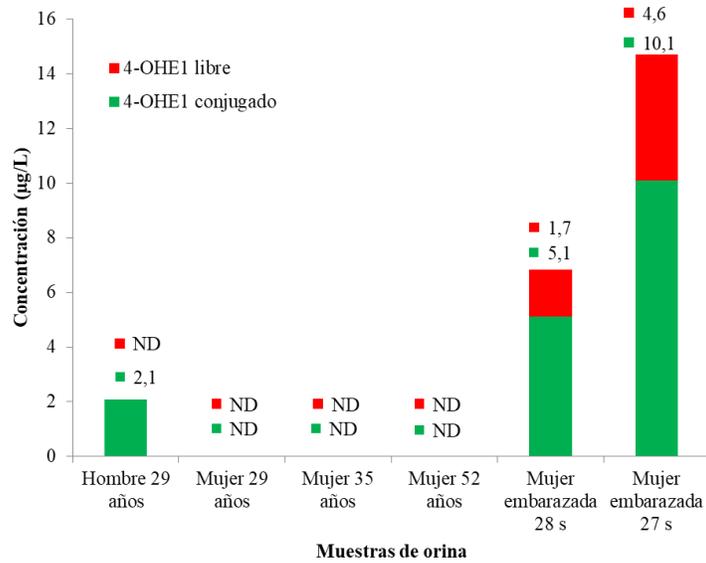


Figura A 39. Concentraciones encontradas de 4-OHE1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

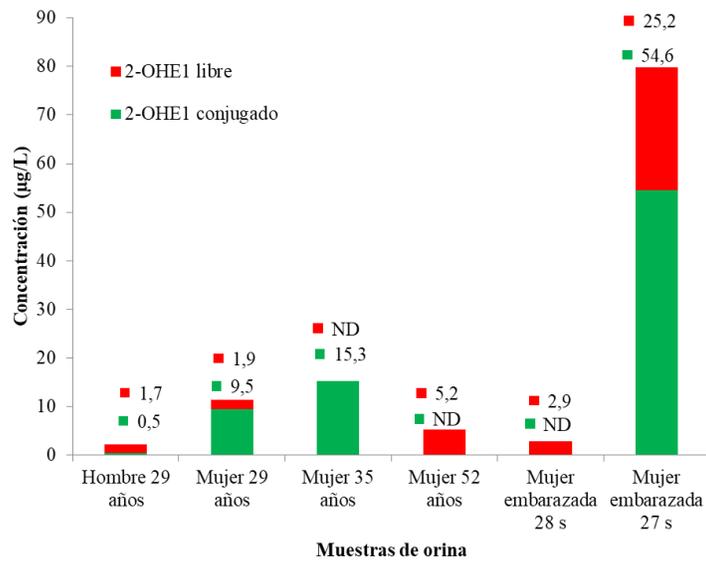


Figura A 40. Concentraciones encontradas de 2-OHE1 libre y conjugada en las muestras de orina analizadas.

## 8. PRESENTACIONES A CONGRESOS

- Workshop em Avancos Recentes no Preparo de Amostras (WARPA 2015) 7-10 DE Septiembre 2015, Manizales, Colombia.

*“Estudio de fases sorbentes y variables hidrodinámicas para la extracción por sorción con disco rotatorio de estrógenos y metabolitos hidroxilados desde muestras acuosas”.*

- 32° Congreso Latinoamericano de Química (CLAQ 2016), XXXI Jornadas Chilenas de Química 19 – 22 de Enero 2016, Concepción, Chile.

*“Derivatización de estrógenos y de sus metabolitos hidroxilados para la determinación por cromatografía líquida y gaseosa acoplada a espectrometría de masas”.*

- XIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental (EQAA) 18 - 21 de Octubre 2016, Valdivia, Chile.

*“Evaluación del efecto matriz en la determinación de estrógenos por UHPLC-TOF/MS en efluentes de plantas de tratamientos de aguas servidas”.*

- VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental (CIAQA 2016). 15 – 18 de Noviembre 2016, Cancún México.

*“Desarrollo de una metodología para la determinación de estrógenos desde aguas residuales mediante extracción por sorción en disco rotatorio y UHPLC-TOF/MS”.*

- XXXIII Jornadas Chilenas de Química. 9 – 12 de Enero 2018, Puerto Varas, Región de Los Lagos, Chile.

*“Desarrollo de un método de extracción y determinación de estrógenos en leche utilizando QuEChERS y LC-MS/MS”.*

- XIII LASEAC Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry 12 – 15 Noviembre 2018, La Serena, Región de Coquimbo, Chile.

*“Desarrollo de una metodología de extracción de estrógenos desde orina utilizando extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) con estireno-DVB y clean-up simultáneo con PSA”.*

## 9. PUBLICACIONES

Analytical and Bioanalytical Chemistry  
https://doi.org/10.1007/s00216-018-1412-0

RESEARCH PAPER



### Liquid chromatography–time-of-flight high-resolution mass spectrometry study and determination of the dansylated products of estrogens and their hydroxylated metabolites in water and wastewater

Luis Honda<sup>1</sup> · Mercedes Becerra-Herrera<sup>2</sup> · Pablo Richter<sup>1</sup>

Received: 6 July 2018 / Revised: 13 September 2018 / Accepted: 28 September 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

#### Abstract

A method combining liquid chromatography with a dual-probe ultraspray electrospray ionization (ESI) source and time-of-flight high-resolution mass spectrometry (LC-ESI-TOF/MS) was developed for the simultaneous determination of four steroidal sex hormones, estrone (E1), 17 $\beta$ -estradiol (E2), 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2), and estriol (E3), as well as five of their hydroxylated metabolites, 2-hydroxyestrone (2-OHE1), 4-hydroxyestrone (4-OHE1), 16 $\alpha$ -hydroxyestrone (16-OHE1), 2-hydroxyestradiol (2-OHE2), and 4-hydroxyestradiol (4-OHE2), in water samples in a short chromatographic run of 10 min. Derivatization of the analytes was optimized using dansyl chloride as the derivatizing agent. Under optimal positive ionization conditions, the following signals, which had not been previously reported, were observed (with theoretical values of  $m/z$  377.1373 for 2- and 4-OHE1 and 378.1452 for 2- and 4-OHE2), corresponding to doubly derivatized catechol estrogens in the form of  $[M+2H]^{2+}$ . These mass spectrometric signals were more abundant than those reported previously for the  $[M+H]^+$  forms of these hydroxylated metabolites. Solid-phase extraction (SPE) with an octadecyl-endcapped sorbent was used to pretreat tap water and effluent from a wastewater treatment plant (WWTP) in Santiago, Chile. The method achieved the simple, fast, and sensitive measurement of nine estrogens with quantitative recoveries (higher than 85.4%). Detection and quantification limits were between 1 and 17 ng L<sup>-1</sup> and between 3 and 58 ng L<sup>-1</sup>, respectively, for all compounds in water. The estrogens E1 and E2 were found in WWTP effluent at concentrations of  $7 \pm 1$  and  $41 \pm 1$  ng L<sup>-1</sup>, respectively, and EE2 was detected at a concentration below the limit of quantitation. This study shows that the proposed method is suitable for the accurate, rapid, and selective determination of all these analytes at trace levels.

