



UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Dipartimento di Chimica

Applicazione di polimeri porosi per estrazione e successiva
determinazione HPLC-MS/MS di ormoni steroidei in campioni di
acqua potabile e latte

Relatore:

Prof. Andrea Speltini

Correlatore:

Dott.ssa Francesca Merlo

Tesi Sperimentale di
Elisa Sofia Sammatrice

Anno Accademico 2023/2024

INDICE

1. INTRODUZIONE	3
1.1 Ormoni steroidei	3
1.1.1 Estrogeni	7
1.1.2 Progestinici	7
1.1.3 Androgeni	8
1.1.4 Glucocorticoidi	9
1.2 Ormoni steroidei come inquinanti	11
1.3 Metodi analitici	17
1.3.1 Tecniche di estrazione e <i>clean-up</i>	18
1.3.2 PolyHIPE	21
2. SCOPO DEL LAVORO DI TESI	23
3. MATERIALI E METODI	24
3.1 Reagenti, strumentazione e materiali	24
3.1.1 Reagenti	24
3.1.2 Strumentazione	25
3.1.3 Materiali	26
3.2 Sintesi Polimeri	26
3.3 Campioni utilizzati	29
3.3.1 Campioni acquosi	29
3.3.2 Campioni di latte	30
3.4 Procedura SPE	31
3.4.1 Matrice acqua	32
3.4.2 Matrice latte	32
3.5 Analisi strumentale	33
3.5.1 HPLC-UV	34
3.5.2 HPLC-MS/MS	37
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	42
4.1 Screening dei polimeri	42
4.2 Sviluppo della procedura SPE in acqua	49
4.3 Sviluppo della procedura SPE in latte	56
4.4 Valutazione della <i>greenness</i> dei metodi sviluppati	71
CONCLUSIONI	74
BIBLIOGRAFIA	76

1. INTRODUZIONE

1.1 Ormoni steroidei

Gli ormoni sono messaggeri chimici che mediano lo scambio di informazioni di tipo regolatorio tra le diverse regioni del corpo in situazioni che richiedono un'azione diffusa e duratura. Questo tipo di comunicazione affianca quella di natura nervosa che garantisce, invece, una trasmissione di messaggi più celere e immediata. Il corretto funzionamento dei due sistemi, nonché la loro interazione, risulta, quindi, indispensabile al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo in risposta ad alterazioni dell'ambiente sia interno sia esterno a esso (Hiller-Sturmhöfel S e Bartke A, 1998).

In base alla struttura molecolare e, di conseguenza, anche alle proprietà chimiche, gli ormoni possono essere suddivisi in diverse classi: polipeptidi, steroidi, ammine ed eicosanoidi (Scott W N, 2010).

Gli steroidi, nello specifico, sono derivati del colesterolo sintetizzati dalle gonadi (ovaie e testicoli) e dalla corteccia surrenale, ghiandole che, sotto lo stimolo di segnali specifici, rilasciano tali molecole in circolo e per questo vengono definite 'endocrine' (Constanti A *et al*, 1998). Ulteriori modifiche nella loro struttura e quindi nella loro funzione possono aver luogo in alcuni organi tra cui prostata, fegato e cervello (Walter L *et al*, 2011).

Una volta immessi nel flusso sanguigno, gli ormoni vengono trasportati sottoforma di complessi stabili con proteine plasmatiche fino alle cellule bersaglio che possono essere poche e specifiche o numerose e diffuse in tutto il corpo. Tali cellule contengono recettori per gli ormoni, generalmente di natura proteica e localizzati sulla superficie cellulare o all'interno della cellula stessa, nel citoplasma o nel nucleo. Il tipo di interazione messaggero-recettore e il meccanismo d'azione esercitato sul bersaglio dipendono dalla natura chimica dell'ormone (Hiller-Sturmhöfel S e Bartke A, 1998). Gli steroidi, in particolare, essendo tra gli ormoni più piccoli e liposolubili, sono in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico per interagire con proteine recettoriali poste all'interno delle cellule target (Scott W N, 2010). Gli ormoni non steroidei, invece, idrosolubili non possono attraversare la membrana cellulare, dunque legano specifici recettori posti su di essa e si avvalgono di un secondo messaggero intracellulare per trasmettere il segnale all'interno della cellula.

Il legame dell'ormone al suo recettore innesca, poi, una cascata di reazioni biochimiche che termina con la modifica delle funzioni e delle attività del bersaglio cellulare. In particolare, nel caso degli ormoni steroidei si tratta di un meccanismo a doppio stadio. Anzitutto è bene specificare che tutte le cellule risultano permeabili ai vari ormoni steroidei, ma soltanto quelle dotate di un recettore intracellulare opportunamente stereospecifico riescono a trattenere un determinato ormone nel citosol impedendone la rapida diffusione al di fuori della cellula.

Il legame dell'ormone costituisce, quindi, il primo stadio del meccanismo, dal quale scaturisce un cambiamento nella struttura terziaria/quaternaria del recettore stesso che porta alla formazione di un complesso attivato soggetto a un trasporto endonucleare. Tale complesso, nel secondo stadio, sarà poi in grado di agire sulla trascrizione genica avviando uno spettro di processi responsabili della manifestazione delle risposte ormonali. Questo accade perché i recettori coinvolti sono fattori di trascrizione ligando-dipendenti ed esercitano i loro effetti modificando l'espressione di geni specifici del genoma. Svolgono quindi ruoli essenziali in vari processi fisiologici tra cui lo sviluppo, il comportamento, il metabolismo e la crescita (Cole TJ *et al*, 2019).

L'intero meccanismo deve poter essere reversibile e, infatti, le interazioni steroide-recettore e recettore-accettore genomico, nonostante l'elevata affinità, non sono permanenti in quanto di natura non covalente (Mainwaring WI, 1975).

Gli ormoni steroidei biologicamente attivi hanno strutture strettamente correlate tra loro contenenti un sistema tetraciclico di atomi di carbonio (ciclopentano-peridrofenantrene, Figura 1). Questo è dovuto al fatto che il primo passaggio nella steroidogenesi è comune e consiste nella conversione del colesterolo in pregnenolone da parte di un singolo enzima (P450scc). In particolare, il colesterolo è costituito da 3 anelli a 6 atomi di carbonio (A, B e C) e da un anello a 5 atomi di carbonio (D), fusi in una configurazione trans grossolanamente piana con una catena idrofobica a 6 atomi di carbonio in posizione 17 (Attanasio R *et al*, 2008). L'enzima P450scc agisce sul colesterolo operando il taglio della catena laterale e trasformandolo in pregnenolone. Questo è caratterizzato da un doppio legame tra gli atomi di carbonio 5 e 6 nell'anello B che viene successivamente spostato agli atomi di carbonio 4 e 5 nell'anello A (Miller WL e Auchus RJ, 2010).

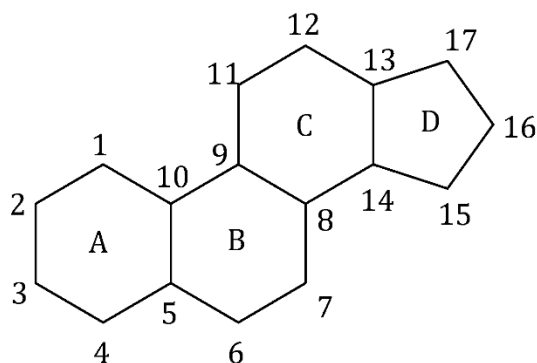


Figura 1. Ciclopentano-peridrofenantrene

Esiste, poi, una fine regolazione mediata da determinati sistemi enzimatici e recettori per gli ormoni stimolanti che garantisce la specificità della sintesi nei diversi organi steroidogenici e dalla quale risulta il tipo di ormone da produrre. I diversi steroidi si differenziano, infatti, per la presenza di doppi legami tra determinate coppie di atomi di carbonio e, quindi, per il grado di insaturazione, ma anche per la sostituzione di atomi di idrogeno e/o per l'aggiunta di catene laterali.

Ne risulta la produzione di 3 tipi di composti da parte delle ghiandole steroide-secermenti (Figura 2):

- Pregnani, a 21 atomi di carbonio, con una catena etilica;
- Androstani, a 19 atomi di carbonio, con un gruppo metilico;
- Estrani, a 18 atomi di carbonio, privi di un gruppo metilico in posizione 10 (Attanasio R *et al*, 2008).

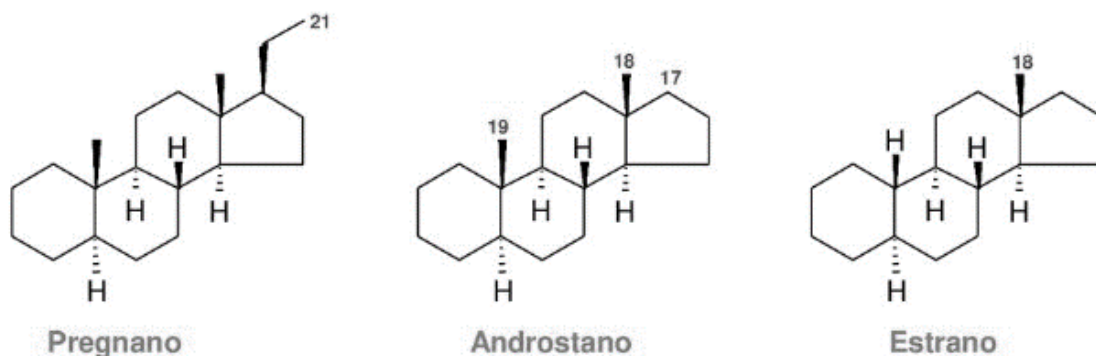


Figura 2. Strutture principali degli steroidi

Queste diversità giustificano le specifiche interazioni con i vari costituenti cellulari e, pertanto, in relazione al contesto ormonale, si riconoscono quattro diverse famiglie di

ormoni steroidei a cui appartengono i 15 analiti in oggetto nel presente lavoro di tesi (Figura 3):

- Estrogeni (17 β -estradiolo, 17 α -etinil-estradiolo ed estrone);
 - Progestinici (progesterone, medrossiprogesterone acetato ed idrossiprogesterone);
 - Androgeni (testosterone);
 - Glucocorticoidi (cortisone, idrocortisone, prednisone, prednisolone, betametazone, desametazone, triamcinolone acetone e fluocinolone acetone).
- Questi insieme alla famiglia dei mineralcorticoidi sono collettivamente denominati corticosteroidi.