**Keywords** LC-ESI-TOF/MS · Estrogenic hormones · Catechol estrogens · Positive electrospray ionization · Derivatization reaction · Wastewater

#### Introduction

Emerging contaminants are compounds resulting from urban, industrial, or agricultural activity that are found in the environment, are unregulated because their effects are currently unknown, but could present risks to exposed organisms as a result of their physical and chemical properties. Some of these compounds are classified as endocrine-disrupting chemicals (EDCs), defined by the United States Environmental Protection Agency (USEPA) as exogenous agents that interfere with the production, release, transport, metabolism, binding, or elimination of natural hormones in the body responsible for maintaining homeostasis and the regulation of developmental biological processes [1]. EDCs are natural or

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1412-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Pablo Richter  
prichter@ciq.uchile.cl

<sup>1</sup> Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, P.O. Box 233, Santiago, Chile

<sup>2</sup> Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, P.O. Box 653, Santiago, Chile

Published online: 10 October 2018



synthetic compounds associated with various diseases in humans, such as prostate cancer, disorders of the reproductive tract, low sperm count, and breast cancer, whereas in aquatic organisms, EDCs have been associated with such problems as feminization, infertility, and androgyny [1]. Various types of EDCs have been found in the environment, including naturally occurring estrogens, such as 17 $\beta$ -estradiol (E2), estrone (E1), and estriol (E3), and the synthetic 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE2), which is used in birth control pills.

E2 has a high endocrine-disrupting potential and is the most biopotent estrogen found in environmental matrices [2]. In humans, E2 is transformed to E1, generating a balance between the two forms; both estrogens are metabolized hepatically to produce the respective hydroxylated metabolites, as well as conjugated estrogens containing glucuronide and sulfate groups, which are highly water soluble, thereby promoting their subsequent removal via urine. Conjugated estrogens are the less active forms of these compounds excreted by the organism [3]; however, some studies have indicated that they can be transformed to their more active free forms in wastewater treatment plants (WWTPs) [4].

The main sources of estrogens in the environment are the pharmaceutical and veterinary industries, which use estrogens in the manufacture of pharmaceutical compounds (including contraceptives), and discharges of wastewater containing excreted compounds and/or their metabolites from humans and animals [5]. These compounds reach WWTPs, where they are not completely removed [5]. Estrogens have been found in treated wastewater samples in countries such as the UK, USA, Italy, Germany, Spain, Holland, Switzerland, Israel, Canada [1], and Chile [6], have reached natural water sources such as rivers, lakes, and seas, and have even been detected in tap water [7–9]. Considering the low concentrations at which this family of compounds can be found in the previously mentioned aqueous samples, it is necessary to use extraction techniques such as solid-phase microextraction (SPME), stir-bar sorptive extraction (SBSE) [10], or solid-phase extraction (SPE). SPE is one of the most commonly used method for aqueous samples owing to its ease of use as well as the high concentration factor achieved [10–13].

After sample preparation, a very sensitive and selective analytical technique should be selected for determination of the analytes. For this purpose, gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS) have been the most used techniques in recent years. Estrogens are low-volatility compounds, so it is necessary to perform an additional derivatization step to determine their concentrations by GC-MS; long chromatographic run times are also needed, generally greater than 30 min [14]. LC-MS is an alternative for the determination of this type of compound, which can be ionized in negative mode [2, 12, 15–17]. Taking into account that some studies have reported low sensitivity in this mode [18, 19], the derivatization of estrogens has been

proposed by adding a highly ionizable group to increase sensitivity in positive ionization mode [13, 18–29]. The most used derivatization reaction for this purpose is dansylation, which is applied to compounds containing phenolic rings, particularly estrogens [13, 18–20, 22–29]. Some researchers have worked with dansylated estrogens with different ionization sources, such as electrospray ionization (ESI), atmospheric pressure photoionization (APPI), and atmospheric pressure chemical ionization (APCI), to select the most appropriate source for this group of compounds; this approach improves the sensitivity of estrogens by up to 3 orders of magnitude compared to that of underivatized analytes ionized in negative mode [13]. Despite the high sensitivity for estrogens achieved in positive ionization mode, long chromatographic runs, of at least 35 min, have been reported, mainly to achieve the separation of catechol estrogens [20, 22–24, 29].

The aim of this study was to determine estrogenic compounds in water samples, with high sensitivity, selectivity, and rapidity, using liquid chromatography coupled to a dual ESI source with a time-of-flight mass detector system (LC-ESI-TOF/MS). The studied analytes were E1, E2, EE2, and E3 together with the hydroxylated metabolites 16 $\alpha$ -hydroxyestrone (16-OHE1), 2-hydroxyestrone (2-OHE1), 4-hydroxyestrone (4-OHE1), 2-hydroxyestradiol (2-OHE2), and 4-hydroxyestradiol (4-OHE2). A derivatization procedure using dansyl chloride was optimized for assessing the response of the analytes in positive ionization mode, allowing the measurement of these nine estrogens at trace levels. Under optimized conditions in the dual ESI source used for ionization of the compounds 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2, signals at  $m/z$  377.1362, 377.1362, 378.1436, and 378.1438 were observed, corresponding to doubly derivatized catechol estrogens of the type  $[M+2H]^{2+}$ , which have not been previously reported. In this report, these MS signals showed a significantly higher intensity than the previously reported signals corresponding to  $[M+H]^+$  species. The developed determination method was coupled to SPE methodology [30] and applied to the determination of the analytes in tap water and effluent samples from a WWTP in Santiago, Chile.

## Materials and methods

### Reagents

Water from a Simplicity® Water Purification System, Millipore (Darmstadt, Germany) was used throughout the experiment. The hormones 2-OHE1 and 16-OHE1 were obtained from TRC Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada); E2 and E3 were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany); and E1, 4-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2, EE2, and dansyl chloride were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA). The labeled hormone (20, 21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>-

17 $\alpha$ -ethinyl estradiol, purchased from Wellington Laboratories (Ontario, Canada), was used as a surrogate standard in the analysis of wastewater. Nitrogen ( $\geq 99.995\%$  purity) was purchased from Linde (Santiago, Chile) and was used for evaporation of the samples. Methanol, ethyl acetate, acetone (all HPLC grade, 99.8% purity), sodium hydrogen carbonate (99.5% purity), formic acid ( $> 98\%$  purity), glacial acetic acid, and sodium hydroxide (purity  $\geq 99\%$ ) were used for sample preparation and were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Methanol (LC-MS grade), acetonitrile (LC-MS grade), and water (LC-MS grade) were used in LC-TOF/MS and were also provided by Merck.

### Instrumentation

pH values were determined with a WTW Model Pmx 3000 pH meter (Weilheim, Germany). A TurboVap LV thermoregulated bath Biotage (Charlotte, NC, USA), an MX-S vortex mixer Scilogex (Rocky Hill, CT, USA), and an analogue heat-block evaporator VWR (Radnor, PA, USA) were employed during the sample preparation and derivatization processes.