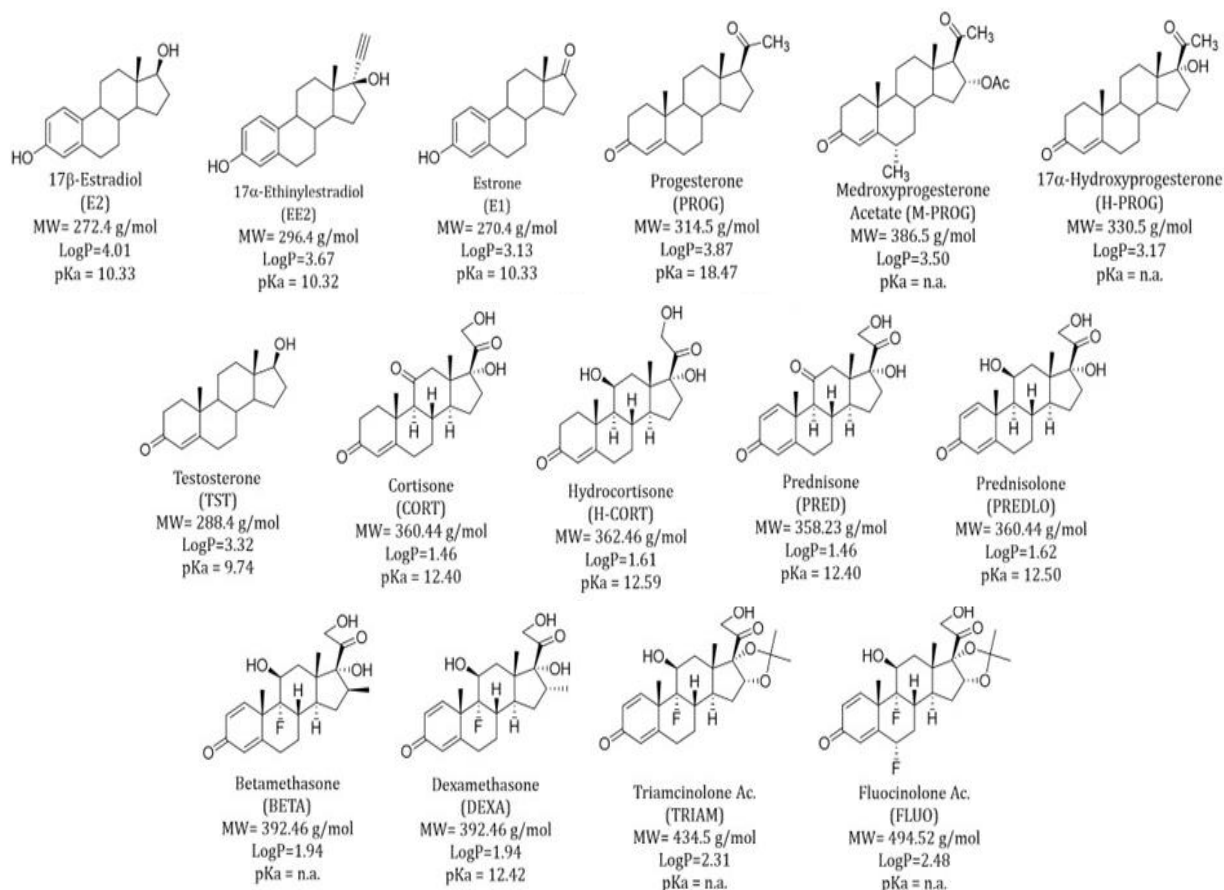


Figura 3. Analiti e relativo peso molecolare (MW), logP (coefficiente di ripartizione, indice del livello di idrofilia/idrofobia di una sostanza chimica) e pKa (costante di dissociazione acida).

1.1.1 Estrogeni

Gli estrogeni derivano dall'estrano, pertanto, presentano un nucleo a 18 atomi di carbonio e hanno la caratteristica di avere l'anello A di tipo aromatico e di possedere un gruppo idrossilico in posizione C3. Gli estrogeni costituiscono, insieme ai progestinici, gli ormoni sessuali femminili. Sono prodotti principalmente dalle ovaie e in quantità minori dalle ghiandole surrenali e dalla placenta nelle donne in gravidanza. In post-menopausa, invece, poiché la sintesi ovarica precipita, gli estrogeni presenti in circolo derivano unicamente dalla conversione di androgeni ovarici e surrenalici che ha sede nei tessuti periferici, tra cui il tessuto adiposo e l'epidermide. Gli estrogeni si trovano in piccole quantità anche nell'uomo in quanto questo stesso processo va ad interessare gli androgeni testicolari (Abdulummeen A *et al*, 2018).

L'estrogeno principale è il 17 β -estradiolo (E2) che, insieme all'estrone (E1), prodotto in misura minore, favorisce e coordina lo sviluppo ed il mantenimento dei caratteri sessuali femminili primari e secondari. Questi ormoni, inoltre, stimolano la crescita e la maturazione scheletrica in pubertà (Hiller-Sturmhöfel S e Bartke A, 1998).

Esistono, poi, gli estrogeni semisintetici, come il 17 α -etinil-estradiolo (EE2), derivato dell'E2, che entrano nella composizione di miscele ad attività anticoncezionale. Gli estrogeni naturali e non trovano impiego non solo in campo ginecologico, ma anche in alcuni tumori e altre manifestazioni morbose.

1.1.2 Progestinici

I progestinici derivano dal pregnano e sono, quindi, caratterizzati da uno scheletro a 21 atomi di carbonio che presenta un sistema chetonico α , β -insaturo in C3 e un gruppo carbonilico in C20 (Norman AW e Henry HL, 2013). Tali composti costituiscono l'altro tipo di ormone sessuale femminile e prendono il nome dal loro ruolo nel mantenimento della gravidanza (pro-gestazione).

L'ormone progestinico naturale principale è il progesterone (PROG). Le ovaie lo producono durante una certa fase del ciclo mestruale, mentre la placenta ne diventa principale fonte in gravidanza. Inoltre, una piccola quota viene prodotta anche dalla ghiandola surrenale e, nell'uomo, dalle cellule del Leydig nei testicoli.

Nel dettaglio, nella seconda metà del ciclo mestruale, il corpo luteo, derivante dalla rottura del follicolo ovarico dell'ovaio, secerne progesterone per predisporre l'endometrio all'impianto di un ovulo fecondato (Abdulummeen A *et al*, 2018). I progestinici, quindi, insieme agli estrogeni, causano cambiamenti nel rivestimento uterino in preparazione all'annidamento dell'embrione e stimolano, poi, lo sviluppo delle ghiandole mammarie per l'allattamento (Hiller-Sturmhöfel S e Bartke A, 1998).

Un altro progestinico trattato come analita in questo lavoro è il 17α -idrossi-progesterone (H-PROG), ormone prodotto nel surrene e nelle gonadi a partire dal progesterone tramite l'enzima 17-idrossilasi e che non ha un ruolo fisiologico definito eccetto quello di precursore (Attanasio R *et al*, 2008).

Il progesterone viene adoperato principalmente come metodo contraccettivo in associazione con gli estrogeni per la cura di disturbi endometriali e da menopausa. Tuttavia, poiché a causa di un'importante inattivazione epatica ne risulta una sua ridotta biodisponibilità orale, la ricerca farmacologica si è sempre più indirizzata verso lo sviluppo di progestinici sintetici. Tra questi figura il medrossiprogesterone acetato (M-PROG), derivato sintetico del 17α -idrossi-progesterone, che presenta in più un metile in posizione C6 introdotto per bloccare l'idrossilazione epatica (Stanczyk FZ e Bhavnani BR, 2014).

1.1.3 Androgeni

Gli androgeni derivano dall'androstano e possiedono, infatti, una struttura molecolare a 19 atomi di carbonio caratterizzata da un gruppo chetonico in C3 e priva di due catene laterali di carbonio in C17 (Norman AW e Henry HL, 2013). Tali ormoni rappresentano, analogamente ad estrogeni e progestinici nella donna, gli ormoni sessuali nell'uomo. Gli androgeni sono prodotti principalmente dalle cellule interstiziali dei testicoli e in minore quantità dalla corteccia surrenale. Si ritrovano anche nella donna per secrezione diretta dall'ovaio e per conversione periferica a partire dagli androgeni surrenalici (Attanasio R *et al*, 2008).

Il principale androgeno circolante è il testosterone (TST). Questo, insieme ai suoi metaboliti bioattivi, favorisce il corretto sviluppo e mantenimento della funzione

riproduttiva maschile insieme alla stimolazione dei caratteri sessuali secondari. Gli androgeni, inoltre, contribuiscono allo stato anabolico dei tessuti somatici, in particolare ossa e muscolatura scheletrica, e stimolano la produzione di globuli rossi (Abdulummeen A *et al*, 2018).

Il testosterone è usato clinicamente a dosi fisiologiche per la terapia sostitutiva degli androgeni, ad esempio in caso di ipogonadismo, ma talvolta viene somministrato a dosi più elevate, ad esempio per prevenire il deperimento muscolare in soggetti confinati a letto. A questo proposito, oltre all'ormone naturale, possono essere adoperati anche ormoni di sintesi suoi derivati, ovvero i cosiddetti steroidi sintetici anabolizzanti. Tuttavia, negli anni i benefici di queste sostanze sono stati sempre più sfruttati anche a scopi non medici. In particolare, per migliorare la competitività nello sport si è diffuso l'uso illecito di dosaggi superiori a quelli terapeutici (doping) che, a fronte di un miglioramento delle performance espone maggiormente al rischio di gravi effetti collaterali (Norman AW e Henry HL, 2013).

1.1.4 Glucocorticoidi

I glucocorticoidi derivano dal pregnano, dunque, si tratta di composti a 21 atomi di carbonio e possiedono un'insaturazione tra C4 e C5, un gruppo chetonico in C3 e un gruppo idrossilico in C17 (Norman AW e Henry HL, 2013). Il loro nome è giustificato dal fatto che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione del metabolismo degli zuccheri, con un'influenza anche su quello di proteine e lipidi, in risposta a segnali sia fisiologici che da stress. Questi ormoni esercitano, pertanto, un controllo sull'approvvigionamento energetico e, inoltre, sono noti per le loro proprietà antinfiammatorie e immunosoppressive ad ampio spettro. A questo proposito risulta rilevante l'influenza sulla loro attività biologica della presenza e/o del diverso orientamento spaziale di specifici gruppi funzionali. Questi ormoni vengono esclusivamente prodotti dalla corticale del surrene insieme ai mineralcorticoidi che espletano primariamente un'azione di controllo sul bilancio idroelettrolitico e quindi sulla regolazione della pressione sanguigna (Abdulummeen A *et al*, 2018; Goulding NJ e Flower RJ, 2001).

Il cortisolo, chiamato anche idrocortisone (H-CORT), è il principale tra questi ormoni glicoattivi. Esso riveste un ruolo essenziale nel sistema endocrino umano poiché influenza diversi processi fisiologici e, soprattutto, ricopre un ruolo centrale in condizioni di stress fisico ed emotivo. Il suo precursore biologicamente inattivo è il cortisone (CORT), dal quale si ottiene, sia fisiologicamente nel fegato che per sintesi, per riduzione dell'11-cheto gruppo.

Sin dalla loro scoperta queste sostanze sono state ampiamente utilizzate in campo medico, ma col tempo si è puntato a migliorarne le proprietà farmacologiche e a limitarne gli effetti collaterali sul metabolismo apportando modifiche alla struttura chimica base del cortisolo. A oggi, infatti, si parla di glucocorticoidi sintetici il cui impiego è subordinato alla diversa specificità e/o potenza dell'interazione con i recettori.

Attraverso l'introduzione di un doppio legame addizionale in posizione 1,2, come nel prednisone (PRED) e nel prednisolone (PREDLO), si ottiene un'attività antinfiammatoria maggiore di circa 4 volte rispetto all'idrocortisone, per un aumento del rapporto tra la potenza gluco/mineralcorticoide. Questi composti, oltretutto, sono metabolizzati più velocemente e, pertanto, vengono adoperati come antireumatici e antiallergici a dosi inferiori rispetto a quelle di cortisolo eventualmente necessarie.

Il triamcinolone acetone (TRIAM) si ottiene, invece, introducendo oltre al doppio legame tra C1 e C2, un fluoro in posizione 9 α che aumenta sia la capacità antinfiammatoria di circa 11 volte, ma anche l'attività mineralcorticoide, e un gruppo OH in posizione 16 α che controbilancia questa seconda attività.

Il desametasone (DEXA) e il betametasone (BETA) presentano un gruppo metilico al posto dell'idrossile del triamcinolone in C16, orientato in α nel primo e in β nel secondo, che riduce ulteriormente l'attività mineralcorticoide e li rende degli agenti antinfiammatori 25 volte più potenti del cortisolo.

Infine, tra gli analiti di questa ricerca figura anche il fluocinolone acetone (FLUO), anch'esso caratterizzato da un fluoro in α su C9, ma reso acetone come il triamcinolone e, quindi, più liposolubile rispetto agli altri derivati. Questo composto si presenta chiaramente più assorbibile a livello transdermico e infatti trova largo impiego a livello dermatologico.

Col tempo si è dunque riusciti a dare origine a derivati con attività glucocorticoide e mineralcorticoide distinte. Per molti di essi è stato possibile minimizzare gli effetti sugli

elettroliti pur utilizzando dosi elevate. Tuttavia, i glucocorticoidi di sintesi più potenti come antinfiammatori, nonché quelli con durata d'azione più lunga, saranno anche quelli con maggiori reazioni metaboliche avverse. Non è ancora stato possibile, infatti, separare le due attività, probabilmente perché mediate dagli stessi recettori (Goulding NJ e Flower RJ, 2014; Norman AW e Henry HL, 2013).

1.2 Ormoni steroidei come inquinanti

Gli ormoni steroidei figurano tra quelle sostanze chimiche definite Contaminants of Emerging Concern (CECs), ovvero contaminanti emergenti, la cui ricerca nelle matrici ambientali e alimentari è fondamentale, considerati i potenziali impatti negativi sulla salute umana, sugli animali e sull'ambiente, anche quando presenti a livello di traccia ($\mu\text{g/L}$) e ultratraccia (Unnikrishnan A *et al*, 2024). Si definiscono emergenti non necessariamente perché di recente introduzione, bensì perché si tratta di sostanze biologicamente attive che solo negli ultimi anni stanno destando preoccupazione.

La loro pericolosità è attualmente oggetto di studio in virtù della definizione di nuovi standard di qualità ambientale e di una valutazione più approfondita dei rischi per la salute. Recenti studi, infatti, hanno dimostrato che gli ormoni steroidei, sia naturali sia sintetici, compresi i loro metaboliti, essendo composti bioattivi possono alterare la funzionalità del sistema endocrino agendo da interferenti anche in organismi non-target. Se ne associa, pertanto, un rischio in termini di compromissione dei meccanismi di sintesi, escrezione, trasporto e catabolismo degli omologhi endogeni, che impatta primariamente su apparato riproduttivo, pancreas e tessuto adiposo. È stata studiata e dimostrata anche la loro capacità di generare danni a lungo termine e quindi a distanza di generazioni, soprattutto nell'ambito della riproduzione (Ojogboro JO *et al*, 2021).

Gli steroidi vengono sempre più frequentemente ricercati a causa del crescente impiego in medicina umana e veterinaria, cui segue un rilascio diretto o indiretto nel comparto ambientale, soprattutto quello acquatico. Negli ambienti acquatici le contaminazioni ne minacciano l'equilibrio ecosistemico, anche perché spesso sono dovute non a singoli ormoni, ma a loro miscele; in questi casi è stato dimostrato che i rischi possono aumentare in modo sinergico pure quando la singola concentrazione è al di sotto del limite al quale non causerebbe un effetto apprezzabile. Attualmente gli ormoni steroidei che destano maggiore preoccupazione ambientale sono estrogeni e progestinici rispetto agli altri

gruppi (Gao P *et al*, 2024). La loro presenza, rilevata in acque superficiali, di falda e potabili in tutto il mondo è riconducibile principalmente a una non efficiente rimozione negli impianti di trattamento delle acque reflue (Unnikrishan A *et al*, 2024). Dalle fognature urbane questi composti non sono completamente abbattuti negli impianti di depurazione e, quindi, possono raggiungere le acque superficiali. Tali acque, poi, non solo raggiungono le falde, ma sono anche utilizzate per la produzione di acque destinate al consumo umano (ISS, 2011). Le acque superficiali sono contestualmente contaminate tramite altre vie, ad esempio per dilavamento di aree destinate ad allevamenti di bestiame. In questo settore, infatti, soprattutto androgeni e progestinici sintetici vengono somministrati per promuovere la crescita del bestiame, pratica scorretta rispetto a quanto sancito dalla legislazione vigente in Europa (Direttiva del Consiglio 2003/74/CE). Questo può spiegare un eventuale aumento dei residui di ormoni steroidei in alimenti di origine animale come il latte, in cui questi possono già ritrovarsi poiché naturalmente prodotti dagli animali stessi con fluttuazioni connesse all'età e allo stadio fisiologico del bestiame (Fent K, 2015; Goyon A, 2016); in questo ambito, quindi, l'attenzione si è sempre più concentrata sulla determinazione degli ormoni sessuali rispetto agli altri ormoni steroidei ai quali, infatti, tra l'altro sarebbe potenzialmente attribuibile la possibile correlazione positiva recentemente evidenziata tra il consumo di prodotti lattiero-caseari e il rischio di sviluppo di tumori, soprattutto al seno, alla prostata e al fegato (Gao P *et al*, 2024). Appare chiaro che gli ormoni steroidei in qualità di contaminanti possono essere veicolati lungo la catena alimentare, tramite il consumo sia di acqua potabile e prodotti ittici, sia di latte e prodotti derivati. Questi ultimi non solo costituiscono al giorno d'oggi alimenti cardine della dieta di tutto il mondo, ma rivestono anche un ruolo fondamentale per la crescita nei bambini i quali, quindi, rappresentano la categoria di popolazione più esposta e vulnerabile a tali inquinanti (Gore AC *et al*, 2014; Haimov-Kochman R *et al*, 2016).

Per quanto riguarda gli estrogeni, dalle ricerche in materia ambientale ne è emersa la presenza nelle acque superficiali, in particolare di E1, E2 ed EE2. Le principali fonti degli estrogeni naturali sono gli esseri umani e gli animali, soprattutto nella fase riproduttiva, mentre quelli sintetici, tra cui EE2, derivano per lo più dal vasto impiego farmaceutico. La concentrazione di estrogeni rilevata nelle acque superficiali si mantiene generalmente al di sotto di pochi ng/L, con predominanza di E1. Nelle acque profonde, queste sostanze sono risultate pressoché assenti (< 1 ng/L). Diversi studi hanno provato l'interferenza di

questi composti con i processi riproduttivi nella fauna acquatica; infatti, nonostante si tratti di microinquinanti e quindi presenti in quantità minime, possono esercitare tale influenza a causa della continua esposizione. Inoltre si è osservata una maggiore persistenza nell'ambiente di EE2 rispetto agli estrogeni naturali, il che si traduce in una maggiore pericolosità ambientale. Per questo motivo per E1, E2 ed EE2 è stato calcolato uno standard di qualità ambientale annuale medio (AA-EQS) rispettivamente di 3,6 ng/L, 0,4 ng/L e 0,035 ng/L, spesso superato in molti fiumi in tutto il mondo. (Rose *et al*, 2013; Kim MK e Zoh KD, 2016; Adeel M *et al*, 2017; Wangmo C *et al*, 2018). Anche nel latte gli studi dimostrano che E1 è l'estrogeno principalmente presente, con concentrazioni nell'ordine di centinaia di ng/L, a fronte di decine di ng/L di E2 e di EE2 (quando riscontrato) (Courant F *et al*, 2007; Malekinejad H e Rezabakhsh A, 2015). Da recenti ricerche si evince che gli estrogeni, se assunti in quantità superiori alle soglie di sicurezza, possono contribuire allo sviluppo di disturbi cardiovascolari e al processo di cancerogenesi, soprattutto a carico della mammella. Questi ormoni possono, infatti, legare i recettori presenti nei tessuti mammari e, in particolare, si è vista la tendenza di E2 a mirare geni che inducono proliferazione cellulare o inibiscono l'apoptosi. Per questa ragione E2 figura nella Direttiva del Consiglio 1996/22/CE ("direttiva concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti") tra le sostanze di Gruppo A - sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate (Adeel M *et al*, 2017; Gañán J *et al*, 2014). Inoltre è stato osservato che, data l'elevata sensibilità agli estrogeni in prepubertà, i residui presenti nel latte vaccino potrebbero influenzare la crescita e accelerare la maturazione sessuale. Nel complesso emerge la necessità di porre maggiore attenzione alle abitudini alimentari della popolazione, specialmente verso i bambini (Maruyama K *et al*, 2010; Pape-Zambito *et al*, 2010).

Anche per quanto riguarda progesterone e progestinici sintetici le concentrazioni sono simili per acque reflue e acque superficiali, nell'ordine dei ng/L. Il progesterone viene naturalmente escreto dalle donne e dal bestiame, mentre i suoi derivati sintetici sono impiegati in medicina, in contenuti maggiori rispetto agli estrogeni con cui vengono spesso combinati (Fent K, 2015). Nonostante l'efficienza media di rimozione di questi composti negli impianti di depurazione delle acque reflue sia in linea con gli standard inerenti agli steroidi (73%), in molti casi la loro presenza è risultata più elevata negli effluenti (< 110 ng/L) degli impianti piuttosto che negli affluenti (< 25 ng/L). Una

spiegazione è la possibile deconiugazione degli ormoni metabolizzati in progenitori liberi rigenerati derivante da processi di biodegradazione, idrolisi e persino fotolisi (Rocha MJ e Rocha E, 2022). Una volta in acqua i progestinici possono essere assorbiti dagli organismi acquatici e, andando a interagire con i loro recettori, sono in grado di interrompere la normale funzione degli organi vitali, ma rispetto ad altri inquinanti della stessa categoria, ad esempio EE2, gli effetti sono ancora poco studiati. Si è anche osservato che tali composti tendono a bioaccumulare e addirittura bioconcentrare negli organismi acquatici, probabilmente a causa della loro natura idrofobica (log P compreso tra 3,1 e 5,4). L'ingestione di pesce contaminato può, quindi, potenzialmente esporre l'uomo a queste sostanze, ma sono necessari studi approfonditi a riguardo (Kumar V *et al*, 2015; Rocha MJ e Rocha E, 2022). L'esposizione, d'altra parte, è però associata con il consumo di latte e derivati in cui, infatti, il progesterone è stato quasi sempre rilevato negli studi condotti, con concentrazioni in genere nell'ordine dei µg/L e che si abbassano per lo più nei preparati per neonati. Da questi studi si deduce anche una correlazione positiva tra percentuale di grassi e livelli di progesterone, coerentemente alla sua elevata apolarità. Concentrazioni paragonabili sono state registrate anche per il medrossiprogesterone acetato, in conseguenza al suo utilizzo in campo zootecnico per aumentare l'efficienza della produzione. La preoccupazione circa una possibile influenza nella crescita e anche nello sviluppo del cancro al seno ha portato a fissare dei LMR in relazione all'uso di alcuni progestinici nel bestiame (0,5 µg/kg–3 µg/kg). Tuttavia a tutt'oggi le conoscenze circa le ripercussioni dell'esposizione ai residui di progestinici sulla salute e la sicurezza umana in seguito al consumo a lungo termine di latte e derivati sono ancora scarse e quindi da indagare (Decheng S *et al*, 2021; Malekinejad H e Rezabakhsh A, 2015).