Chromatographic analysis was performed on a PerkinElmer Flexar FX-15 ultrahigh-performance liquid chromatography system (Waltham, MA, USA) with a binary pump system, a vacuum degasser, a cooling autosampler, and a thermostated column compartment. Separation was carried out using a Brownlee SPP-C18 (2.1 mm  $\times$  75 mm, 2.7  $\mu$ m) analytical column (PerkinElmer). Optimum separation was achieved with a binary mobile phase gradient at a flow rate of 0.3 mL min<sup>-1</sup>. The column temperature was maintained at 25 °C, and the injection volume was 10  $\mu$ L. Solvents were (A) 0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid at pH 2.1 and (B) acetonitrile. The gradient elution program was as follows: 0–0.9 min, 50% A; 0.9–3.9 min, 30% A; 3.9–10 min, 0% A; and finally, a return to the initial conditions in 2 min.

Identification and quantification of analytes were performed using an AxION 2 TOF MS system equipped with a dual-probe ultraspray electrospray ionization source (ESI) controlled by Chromera software and TOF MS Driver software (PerkinElmer). The AxION 2 TOF MS was used both for direct infusion and coupled to the LC system. The working conditions of the source were as follows: capillary voltage of 6000 V, capillary exit voltage of -125 V, gas flow rate of 10 L min<sup>-1</sup>, gas temperature of 300 °C, and nebulizer pressure in both probes of 80 psi. Accurate LC-MS spectra were recorded across a range of 100–1000 *m/z*. The delta mass was 20 ppm for all compounds. To improve the sensitivity of the analysis, the acquisition function was performed in trap mode, setting the parameters “IG Exit Low” and “Trap/Pulse Delay” at 18 and 36  $\mu$ s, respectively.

For sample preparation, PVDF filters with a 0.45- $\mu$ m pore size and 33-mm diameter (Millipore) and UCT SPE cartridges with C18 (octadecyl)-endcapped sorbent (2000 mg/15 mL)

were purchased from Sigma-Aldrich, and a Supelco Visiprep™ SPE Vacuum Manifold standard, 12-port model (Pennsylvania, USA) connected to a vacuum system was used.

### Sampling and sample preparation

Samples of tap water and effluent from a wastewater treatment plant in Santiago, Chile, were collected and stored in bottles (5 L) at 4 °C. Before samples extraction, they were filtered through a glass fiber of 0.38  $\mu$ m pore size.

Sample preparation was based on a previously reported SPE methodology with a C18 sorbent phase [30]. In the present case, the solid phase was activated with 4 mL of methanol, followed by 10 mL of HPLC-grade water. Then, at a rate of approximately 10 mL min<sup>-1</sup>, the sample (50 mL) was passed through the column, after which the column was dried under vacuum for 20 min. Methanol (3 mL) was used to elute the target compounds from the extraction column. The extract was evaporated under a N<sub>2</sub> stream to dryness, and then the residue was derivatized, obtaining a final volume of 200  $\mu$ L with a concentration factor of 250; finally, the derivatized solution was injected into the LC-ESI-TOF/MS system.

### Derivatization

All analytes were derivatized with dansyl chloride, initially according to the method described for the determination of EE2 in plasma [31]. This method was subsequently optimized considering the responses of all the analytes. To redissolve the evaporated extract, an aliquot of 100  $\mu$ L of 100 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> at pH 9.5, containing 0.04% w/v ascorbic acid, was added to the dried extract. Samples were vortexed for 1 min prior to adding 100  $\mu$ L of 1 mg mL<sup>-1</sup> dansyl chloride in acetone, and once the mixture was homogenized (by vortexing for 1 min again), it was incubated for 5 min at 70 °C, allowed to cool to room temperature, and directly infused to the TOF/MS or injected into the LC-ESI-TOF/MS system.

### Evaluation of the matrix effect, accuracy, and precision in tap water and wastewater samples

Matrix-matched calibration was used for quantification in both water matrixes. Aliquots of 50 mL of each matrix were used for matrix-matched calibration, adding the nine estrogens at six levels of concentration between 0.01 and 5.0  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. Samples were subjected to the extraction/desorption procedure using the optimum conditions as described previously. In the case of wastewater samples, the contribution of the analytes was subtracted from the signals of the calibration set. To ensure the feasibility of the extraction method, calibration sets and real samples were enriched with standard surrogate (20,21)-<sup>13</sup>C<sub>2</sub>EE2 (0.1  $\mu$ g L<sup>-1</sup>).

The matrix effect was estimated by comparing the slopes of standard calibration curves dissolved in extraction solvent and matrix-matched calibration curves. The matrix effect (%) was calculated as  $\{100 \times [(\text{matrix slope})/(\text{solvent slope})] - 100\}$  [32].

On the other hand, the accuracy and precision of the whole method were evaluated in tap water and wastewater effluent through the recovery and relative standard deviation (RSD), respectively, by applying the method to samples enriched with all the analytes ( $n = 6$ ) at three levels of concentration, 0.1, 1.0, and 4.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

## Results and discussion

### Derivatization with dansyl chloride and identification of estrogens by LC-ESI-TOF/MS

The derivatization method proposed by Anari et al. for EE2 [31] was applied to all the analytes under study. The derivatized analytes were directly infused into the dual-ESI TOF/MS at a flow rate of 20  $\mu\text{L min}^{-1}$ , obtaining the  $m/z$  signals and intensities shown in Table 1. The corresponding  $[M+H]^+$  form of all these analytes has been reported in previous studies [20, 23, 24, 26]. However, for 4-OHE2, 2-OHE2, 4-OHE1, and 2-OHE1 (catechol estrogens), MS signals corresponding to the estrogen derivatized with two dansyl groups and doubly protonated according to the form  $[M+2H]^{2+}$  were also observed in this dual-ESI source (Table 1). As seen in Table 1, under the conditions established by Anari et al. [31], both signals for the catechol estrogens were of very low intensity, so the experimental conditions of derivatization were optimized to improve the responses of all analytes. As can be seen in Electronic Supplementary Material (ESM), Table S1, the presence of the two dansyl groups does not lead to steric hindrance

### Optimization of derivatization

#### Study of derivatizing agent concentration, pH, and reaction time through a Doehlert design

To optimize derivatization for all compounds, a simultaneous three-factor Doehlert design with two centers [33] was used to analyze the effect of dansyl chloride concentrations between 0.1 and 1.0  $\text{mg mL}^{-1}$ , reaction times between 5 and 60 min, and pH values of the 100  $\text{mmol L}^{-1}$  sodium hydrogen carbonate solution between 8 and 11. The results showed that the concentration of derivatizing agent had a positive and significant effect ( $p < 0.05$ ) for the derivatization of all analytes. Higher signals were observed with increasing concentration of dansyl chloride, which additionally favored the formation of a specific derivatization product, corresponding to the doubly derivatized species. In contrast, with lower concentrations of dansyl chloride, by-product derivatization was observed in the catechol estrogens 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2, corresponding to the compounds in which only one of the hydroxyl groups of the aromatic ring was derivatized. These derivatives disappeared when the concentration of derivatizing agent was 1  $\text{mg mL}^{-1}$ .