Negli ultimi anni sono stati osservati anche crescenti livelli di contaminazione da androgeni nell'ambiente acquatico, rilevati in acque superficiali, falde acquifere, fiumi e sedimenti, spesso in percentuali maggiori rispetto alle altre famiglie di ormoni steroidei, ma sempre nell'ordine dei ng/L (Chang H *et al*, 2011). Generalmente, si tratta di testosterone e dei suoi metaboliti, ma anche di androgeni sintetici, la cui concentrazione si è registrata minore nelle acque superficiali e negli effluenti degli impianti di depurazione piuttosto che negli affluenti. Anche per tali inquinanti le origini sono analoghe a quelle già menzionate, in particolare per quanto riguarda il testosterone è noto l'uso illegale come agente ingrassante per bovini. Nonostante la scarsità di ricerche

disponibili, da queste si desume che, in seguito a esposizione a tali contaminanti, anche a basse concentrazioni, si possono verificare eventi di mascolinizzazione nei pesci e alterazioni dello sviluppo gonadico. Pertanto, anch'essi rappresentano una potenziale minaccia, oltre che per l'equilibrio dell'ecosistema acquatico, anche per l'uomo in seguito ad assunzione di acqua e alimenti contaminati (Liu ZH *et al*, 2009; Leet JK *et al*, 2011). In riferimento ad esempio a latte e derivati sono pochi gli studi in cui se ne sono ricercati i livelli, anche perché la principale fonte di androgeni sono i testicoli. Tuttavia da tali ricerche sono emersi livelli di testosterone entro i 100 ng/L, ma anche livelli più alti di altri androgeni. Il testosterone, nel dettaglio, si presenta in questa matrice generalmente non coniugato o in rapporto di circa 1:1 tra libero e coniugato, con concentrazioni crescenti all'aumentare del contenuto in grassi. Considerando che alcuni studi hanno evidenziato l'interferenza dell'ambiente ormonale, specialmente riguardante gli androgeni, nella genesi e nella progressione del cancro alla prostata, eventuali residui di tali ormoni nel latte potrebbero aumentarne il rischio nei consumatori (Courant F, 2007; Gao P *et al*, 2024)

Ai glucocorticoidi, similmente agli androgeni, sono state dedicate meno ricerche nel contesto ambientale rispetto a quanto fatto per estrogeni e progestinici. Tuttavia, considerando che l'escrezione dei glucocorticoidi è circa 10 volte superiore a quella degli estrogeni e degli androgeni e che sono oggi ampiamente utilizzati in campo farmacologico e zootecnico, si dovrebbe auspicare a una maggiore attenzione per la presenza di questi composti nell'ambiente e anche in prodotti di origine animale. Alcune ricerche hanno segnalato, infatti, anche per questa famiglia di ormoni effetti avversi sui pesci, con attività additiva in caso di co-esposizione (Ojogoro JO *et al*, 2021). Tra le matrici acquose analizzate, le acque reflue non trattate sono risultate quelle più contaminate, il che spiega le elevate concentrazioni rinvenute nelle acque fluviali. In più, l'eliminazione incompleta a carico degli impianti di depurazione contribuisce allo scarico nelle acque superficiali, seppure le concentrazioni comunque si abbassano notevolmente, soprattutto per cortisone, prednisone, desametasone e triamcinolone acetone (85-100%), rispetto a prednisolone e flumetasone (50-66%). In particolare, per i derivati naturali dell'idrocortisone sono state registrate concentrazioni fino a centinaia di ng/L, di molto superiori a quella del composto genitore stesso. Per quelli sintetici le concentrazioni trovate, dell'ordine del centinaio di ng/L, dipendono dal diverso impiego e dal relativo dosaggio in campo terapeutico (Shen X *et al*, 2020). Nonostante l'uso di

questi ormoni come promotori della crescita nel bestiame sia proibito in Europa, quando somministrati a scopo terapeutico sono previste dosi elevate a causa dell'elevata tolleranza degli animali trattati. Per tale ragione se ne possono trovare residui in prodotti come il latte, anche superiori ai rispettivi MRL (limite di concentrazione massima di un residuo di medicinale veterinario ammesso per una matrice alimentare; ad esempio 300 ng/L per BETA e DEXA) o che, altrimenti, rientrano in un intervallo normale di 8-18 µg/L.

Bisogna considerare anche il contributo di diverse condizioni di stress all'aumento dei livelli di concentrazione dei glucocorticoidi naturali nel latte, ad esempio cambiamenti ambientali o anche lo stesso trasporto. Diversi studi hanno dimostrato che l'esposizione, quindi compreso il consumo di prodotti lattiero-caseari, può costituire una minaccia per l'uomo, con una maggiore propensione allo sviluppo di disturbi come obesità, ipertensione, osteoporosi, vasodilatazione, immunosoppressione e diabete. Ne segue una maggiore preoccupazione per la popolazione infantile in cui l'assunzione di glucocorticoidi potrebbe interferire con lo sviluppo per inibizione della secrezione dell'ormone della crescita (ISS, 2005; Guo C *et al*, 2024).

Le evidenze raccolte mettono in luce la necessità della messa a punto di metodi analitici accurati e sensibili al fine di monitorare un numero quanto più ampio di ormoni steroidei, per tenere sotto controllo l'inquinamento ambientale e alimentare e le problematiche che ne seguono.

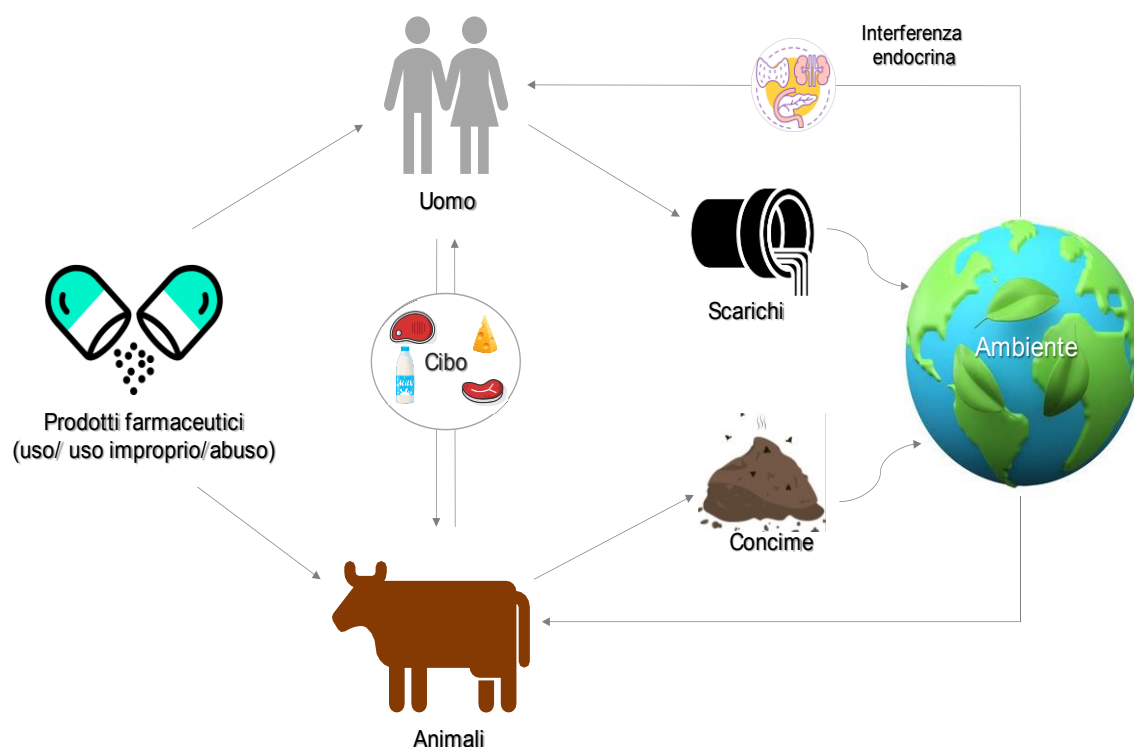


Figura 4. Schema riassuntivo relativo alla diffusione degli ormoni steroidei nell'ambiente e nella catena alimentare

1.3 Metodi analitici

Nel corso degli anni sono stati sviluppati diversi metodi analitici applicabili alla ricerca degli ormoni steroidei in svariate matrici. L'immunoanalisi, scoperta negli anni '70, è stata a lungo la tecnica predominante e ha consentito la determinazione di concentrazioni molto piccole di questi analiti, anche a livello di ng/L. Sebbene essa ancora prevalga per usi diagnostici nella pratica clinica, soprattutto per semplicità di esecuzione, bassi costi e disponibilità di reagenti commerciali, in altri campi è stata sostituita per problemi di specificità e sensibilità, oltre che per il limite, non trascurabile, di poter misurare un solo analita per volta (Dušková M *et al*, 2020; Wudy SA *et al*, 2018). Al suo posto, tecniche basate su cromatografia liquida e gassosa hanno trovato un impiego sempre maggiore per la rilevazione e la quantificazione degli ormoni steroidei, soprattutto in matrici complesse ambientali come l'acqua e alimentari come il latte. In particolare, la combinazione con la rilevazione tramite spettrometria di massa (rispettivamente LC-MS e GC-MS) ha consentito di aumentare la specificità dell'analisi e di misurare simultaneamente più analiti. La gascromatografia richiede, però, in caso di analiti privi di volatilità come gli ormoni steroidei, la derivatizzazione del campione: operazione lunga e complessa, penalizzata anche dalla mancanza di un reagente di derivatizzazione adatto a residui

diversi. Per l'analisi di questi composti si è invece consolidato l'utilizzo preferenziale della cromatografia liquida e, in particolare, per matrici complesse la cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa tandem (HPLC-MS/MS) si è rivelata un approccio altamente selettivo, sensibile e accurato, che ha anche permesso di ridurre i tempi di analisi. Tuttavia, sebbene si tratti di una metodologia altamente sofisticata, nel caso di tali matrici risulta necessario un pretrattamento del campione che ne ostacola, quindi, l'analisi diretta. Nello specifico, sono previste procedure di estrazione e purificazione (*clean-up*), spesso complesse e dispendiose in termini di tempo, ma indispensabili considerati sia i bassi livelli di concentrazione degli analiti target sia la complessità delle matrici in esame, in cui normalmente sono presenti altri composti che possono interferire (Azzouz A *et al*, 2018; Wudy SA *et al*, 2018). Negli anni, quindi, l'interesse si è focalizzato sullo sviluppo di nuovi iter di preparazione del campione che, soprattutto per matrici acquose, come anche il latte, sono per lo più basati sull'estrazione in fase solida (SPE) (Iparraguirre A *et al*, 2011; Selahle SK *et al*, 2023; Barreiros L *et al*, 2016).

1.3.1 Tecniche di estrazione e *clean-up*

Per rilevare tracce di ormoni steroidei in matrici complesse come l'acqua e il latte, è fondamentale che tali analiti vengano prima estratti e purificati, quindi arricchiti, attraverso un efficiente pretrattamento dei campioni. Questo prevede l'applicazione di procedure che, infatti, permettono di convertire la matrice originale del campione in una più semplice e di abbassare il limite di rilevamento (LOD) degli strumenti analitici che verranno successivamente impiegati. In altre parole, sono step che consentono di aumentare la sensibilità analitica semplificando e migliorando l'analisi strumentale finale, sia qualitativamente che quantitativamente.

La tecnica più utilizzata a questo proposito è l'estrazione in fase solida *off-line*. In letteratura si segnalano, in minore misura, anche SPE online ed estrazioni liquido-liquido (LLE) (Andaluri G *et al*, 2017). Nello specifico, il processo di estrazione è basato sull'interazione tra gli analiti, disciolti in una fase liquida, e una fase adsorbente solida (SPE) o liquida (LLE). Si tratta delle stesse interazioni alla base del funzionamento dell'HPLC, ma in questo caso lo scopo non è quello di separare gli analiti sfruttandone la diversa affinità verso le due fasi, bensì di trattenerli in seguito al caricamento del

campione e infine eluirli attraverso un solvente adeguato. La SPE è stata inizialmente introdotta come alternativa alla LLE per l'analisi di campioni acquosi poiché risponde meglio all'esigenza di applicare procedure più rapide e selettive, essendo possibile scegliere tra un'ampia gamma di sorbenti e di eluenti. Inoltre, dei solventi impiegati per l'eluizione e/o per eventuali lavaggi, talvolta tossici per l'ambiente, si registrano consumi più ridotti e, di conseguenza, un minor impatto ambientale (Moret S e Conte LS, 2014).

Per quanto riguarda i sorbenti si può optare per materiali reperibili in commercio già pronti all'uso oppure per materiali preparati direttamente in laboratorio. La natura e la struttura di questi materiali sono fattori fondamentali in quanto concorrono all'efficienza di *clean-up* del campione e al recupero dell'estrazione. Tra i materiali commercializzati quelli più ampiamente utilizzati sono: C18, a base di silice octadecil-modificata, HLB, copolimero macroporoso idrofilo-lipofilo bilanciato, MAX, polimero misto con gruppi scambiatori anionici e GCB, a base di carbone nero grafitato. Il principale svantaggio di queste fasi convenzionali è la loro insufficiente selettività che diventa rilevante quando gli analiti target sono presenti in tracce rispetto agli interferenti della matrice e con cui, quindi, potrebbero essere co-estratti. Questa è una problematica in cui frequentemente si incorre nell'estrazione, ad esempio, degli ormoni steroidei dalle acque. Nel corso degli anni ci si è allora concentrati sullo sviluppo di nuovi sorbenti più selettivi e specifici per migliorare estrazione e pre-concentrazione di tali analiti in matrici complesse come quelle acquose. Tra questi figurano:

- materiali nanostrutturati (nanomateriali di carbonio, nanoparticelle magnetiche, dendrimeri ecc...);
- nuovi materiali porosi avanzati (polimerici, a base di carbonio, strutture metallo-organiche ecc...);
- materiali ad accesso limitato (RAM);
- sorbenti a riconoscimento molecolare (immunosorbenti, polimeri a impronta molecolare ecc...) (Moret S e Conte LS, 2014; Háková M *et al*, 2018; Płotka-Wasyłka J *et al*, 2016).

Buoni risultati in termini di selettività, efficienza e costi si sono ottenuti con la sintesi di nuovi polimeri porosi. Chiaramente nel singolo nessun materiale poroso, analogamente a ogni altro materiale sperimentato, si presta a tutti gli scopi di estrazione e pulizia, anche

perché ogni matrice rappresenta una sfida a sé a causa della sua composizione. Pertanto, diversi gruppi di ricerca si sono dedicati alla progettazione di materiali porosi quanto più adeguati al superamento, in tal senso, delle sfide odierne nella scienza della separazione (Luo J *et al*, 2021; Zhou T *et al*, 2019). In particolare, tra i nuovi materiali porosi di tipo polimerico, le emulsioni polimerizzate ad alta fase interna (polyHIPE) hanno attirato sempre più l'attenzione in veste di materiali adsorbenti per l'estrazione di analiti di diversa natura da matrici complesse, soprattutto l'acqua. La loro porosità, infatti, consente agli analiti target di diffondersi attraverso garantendo una separazione altamente efficace (Luo J *et al*, 2021).

Il latte, essendo un'emulsione di acqua e grassi contenente proteine, glucidi e numerosi sali minerali e vitamine, si può considerare una matrice più ricca e complessa delle acque. Questo spiega perché, in genere, per ottimizzare la determinazione di analiti in tracce come gli ormoni steroidei, vengono eseguite anche procedure di diluizione, deproteinizzazione e/o rimozione di grassi, prima di *clean-up* e pre-concentrazione tramite SPE o LLE come già visto. Inoltre, per ottenere una caratterizzazione del contenuto totale di tali analiti (forme libere + forme coniugate), la preparazione del campione può includere anche uno step di idrolisi enzimatica, spesso mediata da β -glucuronidasi (Socas-Rodríguez B *et al*, 2017). La precipitazione delle proteine viene comunemente realizzata tramite l'uso di: solventi organici (come acetonitrile o metanolo), tal quali o acidificati (per aggiunta ad esempio di acido acetico); solventi acidi (come acido cloridrico o acido tricloroacetico); tamponi di estrazione più complessi (ad esempio acetonitrile + miscela di acido ossalico e EDTA) (Liu K *et al*, 2020; Chiesa LM *et al*, 2016; D'Orazio G *et al*, 2015; Springer V *et al*, 2014; Hernández-Mesa M *et al*, 2014; Wang J *et al*, 2015). La sgrassatura, invece, si ottiene spesso tramite l'applicazione di n-esano, anche in combinazione con acetone, acetonitrile o acetato di piombo (D'Orazio G *et al*, 2015; Wang HX *et al*, 2012; Yuan Y *et al*, 2019; Decheng S *et al*, 2021). Ancora, i grassi possono essere rimossi insieme alle proteine in un unico passaggio di trattamento del campione con acido tricloroacetico (Chiesa LM *et al*, 2016).

In generale, quindi, per matrici complesse è richiesta una preparazione del campione più o meno articolata che, oltre ad allungare i tempi e aumentare i costi di analisi, prevede un consumo, talvolta importante, di solventi e sorbenti. La sfida degli ultimi anni è stata quindi quella di mettere a punto procedure quanto più rapide, economiche e rispettose dell'ambiente.

1.3.2 PolyHIPE

Recentemente è emerso un elevato interesse nello sviluppo di nuovi sistemi polimerici porosi, un sottoinsieme di materiali porosi che si presta a un'ampia gamma di applicazioni, tra cui la separazione. Una strategia avanzata in questo campo prevede l'uso di emulsioni ad alta fase interna (HIPE) come modelli per la sintesi di tali materiali, che, nello specifico, vengono per l'appunto definiti polyHIPE. Gli HIPE sono emulsioni altamente viscosi in cui la fase principale (interna) in genere costituisce dal 74% al 99% del volume totale ed è dispersa in forma di goccioline all'interno della fase minore (esterna). Se la fase interna, quella esterna o entrambe contengono monomeri, è possibile creare polimeri all'interno dell'HIPE. In particolare, se i monomeri sono presenti solo nella fase esterna, viene prodotto un polyHIPE, costituito quindi da una fase polimerica solida continua che circonda le goccioline della fase interna (Luo J *et al*, 2021). Durante la polimerizzazione, in seguito alla formazione di rotture del film polimerico, a livello dei punti più sottili, tali goccioline si trasformano in una fase interna continua e interconnessa. La porosità del materiale viene poi ottenuta per rimozione delle goccioline dalla fase interna, ora continua, che infatti si traduce nella creazione di pori di dimensioni micrometriche (5-100 μm) e diametro definito (Silverstein MS, 2014; Luo J *et al*, 2021). Inoltre, i polyHIPE hanno aree superficiali generalmente $<100 \text{ m}^2/\text{g}$ e le più elevate si prestano meglio come strategia di separazione.

I singoli polyHIPE presentano, quindi, morfologie, dimensioni e distribuzioni dei pori personalizzate, ottenute variando il rapporto di fase interna/esterna, le varie componenti (monomeri, reticolanti, iniziatori, tensioattivi ecc..) e le rispettive concentrazioni; è proprio questo che ha permesso nel tempo anche di migliorarne le prestazioni in termini di porosità, area superficiale, stabilità e proprietà meccaniche. A questo proposito, ad esempio, per renderli ottimi candidati per estrazione e arricchimento, si è cercato di aumentarne l'area superficiale a scapito, però, della loro fragilità, con conseguente perdita di materiali quando sottoposti al flusso di liquidi. Pertanto, è una sfida impegnativa migliorarne le proprietà meccaniche senza alterarne l'elevata porosità e interconnettività.

Tra i diversi meccanismi di separazione in cui questi materiali si possono applicare, quella per adsorbimento è stata quella più ampiamente sperimentata. Finora è stata testata per la separazione di gas, piccoli composti organici e proteine e si è dimostrata una procedura

efficiente, economica e di semplice esecuzione. In particolare, da questi studi si è evinto che l'efficienza di separazione dipende, oltre che dalle proprietà dei polyHIPE utilizzati e degli analiti target, anche dalle condizioni sperimentali (tipo di solvente, volume del campione ecc..) e dalla matrice del campione che ne andrebbero a influenzare le interazioni (forze di Van der Waals, legami a idrogeno, interazioni π - π e/o esclusione molecolare) (Luo J *et al* 2021).

La letteratura riporta, quindi, che diversi polyHIPE, in veste di materiali attentamente ottimizzati per la preparazione dei campioni, sono stati utilizzati con successo nella separazione di analiti target in matrici ambientali, alimentari e biologiche (Du F *et al*, 2015). Tuttavia, attualmente gli studi sulla loro applicazione nell'estrazione e arricchimento di ormoni steroidei in acqua sono scarsi, così come anche il loro utilizzo come sorbenti per la matrice latte in generale.