The pH had a significant negative effect on four of the studied analytes (catechol estrogens) at values above 9.5, while the reaction time had no significant effect in the studied range. ESM, Fig. S1 shows that the optimum conditions for all analytes were as follows: dansyl chloride concentration, 1  $\text{mg mL}^{-1}$ ; pH of sodium hydrogen carbonate (100  $\text{mmol L}^{-1}$ ) solution between 8 and 9.5; and time, 5 min.

To study in greater detail which analyte responses were most affected by changing the pH of the sodium hydrogen carbonate solution, Fisher's LSD test was performed, showing significant differences when pH was varied between 8 and 11.

**Table 1** Intensities of the  $m/z$  signals for derivatized estrogens according to Anari et al. and optimized methods

Analyte	Anari et al. derivatization [31]				Optimized derivatization			
	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Intensity	$m/z$ [M+2H] <sup>2+</sup>	Intensity	$m/z$ [M+H] <sup>+</sup>	Intensity	$m/z$ [M+2H] <sup>2+</sup>	Intensity
E3	522.2300	3172	–	–	522.2300	2759	–	–
16-OHE1	520.2158	1402	–	–	520.2158	3431	–	–
E2	506.2346	15206	–	–	506.2346	15315	–	–
EE2	530.2351	12849	–	–	530.2351	12283	–	–
E1	504.2191	11780	–	–	504.2191	13340	–	–
4-OHE2	755.2869	7	378.1438	259	755.2869	660	378.1438	2884
2-OHE2	755.2866	ND	378.1436	167	755.2866	754	378.1436	3851
4-OHE1	753.2697	24	377.1362	398	753.2697	737	377.1362	3799
2-OHE1	753.2674	10	377.1362	159	753.2674	567	377.1362	4093

Intensities of a 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  standard solution of each analyte

ND not detected

At very alkaline pH values, most compounds were negatively affected; the derivatization of catechol estrogens was affected the most. For E1, E2, and E3, the best response was obtained when the pH was 9.5. For the compounds 4-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2, and 16-OHE1, the best response was obtained at pH levels between 8 and 9.5, while for 2-OHE1, the response was slightly better at pH 8, as shown in ESM, Fig. S2. Finally, as a compromise, pH 9.5 was selected for further studies.

#### Study of concentration of sodium hydrogen carbonate solution, evaporation temperature, and use of antioxidant

The concentration of sodium hydrogen carbonate solution in the derivatization reaction was studied at values between 5 and 100 mmol L<sup>-1</sup>. The results indicated that there was an increase in the analytical response when the concentration was increased from 5 to 50 mmol L<sup>-1</sup>, after which it remained constant up to 100 mmol L<sup>-1</sup>. A concentration of 100 mmol L<sup>-1</sup> was selected to ensure a constant pH in the medium during the reaction. The effect of temperature on the evaporation step was evaluated at temperatures of 20, 40, and 50 °C, showing the most significant negative effect on the hydroxylated compounds, which could be due to accelerated oxidation when these analytes are exposed to temperatures higher than room temperature.

In previous reports, analytical standards of estrogens were prepared in methanol media containing ascorbic acid at 0.1% w/v, which ensures efficient dansylation, particularly in the case of catechol estrogens [23, 24]. Taking this into account, aliquots of 10 mL of a multistandard solution (10 µg L<sup>-1</sup> of each analyte in methanol) were assessed by adding ascorbic acid at varying concentrations of 0, 0.1, and 0.2% w/v and derivatizing the analytes according to the methodology established above. Contrary to expectations, the signal of each analyte was absent in the presence of ascorbic acid, probably because the sample aliquot produced a salt residue that impeded the derivatization reaction. We tested the addition of this acid at concentrations between 0 and 0.32% w/v to the 100 mmol L<sup>-1</sup> sodium hydrogen carbonate solution used for derivatization. In this case, signals were observed, reaching an optimum sensitivity for the set of analytes at an ascorbic acid concentration of 0.04% w/v, as shown in ESM, Fig. S3. Thus, ascorbic acid in the derivatization medium produced a positive effect, primarily on the catechol estrogens, at an optimal controlled concentration of 0.04% w/v in 100 mmol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub> solution.

#### Ionization of derivatized analytes in different media and chromatographic separation

Considering that the analytes were determined by liquid chromatography coupled with TOF/MS, it is necessary to first study their ionization in different media by direct infusion into

the ESI source. In this context, dissolution of the derivatization products was performed in 800 µL of an organic solvent, such as methanol and acetonitrile, mixed with different concentrations of formic acid between 0.003 and 0.3 mol L<sup>-1</sup> (typical ingredients of mobile phases in LC). A greater sensitivity of ionization was obtained in mixtures containing acetonitrile and formic acid, particularly when the formic acid reached a concentration of 0.3 mol L<sup>-1</sup>. A concentration of 0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid was finally selected, because the pH obtained was more acidic (pH 2.1) than those in the other mixtures; this pH favored ionization to the more abundant form [M+2H]<sup>2+</sup>, particularly in the case of 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2 (Fig. 1). The relative intensities of the forms [M+H]<sup>+</sup> and [M+Na]<sup>+</sup> were higher than that of the form [M+2H]<sup>2+</sup> when the concentration of formic acid was 0.03 mol L<sup>-1</sup> or lower (Fig. 1a, b). In contrast, the relative intensity of the form [M+2H]<sup>2+</sup> increased considerably not only when higher formic acid concentrations (0.3 mol L<sup>-1</sup>) were used but also when the ratio of acetonitrile to 0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid was decreased from 12:1 to 3:1 (Fig. 1c, d).

The *m/z* signals obtained for the analytes E1, E2, EE2, E3, and 16-OHE1 in the selected conditions are shown in Table 2, while the mass spectra of the analytes 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2 and 4-OHE2, including the ions 377.1362, 377.1362, 378.1436 and 378.1438, respectively, are shown in Fig. 2. To the best of our knowledge, these ions have not been previously reported and correspond to the doubly derivatized compounds in the form [M+2H]<sup>2+</sup>. Under these conditions, these signals have a much greater abundance than the *m/z* 753.2674, 753.2697, 755.2866 and 755.2869 signals corresponding to the doubly derivatized molecules in the form [M+H]<sup>+</sup> (Table 1), which have been reported previously [20, 23, 26] as typical for these compounds. In 2-OHE1, the signal at *m/z* 753.2674 is very close to the noise; as a result, it is necessary to zoom in to see the signal in the mass spectrum (see Fig. 2a).

Furthermore, as shown in the spectra of Fig. S4, for 2-OHE1 and 2-OHE2, isotopic signals equidistant at 0.5 mass units of the respective compounds were observed, which confirms that the signals mentioned above come from the fully derivatized and doubly charged compounds 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2.