2. SCOPO DEL LAVORO DI TESI

Lo scopo del presente lavoro di tesi, svolto presso il laboratorio di chimica analitica (Traces Lab) del Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Pavia, è la messa a punto di procedure di estrazione e *clean-up* di ormoni steroidei appartenenti a quattro diverse famiglie (estrogeni, progestinici, androgeni e glucocorticoidi) in soluzioni acquose mediante l'utilizzo di polimeri porosi non commerciali come fasi estraenti. Nel dettaglio il lavoro ha previsto:

- Studio dell'efficienza di estrazione del polimero in funzione della sua composizione;
- Valutazione della fattibilità dell'*imprinting* del polimero più performante;
- Sviluppo della procedura di estrazione in fase solida (SPE) in acque potabili;
- Sviluppo della procedura SPE e del *clean-up* in campioni di latte di diversa natura;
- Valutazione analitica dei metodi SPE accoppiati ad analisi HPLC-MS/MS;
- Valutazione della *greenness* dei metodi sviluppati.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti, strumentazione e materiali

3.1.1 Reagenti

- Etanolo (99.8%), VWR (Milano, Italia);
- Metanolo (99.8%), VWR (Milano, Italia);
- Acetonitrile ($\geq 99.9\%$), CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Cornaredo, Italia);
- Acqua ultra-pura, CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Cornaredo, Italia);
- Acido formico (puro per LC-MS), CARLO ERBA Reagents S.r.l. (Cornaredo, Italia);
- Acido fosforico ($\geq 85\%$), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Acido acetico, Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Reagente di Bradford, Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Bovine serum albumine ($\geq 98\%$), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- 17β -estradiolo (250 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Estrone (500 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- 17α -etinilestradiolo (1 g), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Progesterone (1 g), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Idrossiprogesterone (1g), Steroid S.p.A (Cologno Monzese, Italia);
- Medrossiprogesterone (250 g), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Testosterone (1 g), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Cortisone (250 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Idrocortisone (250 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Prednisone (1 g), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Prednisolone (250 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Triamcinolone Acetonide (4 g), Farmabios (Gropello Cairoli, Italia);
- Fluocinolone Acetonide (6 g), Farmabios (Gropello Cairoli, Italia);
- Desametasone (250 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Betametasone (100 mg), Sigma-Aldrich (Milano, Italia);
- Flumetasone (10g), Farmabios (Gropello Cairoli, Italia).

Per ciascun ormone è stata preparata una soluzione a concentrazione pari a 1000 mg/L in MeOH, conservata in frigorifero a 4°C. Per le prove preliminari è stato necessario

suddividere gli analiti in 2 gruppi: “Mix 1” (PRED, PREDLO, CORT, DEXA, TRIAM, E2 e M-PROG) e “Mix 2” (H-CORT, BETA, FLUO, TST, E1, EE2, H-PROG e PROG). Per ciascun gruppo si sono preparate delle soluzioni standard con concentrazione di 100 mg/L di ciascun analita. Per la messa a punto dei metodi finali si sono selezionati 11 analiti (BETA, DEXA, FLUO, TRIAM, TST, E1, E2, EE2, H-PROG, M-PROG e PROG) e ne è stata preparata una soluzione metanolica multipla (“Mix 11”) a 91 mg/L di ciascun analita. A partire da queste soluzioni multiple concentrate sono stati preparati più standard a diverse diluizioni in MeOH (1, 2,5, 5 e 10 mg/L per Mix 1 e Mix 2; 0,91 mg/L, 2, 25 e 50 µg/L per Mix 11).

3.1.2 Strumentazione

- Bilancia analitica, ORMA S.r.l. (Sesto San Giovanni, Italia);
- Vortex a velocità variabile (Stuart Vortex Mixer), Cole-Parmer (Stone, Regno Unito);
- Bagno ad ultrasuoni (Ultrasonic cleaner, 60 Hz), VWR (Milano, Italia);
- Sistema estrazione Soxhlet;
- Spettrofotometro UV-Vis Uvmini-1240, Shimadzu (Milano, Italia);
- Sistema HPLC-UV Shimadzu, costituito da Pompa Shimadzu LC-20AT equipaggiata con Degasser Shimadzu DGU-20A3, Rivelatore UV/Vis SPD-20°, sistema di iniezione manuale a siringa con *loop* da 20 µL, colonna cromatografica Sepachrom Robusta 100A C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) e pre-colonna Supelco Supelguard Ascentis C18 (2 cm × 2.1 mm, 5 µm) entrambe termostatate a 30 °C (± 0,8 °C), Shimadzu (Milano, Italia);
- Sistema HPLC-MS Agilent 1260 Infinity, dotato di autocampionatore, loop da 900 µL e pompa binaria, accoppiato a un rivelatore di massa a triplo quadrupolo Agilent 6460c con ionizzazione elettrospray (ESI acronimo inglese per *ElectroSpray Ionization*). Colonna cromatografica Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Rapid Resolution 100 × 4.6 mm, 3.5 µm e pre-colonna Supelco Supelguard Ascentis (C18 2 cm × 2.1 mm, 5 µm), Agilent (Cernusco sul Naviglio, Italia).

3.1.3 Materiali

- Provette in polipropilene (10 mL), Tecnovetro (Monza, Italia);
- Tappi a presa alta da 16 mm, Tecnovetro (Monza, Italia);
- Provette coniche in polipropilene da 50 mL, Falcon, VWR (Milano, Italia);
- Filtri Nylon 0.45 μm , VWR (Milano, Italia);
- Siringhe (1 mL), Henke Sass Wolf (Tuttlingen, Germania);
- Cartucce per SPE (6 mL), SepaChrom (Rho, Italia);
- *Frit* in polietilene per cartucce da 8mL, SepaChrom (Rho, Italia);
- Matracci tarati in vetro (25mL), Hirschmann (Germania);
- *Vials* in vetro con tappo a vite, Scharlab (Barcellona, Spagna);
- Eppendorf (1.5 mL), VWR (Milano, Italia);
- Micropipetta 10-100 μL , Fisher Scientific Italia (Segrate, Italia);
- Micropipetta 100-1000 μL , VWR (Milano, Italia);

3.2 Sintesi Polimeri

In letteratura figurano diversi esempi di sintesi di polyHIPE a base di biomateriali (fumarato, t-butil acrilato, poliacrilato ecc.). In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati polimeri a base di poliacrilato (Lipo, Idro e PEG) preparati presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco dell'Università degli Studi di Pavia dal gruppo di ricerca della Prof.ssa Enrica Calleri secondo procedure precedentemente sviluppate per applicazioni biomediche (Corti M *et al*, 2019; De Soricellis G *et al*, 2023).

Nello specifico, in un pallone di vetro a fondo tondo a tre colli in atmosfera di azoto, coperto da alluminio e dotato di agitatore meccanico, è stata preparata la fase oleosa miscelando il tensioattivo Synperonic PE/L121 (1,02 mL) e il monomero strutturale lipofilico butil acrilato (4,3 mL, 30 mmol). Sono stati poi aggiunti alla miscela il monomero lipofilico funzionale glicidil metacrilato (1,72 mL, 12,6 mmol) e il *cross-linker* trifunzionale (pentaeritritolo triacrilato per il polimero Idro e trimetilolpropantriacrilato per i polimeri Lipo e PEG, 0,96 mL, 3,8 mmol) sotto agitazione (200 rpm). Per la preparazione del polimero PEG e del polimero lipofilico (lipo), avvenuta tramite polimerizzazione radicalica termica, la fase acquosa è stata ottenuta sciogliendo 272 mg di persolfato di potassio (KPS), iniziatore radicalico, in acqua bidistillata

degassata con azoto (rispettivamente 31 e 32 mL); nella sintesi del PEG questo passaggio è avvenuto in presenza di glicole polietilenico metacrilato (PEGMA, 1 mL, 3,1 mmol).

La preparazione del polimero idrofilico (Idro) è invece avvenuta tramite polimerizzazione fotoindotta, pertanto, alla fase oleosa è stato aggiunto il fotoiniziatore Irgacure 819 (140 mg, 0,33 mmol), mentre la fase acquosa è stata preparata sciogliendo il monomero idrofilo 4-idrossibutil acrilato (0,5 mL, 3,6 mmol) in 31,5 mL di acqua degassata doppiamente deionizzata.

Per tutte e tre le procedure la soluzione acquosa risultante è stata, quindi, lasciata cadere lentamente, goccia a goccia, nel pallone tramite un imbuto gocciolatore, sotto agitazione continua (300 rpm). Al termine, la miscela, dall'aspetto torbido, è stata sottoposta a un'agitazione più forte (400 rpm) per un'ora a temperatura ambiente e sotto un flusso costante di azoto. Si è, quindi, ottenuta un'emulsione finale altamente viscosa, gialla e dall'aspetto cremoso (emulsione ad alta fase interna).

Durante la preparazione dell'idrossi-polimero, l'emulsione è stata lasciata polimerizzare in una capsula di Petri in vetro sotto la lampada UV ($\lambda = 310$ nm) per 60 min. Nel caso del lipo-polimero e del PEG, invece, l'emulsione è stata trasferita in una siringa di polietilene, a sua volta collegata tramite un accoppiatore luer femmina a una seconda siringa contenente 272 μ L di TEMED (iniziatore redox). Utilizzando il metodo "siringa-siringa", HIPE e TEMED sono stati mescolati attraverso dieci estrusioni alternate da una siringa all'altra. Infine, la miscela ottenuta è stata versata in una capsula di Petri e lasciata polimerizzare per 24 ore a temperatura ambiente. La preparazione dei tre materiali è schematicamente riportata nelle Figure 5, 6 e 7.

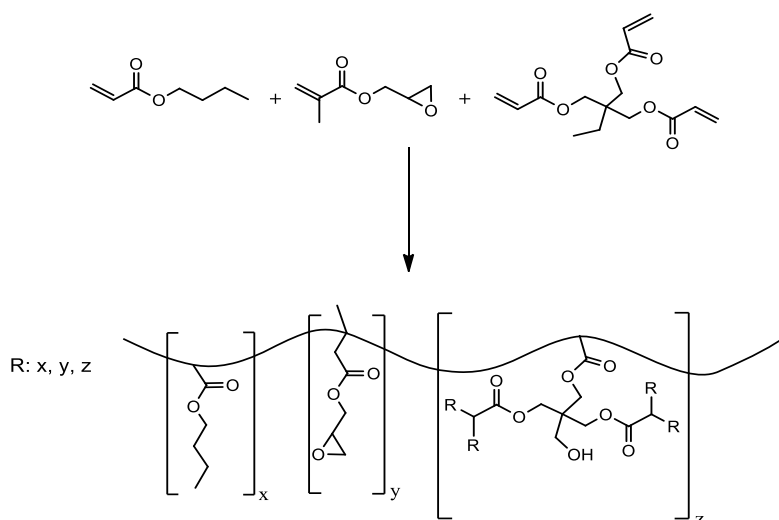


Figura 5. Struttura chimica del polimero Lipo. x, butil acrilato; y, glicidil metacrilato; z, trimetilolpropanetriacrilato.

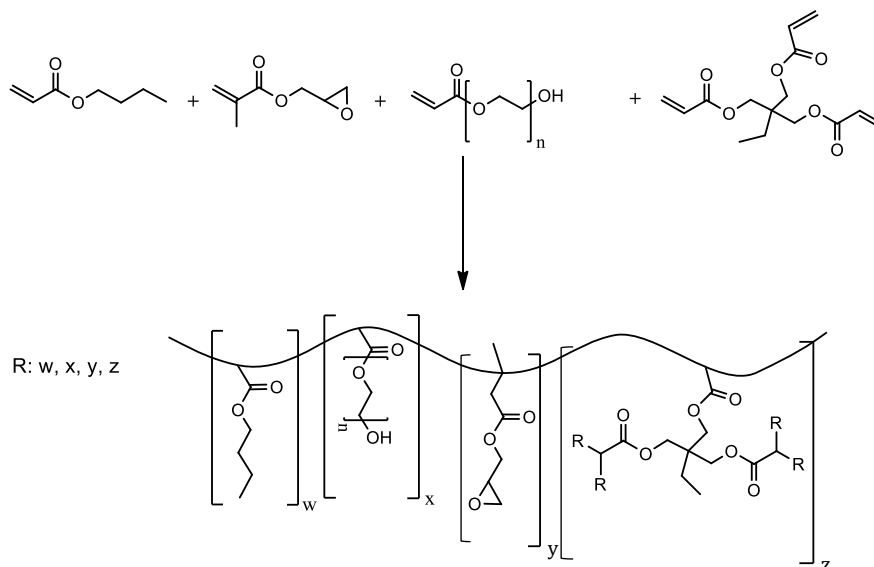


Figura 6. Struttura chimica del polimero PEG. w, butil acrilato; x, PEGMA; y, glicidil metacrilato; z, trimetilolpropantriacrilato.

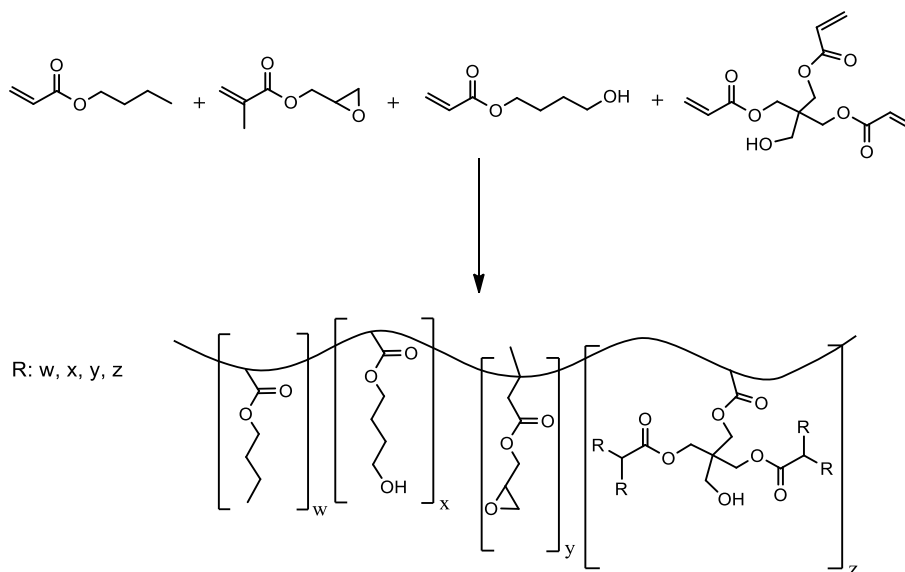


Figura 7. Struttura chimica del polimero Idro. w, butil acrilato; x, 4-idrossibutil acrilato; y, glicidil metacrilato; z, pentaeritritolo triacrilato.

I polyHIPE sono stati successivamente lavati con EtOH (40 mL) in un sistema Soxhlet in modo tale da rimuovere molecole di tensioattivo e di iniziatore, monomeri non reagiti, oligomeri non reticolati ed eventuali impurità. Dopo la fase di lavaggio i polimeri sono stati lasciati asciugare all'aria sotto cappa per 24 ore per favorire l'evaporazione del solvente residuo. Infine, i materiali sono stati ridotti in polvere fine mediante frantumazione con mortaio e pestello.

In questo lavoro di tesi si è anche testata la tecnologia di *imprinting* molecolare nella sintesi del polimero PEG. A questo proposito sono state selezionate 3 diverse molecole stampo appartenenti alla famiglia dei glucocorticoidi (Flumetasone, Betametasone e Cortisone) e aggiunte in rapporto 1:5 (Jiang T *et al*, 2009; Czarny K *et al*, 2019) con il monomero funzionale prima dell'avvio della polimerizzazione. Dopo rimozione del template tramite lavaggio Soxhlet in EtOH al 10% di acido acetico (80 mL) per 72 ore, si sono, quindi, ottenuti i rispettivi MIP-polyHIPE.

3.3 Campioni utilizzati

3.3.1 Campioni acquosi

In questo lavoro di tesi i campioni acquosi utilizzati sono:

- l'acqua di rete, erogata direttamente dal rubinetto del laboratorio e impiegata per diversi usi, anche domestici. È stata scelta come rappresentante di una matrice acquosa reale;
- un'acqua da bere "minimamente mineralizzata", marchio "Sant'Anna", reperita presso un supermercato locale e conservata a temperatura ambiente. Trattandosi di un'acqua leggera figura tra quelle maggiormente consigliate per neonati, donne in gravidanza e soggetti a regime iposodico o affetti da disturbi renali e cardiovascolari.

In Tabella 1 si riporta della prima la composizione precedentemente analizzata presso il laboratorio di Chimica Analitica dell'Università degli Studi di Pavia, della seconda le informazioni presenti in etichetta.

Parametri	ACQUA DI RETE	ACQUA IN BOTTIGLIA
pH	7,8	6,9
Residuo fisso (mg/L)	168,4	22,0
Conducibilità (μS/cm)	270	25,2
Bicarbonati (mg/L)	184	9,5
Solfati (mg/L)	5,0	3,6
Silice (mg/L)	17,5	7,3
Sodio (mg/L)	13,0	1,8
Calcio (mg/L)	36,0	2,8
Nitrati (mg/L)	0,6	1,0
Fluoruri (mg/L)	N.D.	<0,10
Cloruri (mg/L)	5,0	N.D.
Magnesio (mg/L)	8,0	N.D.

Tabella 1. Proprietà chimico-fisiche delle acque utilizzate. N.D., non disponibile.

3.3.2 Campioni di latte

Nel presente lavoro di tesi si sono utilizzati i seguenti tipi di latte, tutti reperiti presso supermercati locali e, a eccezione dell'ultimo, sono tutti prodotti dallo stesso stabilimento di produzione:

- Latte vaccino parzialmente scremato UHT a lunga conservazione, marchio “Sterilgarda”;
- Latte vaccino intero UHT a lunga conservazione, marchio “Sterilgarda”;
- Latte vaccino parzialmente scremato senza lattosio (<0,1%) microfiltrato, marchio “Sterilgarda”;
- Latte in formula per lattanti, marchio “Humana”, indicato fino al 6° mese di vita. Esso, definito anche latte di partenza, è una tipologia di latte artificiale somministrata quando quello materno non è disponibile o è insufficiente. In genere viene prodotto dal latte vaccino, attentamente modificato in modo da avere una composizione tale da renderlo l'alimento che meglio sostituisce il latte materno. Si tratta, infatti, di un latte digeribile e completo di tutte le sostanze

necessarie per la crescita nel primo semestre di vita, quindi arricchito in lattosio, oligosaccaridi, grassi (soprattutto di origine vegetale), vitamine e sali minerali.

Una volta aperta, ciascuna confezione è stata conservata e utilizzata nel rispetto delle indicazioni riportate in etichetta. Nella Tabella 2 se ne riporta la dichiarazione nutrizionale di ciascuno.

Parametri	PARZ. SCREMATO	INTERO	SENZA LATTOSIO	LATTE IN FORMULA
Energia (kcal/100 mL)	47	65	48	65
Grassi totali (g/100 mL)	1,6	3,5	1,6	3,2
di cui acidi grassi saturi	1,1	2,5	1,0	1,3
Carboidrati totali (g/100 mL)	5,0	5,0	4,9	7,6
di cui lattosio	N.D.	N.D.	< 0,01	7,5
Proteine (g/100 mL)	3,3	3,2	3,3	1,3
Calcio (mg/100 mL)	120	120	120	61
Sale (g/100 mL)	0,1	0,1	0,13	N.D.

Tabella 2. Dichiarazione nutrizionale dei diversi tipi di latte utilizzati.

3.4 Procedura SPE

Lo step di estrazione in fase solida è stato eseguito utilizzando come fase solida adsorbente il polimero PEG preparato come descritto al punto 3.2. L'estrazione si è realizzata sotto cappa utilizzando un collettore multiposizione collegato a una pompa a vuoto. Ciascuna cartuccia SPE è stata preparata ponendo un *frit* alla base di una cartuccia da 6 mL di volume vuota, sul quale sono stati posti 200 mg di polimero PEG polverizzato. Il materiale in cartuccia è stato prima attivato tramite un lavaggio con 3 mL di EtOH seguito dall'inserimento del secondo *frit* per compattare la fase solida. Il successivo condizionamento si è ottenuto tramite lavaggio in successione con 3 mL di EtOH, 3 mL di acqua tridistillata e 3 mL di acqua di rubinetto. Avendo cura di non portare il sorbente all'essiccazione, si è proceduto con il caricamento del campione, acqua o latte.

3.4.1 Matrice acqua

Il mix contenente gli 11 ormoni steroidei selezionati è stato aggiunto in concentrazioni note in un matraccio tarato in vetro per fortificare rispettivamente un volume finale di 25 mL di acqua. Il campione così ottenuto è stato quindi caricato sulla cartuccia SPE a una portata di circa 0,5 mL/min. Dopo l'essiccazione sotto vuoto per 2 minuti, è stata eseguita l'eluizione con 2 mL di EtOH a 0,5 mL/min al fine di desorbire efficacemente gli analiti. Per le prove a concentrazioni più basse (ng/L) gli eluati, raccolti in una provetta, sono stati essiccati sotto un delicato flusso di azoto (N_2) e poi ricostituiti in 0,25 mL di EtOH (fattore di arricchimento EF=100). Dopo un passaggio di 30 secondi al vortex a 2000 rpm si è infine proceduto con l'analisi strumentale in HPLC.

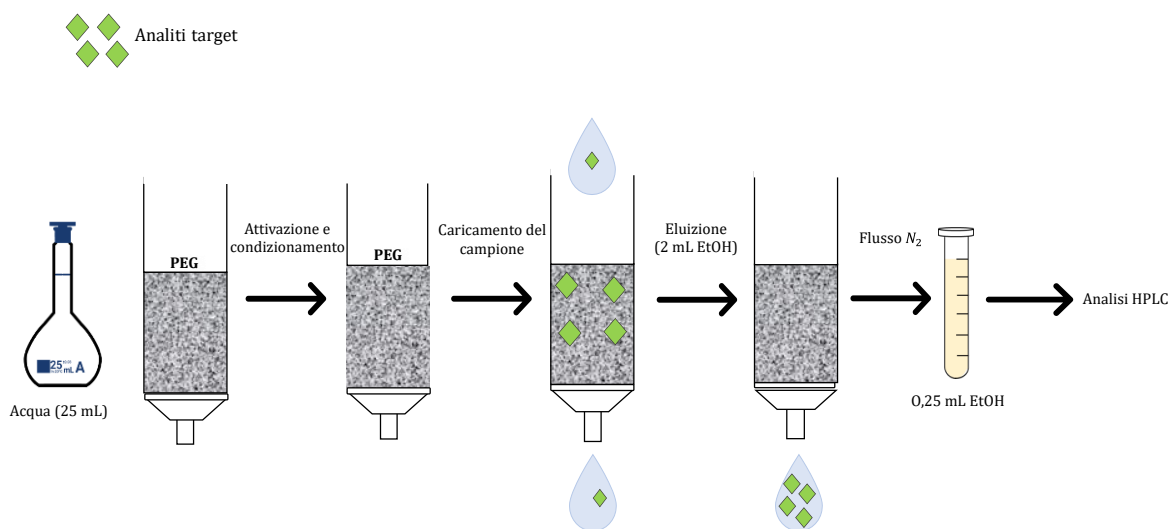


Figura 8. Schema della procedura SPE di campioni di acqua

3.4.2 Matrice latte

Il mix contenente gli 11 ormoni steroidei selezionati è stato aggiunto in concentrazioni note per arricchire 2 mL di latte. Il campione così preparato all'interno di una provetta, è stato poi sottoposto ad agitazione in vortex per 30 secondi a 2000 rpm e lasciato equilibrare a temperatura ambiente per 30 minuti durante la preparazione della cartuccia SPE. 1 mL di campione fortificato è stato caricato sulla cartuccia, con una velocità di flusso di circa 0,5 mL/min. Dopo l'essiccazione sotto vuoto per 2 minuti, si è proseguito con la rimozione delle proteine (interferenti) eventualmente adsorbite tramite lavaggio in successione con 2 mL di acqua tridistillata al 2% di acido formico e al 5% di acetonitrile

e 2 mL di acqua tridistillata. In seguito ad essiccazione sotto vuoto per 2 minuti è stata eseguita l'eluizione con 2 mL di EtOH a una portata di circa 0,5 mL/min al fine di desorbire efficacemente gli analiti. Prima di procedere con l'analisi strumentale, gli eluati sono stati sottoposti a vortex per 30 secondi a 2000 rpm e poi filtrati tramite filtri in nylon da 0.45 µm.