Regarding the chromatographic separation of all analytes, the main challenge is to resolve the isomers 2- and 4-OHE1 and 2- and 4-OHE2. Previous attempts [20, 22–24] have considered long chromatographic runs (more than 35 min). Taking this into account, and considering the best ionization achieved as established above, an elution program was applied using a gradient of acetonitrile and 0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid. The selected gradient shows both a faster separation of the analytes and differences in chromatographic intensities for doubly and singly protonated 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2, which can be observed in the chromatograms shown in Fig. 3.

**Fig. 1** MS spectra of 2-OHE1 in the forms  $[M+2H]^{2+}$  with  $m/z = 377.1362$ ,  $[M+H]^+$  with  $m/z = 753.2674$ , and  $[M+Na]^+$  with  $m/z = 775.2528$ , obtained by direct infusion into the TOF/MS system in different media. **a** Acetonitrile/0.003 mol L<sup>-1</sup> formic acid (12:1 v/v), **b** acetonitrile/0.03 mol L<sup>-1</sup> formic acid (12:1 v/v), **c** acetonitrile/0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid (12:1 v/v), and **d** acetonitrile/0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid (3:1 v/v)

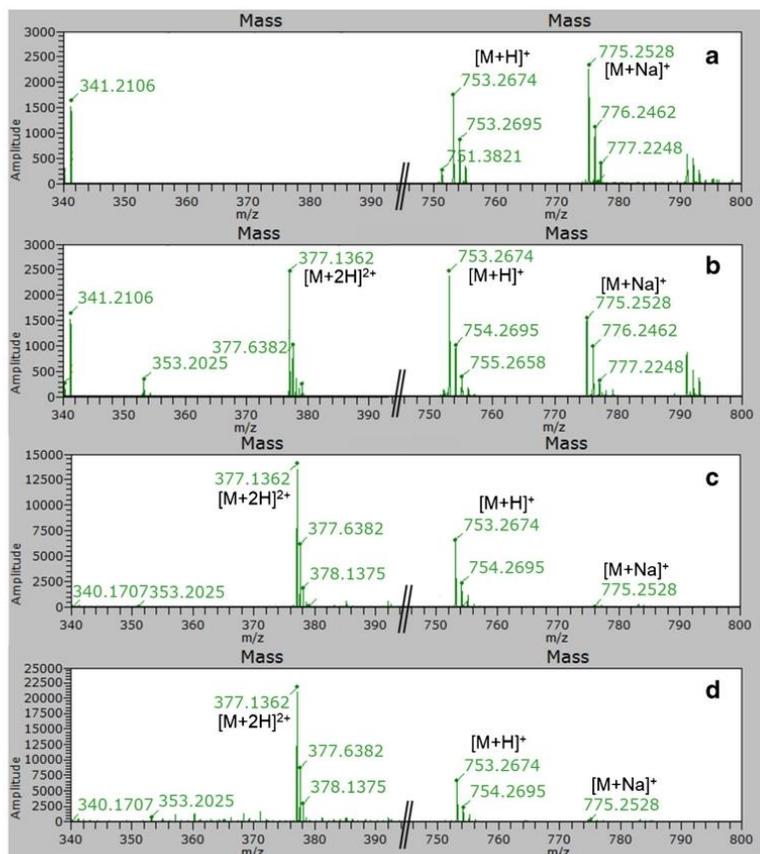


Table 2 shows the retention time of each analyte together with the theoretical and experimental  $m/z$  and errors (ppm). The error was less than 5.6 ppm for all the studied compounds, demonstrating the high resolution of TOF/MS detection.

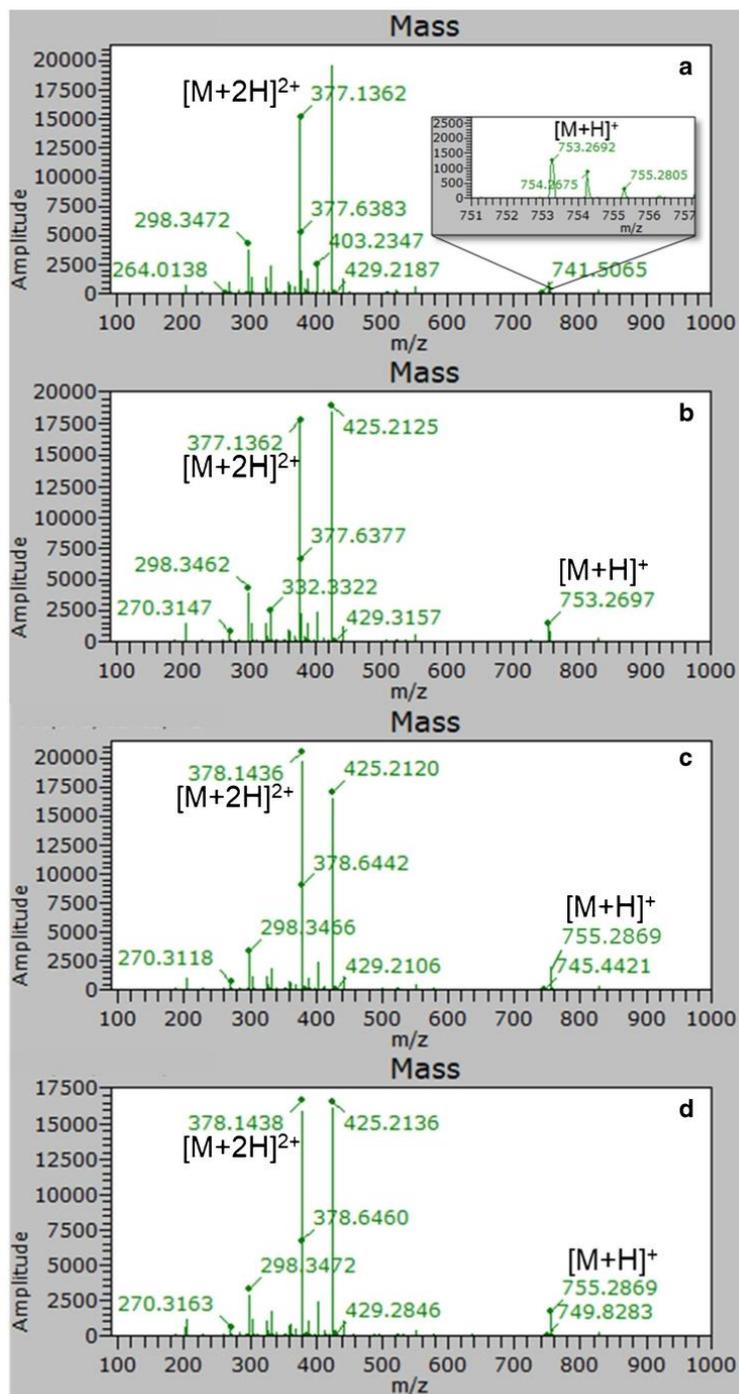
Furthermore, the chromatographic run by LC was achieved in 10 min, at which time it was possible to fully separate seven of the nine analytes in this study. The compounds 2-OHE1 and 4-OHE1, despite not being fully resolved, could be

**Table 2** Retention time, theoretical and experimental mass/charge ( $m/z$ ), and error (ppm) for each compound

Analyte	Retention time (min)	Theoretical $m/z$ <sup>a</sup>	Experimental $m/z$	Error (ppm)
E3	4.0	522.2314	522.2300	2.6
16-OHE1	5.0	520.2187	520.2141	5.6
E2	6.8	506.2365	506.2346	3.8
EE2	7.2	530.2365	530.2351	2.6
E1	7.3	504.2217	504.2191	5.2
4-OHE2	8.5	378.1452	378.1438	3.7
2-OHE2	8.8	378.1452	378.1436	4.2
4-OHE1	9.2	377.1373	377.1362	2.9
2-OHE1	9.3	377.1373	377.1362	2.9
(20,21)- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> EE2	7.2	532.2432	532.2404	5.3

<sup>a</sup> $m/z$  calculated using Molecular Weight Calculator software

**Fig. 2** MS spectra of doubly derivatized catechol estrogens  $[M+2H]^{2+}$ . **a** 2-OHE1,  $m/z = 377.1362$ , **b** 4-OHE1,  $m/z = 377.1362$ , **c** 2-OHE2,  $m/z = 378.1436$ , and **d** 4-OHE2,  $m/z = 378.1438$ . Acetonitrile/0.3 mol L<sup>-1</sup> formic acid (3:1 v/v)

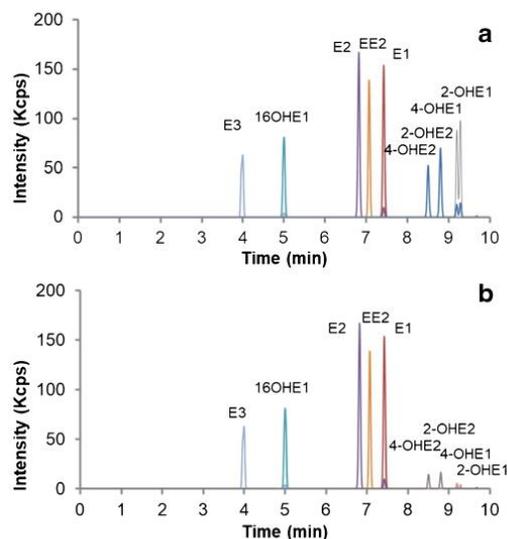


integrated independently. The resolution between the signals of 2-OHE1 and 4-OHE1 was better than those in other studies where the two compounds were quantified as the sum of both in a single chromatographic peak in runs longer than 16 min [26], semi-resolved in a chromatographic run longer than 30 min [29], or totally resolved in chromatographic runs of 35 min [20], 75 min [22], or 70 min [23, 24].

### Methodology evaluation

A previously reported SPE methodology [30] was used in this study for the preparation of tap water and effluent wastewater samples. This original SPE method was modified by using methanol instead of acetone as an eluting agent, because we observed that methanol eluted fewer matrix interferences than acetone, thus obtaining a better analytical response for the studied analytes in real samples. The method was validated, and the following analytical features were obtained: recovery, precision (as relative standard deviation, RSD), limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ).

Matrix-matched calibration was used in analysis to compensate for matrix effects (ME). In all cases, linearity was observed, with coefficients of determination ( $R^2$ ) consistently higher than 0.99. As seen in Table 3, the matrix effect showed signal suppression in both samples, being significantly higher in wastewater samples than in tap water samples, because of



**Fig. 3** Extracted ion chromatograms (EICs) of the estrogens E3, 16-OHE1, E2, EE2, E1 4-OHE1, 2-OHE1, 4-OHE2, and 2-OHE2 at  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . **a** Doubly protonated ( $m/z = 377.1362$  and  $378.1438$  for 2/4-OHE1 and 2/4-OHE2, respectively) and **b** singly protonated ( $m/z = 753.26$  and  $755.28$  for 2/4-OHE1 and 2/4-OHE2, respectively)

**Table 3** Analytical features and matrix effect (ME) of the method in tap water and wastewater effluent

Analyte	Tap water					Wastewater effluent				
	Calibration equation ( $n = 5$ )	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ME (%)	Calibration equation ( $n = 5$ )	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	ME (%)
E3	$y = 1,794.571x - 133.558$	0.999	0.002	0.006	-4.1	$y = 738.807x - 133.074$	0.995	0.004	0.012	-60.5
16-OHE1	$y = 2,068.666x - 173.550$	0.999	0.002	0.007	-5.0	$y = 562.227x - 107.755$	0.990	0.004	0.013	-74.4
E2	$y = 3,513.474x - 212.032$	0.998	0.001	0.003	-6.9	$y = 594.641x + 50.626$	0.995	0.002	0.006	-84.2
EE2	$y = 2,310.595x - 142.828$	0.999	0.001	0.003	-4.3	$y = 458.441x + 58.471$	0.997	0.002	0.006	-81.0
E1	$y = 2,801.420x - 115.223$	0.999	0.001	0.003	-3.1	$y = 733.629x - 74.388$	0.996	0.002	0.006	-74.6
4-OHE2	$y = 397.628x - 13.144$	0.999	0.005	0.016	-4.4	$y = 83.499x - 46.36$	0.996	0.008	0.026	-79.9
2-OHE2	$y = 1,406.450x - 42.239$	0.999	0.002	0.007	-7.8	$y = 342.868x - 49.102$	0.990	0.003	0.009	-77.5
4-OHE1	$y = 490.983x - 34.051$	0.999	0.010	0.032	-7.9	$y = 105.888x - 14.817$	0.990	0.017	0.058	-80.1
2-OHE1	$y = 1,849.681x + 50.314$	0.999	0.005	0.019	-4.2	$y = 526.329x - 36.738$	0.995	0.008	0.024	-72.7
(20,21)- $^{13}\text{C}_2$ EE2	$y = 2,255.966x - 171.380$	0.999	0.001	0.003	-4.6	$y = 520.586x + 628$	0.996	0.002	0.006	-77.9

**Table 4** Concentration found, recovery (Re), and RSD values for each compound treated with SPE (C18) methodology in tap water

Analyte	Concentration found ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Added ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ )		Added ( $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ )		Added ( $4.0 \mu\text{g L}^{-1}$ )	
		Re (%) ( $n = 6$ )	RSD (%)	Re (%) ( $n = 6$ )	RSD (%)	Re (%) ( $n = 6$ )	RSD (%)
E3	< LOD	90.3	9.7	92.6	13.6	106.7	15.5
16-OHE1	< LOD	104.1	15.5	98.2	9.7	110.5	10.4
E2	< LOD	107.6	7.5	91.4	6.7	97.4	6.8
EE2	< LOD	107.6	7.5	91.8	11.6	98.9	8.9
E1	< LOD	92.8	5.5	90.2	7.3	105.9	13.8
4-OHE2	< LOD	97.0	7.3	97.1	2.8	114.3	4.3
2-OHE2	< LOD	106.5	15.6	98.9	8.9	92.4	6.3
4-OHE1	< LOD	94.6	7.7	94.8	4.3	105.0	4.1
2-OHE1	< LOD	97.6	11.1	107.7	8.1	86.5	4.5
(20,21)- $^{13}\text{C}_2\text{EE2}$	–	98.6	6.8	92.7	11.7	105.8	15.7

the high complexity of the wastewater matrix. The ME and recoveries of (20,21)- $^{13}\text{C}_2\text{EE2}$  were similar (no higher than 10%) to those obtained for this group of compounds. In this context, (20,21)- $^{13}\text{C}_2\text{EE2}$  could be used as a standard surrogate for the routine analysis of these analytes.

The LODs were between 1 and 10  $\text{ng L}^{-1}$  in tap water and between 1 and 17  $\text{ng L}^{-1}$  in wastewater effluent, while the LOQs were between 3 and 32  $\text{ng L}^{-1}$  and between 3 and 58  $\text{ng L}^{-1}$  for tap water and wastewater effluent, respectively, as shown in Table 3. The obtained limits were lower than those reported by Yan et al. [17], even though in the present case, either a lower sample volume or lower concentration factor was used. In addition, the proposed methodology was faster and adequate for routine analysis.

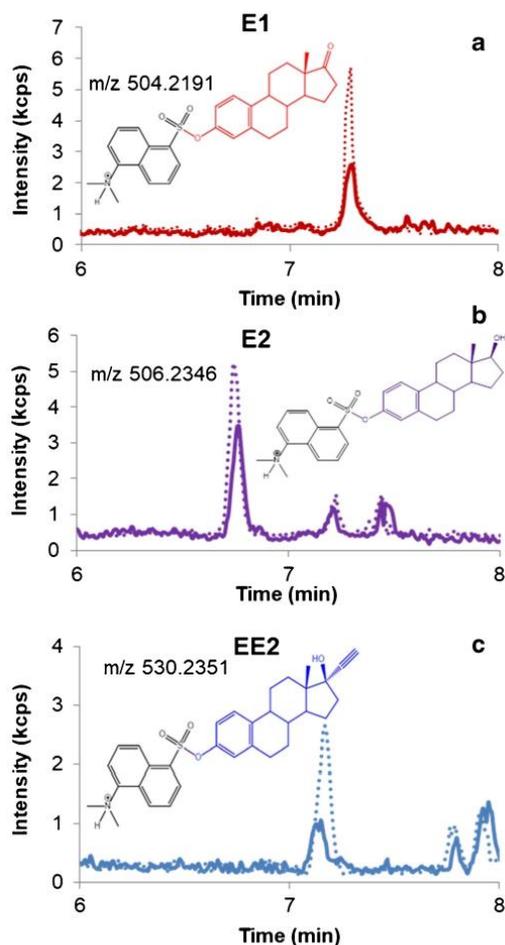
The recoveries were between 86.5% and 114.3%, with RSD values below than 15.6%, for analytes in tap water (Table 4). In wastewater effluent, the recoveries and RSD values were between 85.4% and 118.7% and between 4.7% and 16.3%, respectively (Table 5).

The analytical features obtained for the proposed method were similar to those obtained in tap water, river water, and wastewater in previous reports for E1, E2, E3, EE2, and 16-OHE1 [11–13, 17]; however, the detection limits [11–13] were lower because the previous authors used a sample volume of 1 L, whereas a volume of 0.05 L was used in our study. The main advantage of the current method is that the analytes 2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2 were additionally included and validated, while also affording good analytical features.

In the analysis of real samples, the analytes were not detected in tap water, but in wastewater, three compounds were found (E1, E2, and EE2) in the following concentrations: E1 =  $7 \pm 1 \text{ ng L}^{-1}$ , E2 =  $41 \pm 1 \text{ ng L}^{-1}$ , and EE2 < LOQ, as shown in the chromatograms in Fig. 4. The hydroxylated metabolites (2-OHE1, 4-OHE1, 2-OHE2, and 4-OHE2) were not found in wastewater effluent, possibly because of their lower chemical stability compared with that of their precursors, E1 and E2 [23], which can undergo degradation and transformation in complex samples, such as wastewater effluent.

**Table 5** Concentration found, recovery (Re), and RSD values for each compound treated with SPE (C18) methodology in effluent from a WWTP

Analyte	Concentration found ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Added ( $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ )		Added ( $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ )		Added ( $4.0 \mu\text{g L}^{-1}$ )	
		Re (%) ( $n = 6$ )	RSD (%)	Re (%) ( $n = 6$ )	RSD (%)	Re (%) ( $n = 6$ )	RSD (%)
E3	< LOD	98.1	15.3	97.5	14.8	100.1	10.5
16-OHE1	< LOD	105.3	5.6	99.5	13.9	101.2	8.3
E2	$0.041 \pm 0.01$	118.7	7.4	114.6	7.3	99.3	4.7
EE2	< LOQ	103.3	13.0	114.5	14.8	99.3	4.7
E1	$0.007 \pm 0.001$	85.4	12.6	98.7	16.3	100.5	8.7
4-OHE2	< LOD	103.3	11.8	103.6	10.8	93.2	9.6
2-OHE2	< LOD	99.8	12.7	99.9	15.4	103.9	5.7
4-OHE1	< LOD	99.9	14.5	100.0	10.6	98.5	9.2
2-OHE1	< LOD	99.8	12.7	99.9	15.4	103.9	5.7
(20,21)- $^{13}\text{C}_2\text{EE2}$	–	108.3	5.4	106.6	5.3	98.0	5.3



**Fig. 4** Extracted ion chromatograms (EICs) of estrogens found in wastewater effluent, **a** E1 = 7 ng L<sup>-1</sup>, **b** E2 = 41 ng L<sup>-1</sup>, and **c** EE2 < LOQ. Dotted lines are the chromatograms of the fortified sample at 0.01 µg L<sup>-1</sup>, and continuous lines are the chromatograms of the sample

On the basis of the discussion above, the developed methodology allows the rapid determination of estrogenic compounds in real samples. The ability to detect and quantify the analytes depends on the level of complexity of the matrix; therefore, it is adequate to use a standard surrogate in the analysis of samples of greater complexity.

## Conclusion

In this study, the chromatographic separation of nine estrogens was performed by LC-ESI-TOF/MS more rapidly than in

previous reported methods. Derivatization, efficient dual-ESI ionization in positive mode, and TOF/MS analysis resulted in a very sensitive and high-resolution analysis. For the catechol estrogens 2-OHE1, 4-OHE1, and 2- and 4-OHE2, the MS signals 377.1362, 377.1362, 378.1436, and 378.1438 were found, respectively, which have not been reported previously. These signals are more abundant than the previously reported signals for these hydroxylated estrogens in the conditions used, thus demonstrating considerably improved detection sensitivity. This improved sensitivity is very important considering that these are the compounds most closely related to the development of different types of cancers; our methodology could help to improve the detection of these compounds.

The methodology was validated using SPE as a sample preparation method, which showed good analytical features for all the compounds in tap water and wastewater samples. On the other hand, because the composition of wastewater samples can vary depending on the location where they were collected, the complexity of the matrix may make it necessary to use a surrogate standard to adequately quantify the estrogen concentration.

**Acknowledgements** The authors would like to thank FONDECYT (Regular Grant 1180742) and FONDEQUIP (Project EQM130119) for financial support. LH would like to thank CONICYT for his doctoral fellowship (21140560) and MBH thank to CONICYT (PA179170018).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

1. Kozłowska-Tylingo K, Namieśnik J, Górecki T. Determination of estrogenic endocrine disruptors in environmental samples—a review of chromatographic methods. *Crit Rev Anal Chem.* 2010;40:194–201. <https://doi.org/10.1080/10408347.2010.490488>.
2. Chen HC, Kuo HW, Ding WH. Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. *Chemosphere.* 2009;74:508–14. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.089>.
3. Liu ZH, Lu GN, Yin H, Dang Z, Littier H, Liu Y. Sample-preparation methods for direct and indirect analysis of natural estrogens. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2015;64:149–64. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.09.003>.
4. Reddy S, Iden CR, Brownawell BJ. Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005;77:7032–8. <https://doi.org/10.1021/ac050699x>.
5. Kuster M, José López De Alda M, Barceló D. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2004;23:790–8. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.08.007>.
6. Corrotea Y, Aguilera N, Honda L, Richter P. Determination of hormones in wastewater using rotating disk sorptive extraction and gas

- chromatography – mass spectrometry. *Anal Lett.* 2015;2719:1344–58. <https://doi.org/10.1080/00032719.2015.1098653>.
7. Fang TY, Praveena SM, deBurbure C, Aris AZ, Ismail SNS, Rasdi I. Analytical techniques for steroid estrogens in water samples - a review. *Chemosphere.* 2016;165:358–68. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.09.051>.
  8. Huang B, Wang B, Ren D, Jin W, Liu J, Peng J, et al. Occurrence, removal and bioaccumulation of steroid estrogens in Dianchi Lake catchment, China. *Environ Int.* 2013;59:262–73. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.06.018>.
  9. Beck I-C, Bruhn R, Gandrass J, Ruck W. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *J Chromatogr A.* 2005;1090:98–106. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.07.013>.
  10. Gao G, Li S, Li S, Wang Y, Zhao P, Zhang X, et al. A combination of computational–experimental study on metal-organic frameworks MIL-53(A) as sorbent for simultaneous determination of estrogens and glucocorticoids in water and urine samples by dispersive micro-solid-phase extraction coupled to UPLC-MS/MS. *Talanta.* 2018;180:358–67. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.071>.
  11. Wang HX, Zhou Y, Jiang QW. Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchem J.* 2012;100:83–94. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.09.010>.
  12. Liu S, Ying G-G, Zhao J-L, Chen F, Yang B, Zhou L-J, et al. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2011;1218:1367–78. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.014>.
  13. Lien G-W, Chen C-Y, Wang G-S. Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations. *J Chromatogr A.* 2009;1216:956–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.023>.
  14. Shareef A, Angove MJ, Wells JD. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyl dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *J Chromatogr A.* 2006;1108:121–8. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.12.098>.
  15. López De Alda MJ, Barceló D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2000;892:391–406. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00068-6).
  16. Labadie P, Hill EM. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry. Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007;1141:174–81. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.045>.
  17. Yan W, Zhao L, Feng Q, Wei Y, Lin J-M. Simultaneous determination of ten estrogens and their metabolites in waters by improved two-step SPE followed by LC–MS. *Chromatographia.* 2009;69:621–8. <https://doi.org/10.1365/s10337-009-0957-7>.
  18. Qin F, Zhao YY, Sawyer MB, Li X-F. Column-switching reversed phase-hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of free estrogens and their conjugates in river water. *Anal Chim Acta.* 2008;627:91–8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.07.036>.
  19. Salvador A, Moretton C, Piram A, Faure R. On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants. *J Chromatogr A.* 2007;1145:102–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.055>.
  20. Li X, Franke AA. Improved profiling of estrogen metabolites by orbitrap LC/MS. *Steroids.* 2014;99:84–90. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.12.005>.
  21. Khedr A, Alahdal AM. Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis of ten estrogen metabolites at sub-picogram levels in breast cancer women. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2016;1031:181–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.07.051>.
  22. Farlow DW, Xu X, Veenstra TD. Quantitative measurement of endogenous estrogen metabolites, risk-factors for development of breast cancer, in commercial milk products by LC-MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2009;877:1327–34. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.032>.
  23. Xu X, Veenstra TD, Fox SD, Roman JM, Issaq HJ, Falk R, et al. Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005;77:6646–54. <https://doi.org/10.1021/ac050697c>.
  24. Xu X, Keefer LK, Ziegler RG, Veenstra TD. A liquid chromatography–mass spectrometry method for the quantitative analysis of urinary endogenous estrogen metabolites. *Nat Protoc.* 2007;2:1350–5. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.176>.
  25. Tomšiková H, Aufartová J, Solich P, Nováková L, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ. High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *TrAC - Trends Anal Chem.* 2012;34:35–57. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.11.008>.
  26. Huang J, Sun J, Chen Y, Song Y, Dong L, Zhan Q, et al. Analysis of multiplex endogenous estrogen metabolites in human urine using ultra-fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry: a case study for breast cancer. *Anal Chim Acta.* 2012;711:60–8. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.058>.
  27. Bussy U, Chung-Davidson YW, Buchinger TJ, Li K, Li W. High-sensitivity determination of estrogens in fish plasma using chemical derivatization upstream UHPLC–MS/MS. *Steroids.* 2017;123:13–9. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.04.003>.
  28. Ferreira MS, Arruda AMM, Pepi GT, Martho AC, Maximiano PM, Ricci LSOBO, et al. High sensitivity method validated to quantify estradiol in human plasma by LC–MS/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017;1064:109–14. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.005>.
  29. Huang HJ, Chiang PH, Chen SH. Quantitative analysis of estrogens and estrogen metabolites in endogenous MCF-7 breast cancer cells by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2011;879:1748–56. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.04.020>.
  30. Benijts T, Dams R, Günther W, Lambert W, De Leenheer A. Analysis of estrogenic contaminants in river water using liquid chromatography coupled to ion trap based mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2002;16:1358–64. <https://doi.org/10.1002/rcm.716>.
  31. Anari MR, Bakhtiar R, Zhu B, Huskey S, Franklin RB, Evans DC. Derivatization of ethinylestradiol with dansyl chloride to enhance electrospray ionization: application in trace analysis of ethinylestradiol in rhesus monkey plasma. *Anal Chem.* 2002;74:4136–44. <https://doi.org/10.1021/ac025712h>.
  32. Tan X, Li Z, Deng L, Zhao S, Wang M. Analysis of 13 kinds of steroid hormones in raw milk using modified QuEChERS method combined with UPLC-QTOF-MS. *J Integr Agric.* 2016;15:2163–74. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61386-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61386-2).
  33. Fuentes E, Báez ME, Diaz J. Microwave-assisted extraction at atmospheric pressure coupled to different clean-up methods for the determination of organophosphorus pesticides in olive and avocado oil. *J Chromatogr A.* 2009;1216:8859–66. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.082>.