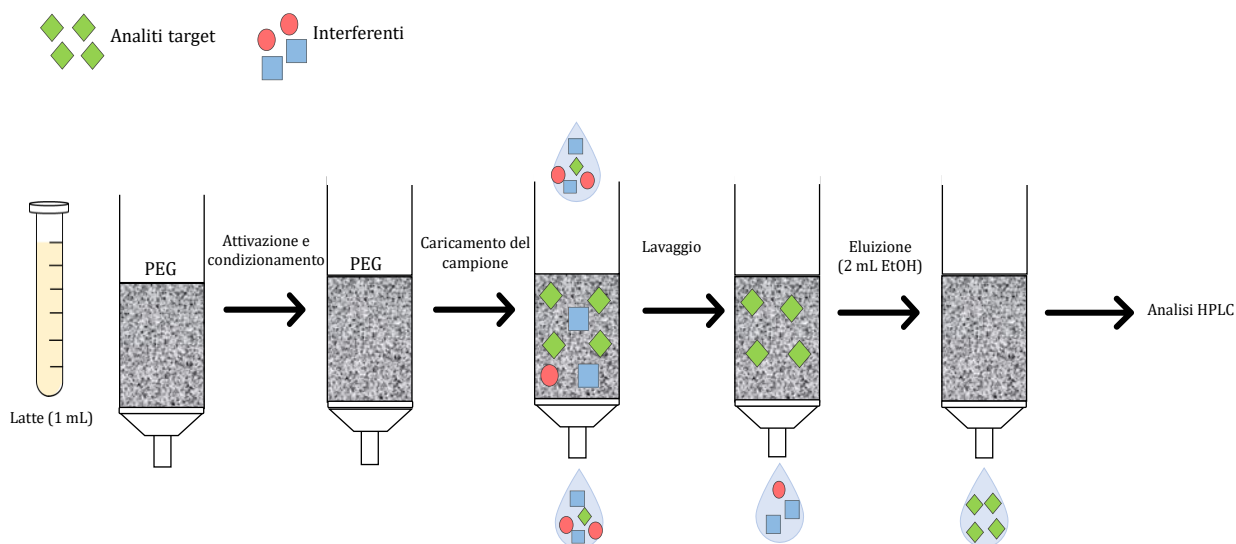


Figura 9. Schema della procedura 'SPE di campioni di latte

3.5 Analisi strumentale

In questo lavoro di tesi l'analisi quantitativa dei campioni è stata realizzata tramite cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) accoppiata a due diversi sistemi di rilevazione: UV per le prove preliminari e spettrometria di massa tandem per le prove in traccia e ultratraccia.

L'HPLC è un tipo di cromatografia liquida che permette di separare due o più composti presenti in un campione sfruttando la loro diversa interazione con una fase stazionaria, posta all'interno della colonna cromatografica sottoforma di particelle solide, e una fase mobile

(liquida) che fluisce attraverso essa sotto pressioni elevate. Tanto più una sostanza è affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile, tanto maggiore è il tempo impiegato a percorrere la colonna (tempo di ritenzione). La tecnica si definisce: "normale", se la fase stazionaria è polare e quella mobile apolare, oppure "a fase inversa", nel caso contrario,

che è l'approccio usato in questo lavoro. Tra l'iniettore, attraverso cui si carica il campione da analizzare, e la colonna è presente la cosiddetta pre-colonna, impaccata con la stessa fase stazionaria della colonna, ma più corta, il cui ruolo è quello di evitare che eventuali contaminanti/impurezze la raggiungano danneggiandola. L'eluizione può essere classificata in due tipologie: isocratica, quando la composizione della fase mobile è mantenuta costante per l'intera eluizione, o a gradiente, quando la sua composizione si fa variare durante la separazione per ottimizzarne la capacità di separazione. Quest'ultima strategia è più indicata per l'analisi di campioni complessi, ovvero in presenza di più analiti da quantificare, come quelli oggetto di questo studio. Il rivelatore, di diverso tipo, misura continuamente una grandezza, ad esempio l'assorbanza nel caso del rivelatore UV, della fase mobile che scorre attraverso la cella di rivelazione. In particolare ciascuna sostanza eluita dalla colonna provoca una deviazione del segnale che viene memorizzato e analizzato da un software di acquisizione dati su un PC collegato al rivelatore.

3.5.1 HPLC-UV

Nella fase preliminare di questo lavoro di tesi la determinazione degli ormoni steroidei (Mix 1 e Mix 2 prima, Mix 11 poi) in matrice acquosa (acqua di rete) e nel latte (parzialmente scremato e intero) è stata effettuata attraverso la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata a una rilevazione UV.

Il funzionamento di questo tipo di rivelatore è basato sulla misurazione dell'assorbimento della luce UV da parte degli analiti presenti in un campione. In dettaglio, la luce emessa dalla sorgente luminosa del *detector*, una lampada al deuterio (D2), incide sul flusso in uscita dalla colonna. Quindi, una volta eluiti separatamente, gli analiti attraversano la cosiddetta cella di flusso posta lungo il percorso ottico della luce e assorbono l'energia luminosa a specifiche lunghezze d'onda; ne segue un'assorbanza direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita, a quella specifica lunghezza d'onda. Tali informazioni vengono trasformate da un software in un segnale elettrico a sua volta rielaborato per produrre un cromatogramma. Questo costituisce quindi l'*output* dell'analisi e si presenta come una serie di picchi posti su un sistema di assi cartesiani, ciascuno derivante dalla relazione tra la quantità di tempo impiegata dal singolo analita per attraversare la colonna e raggiungere il rivelatore, ovvero il tempo di ritenzione (asse x), e la sua assorbanza (asse y). Attraverso il confronto con il cromatogramma di uno

standard è possibile identificare gli analiti in base al tempo di ritenzione e quantificarli misurando l'area del relativo picco.

Per questo lavoro il rilevatore è stato impostato a due lunghezze d'onda: 225 nm, per rilevare gli estrogeni E2 e EE2, e 242 nm, per rilevare tutti gli altri analiti. Lo strumento utilizzato prevede un'iniezione manuale impostata a 20 µL di volume e una separazione fatta con eluizione in gradiente (Tabella 3), per la quale come fasi mobili sono state utilizzate acetonitrile (ACN, Fase A) e acqua acida (H₃PO₄ 25 mM, Fase B), con velocità di flusso pari a 1 mL/min.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	30	70
12	90	10
15	95	5
17	100	0
25	100	0
27	30	70

Tabella 3. Gradiente impostato per l'analisi HPLC-UV

Il gradiente consente di separare diversi analiti, ma non tutti i 15 studiati in un'unica corsa, che sono stati, pertanto, analizzati come Mix 1 e Mix 2. Si riportano di seguito dei cromatogrammi relativi a standard in EtOH a 5 mg/L del Mix 1 (PRED, PREDLO, CORT, DEXA, TRIAM, E2 e M-PROG), Mix 2 (H-CORT, BETA, FLUO, TST, E1, EE2, H-PROG e PROG) e Mix 11 (BETA, DEXA, FLUO, TRIAM, TST, E1, E2, EE2, H-PROG, M-PROG e PROG).

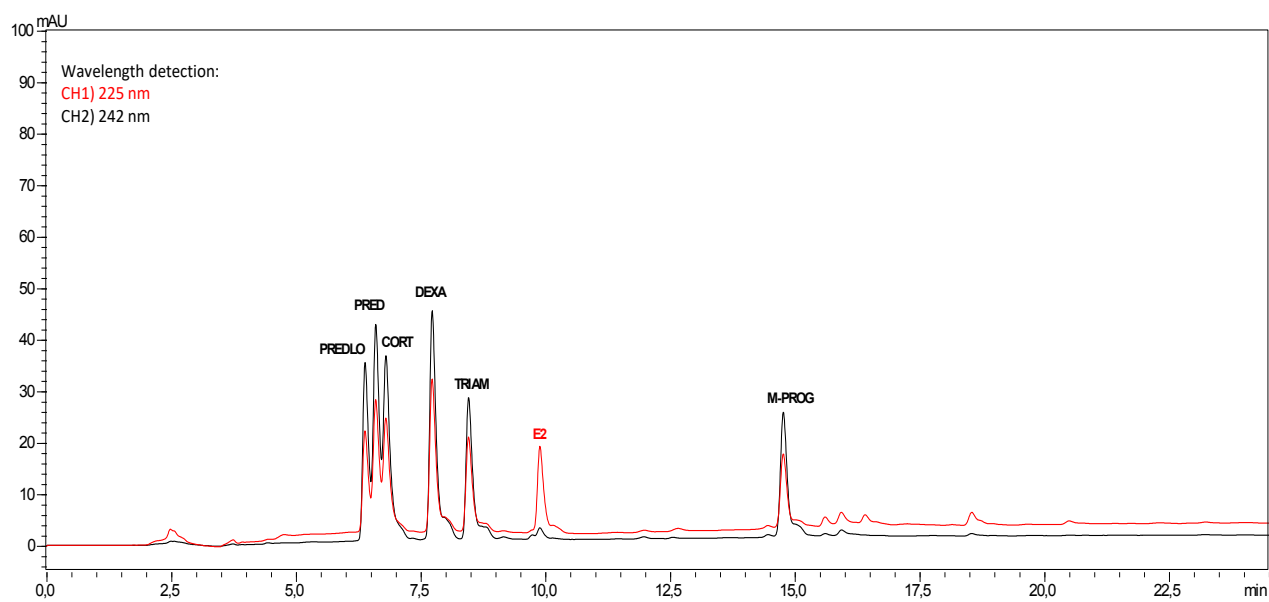


Figura 10. Cromatogramma relativo ad uno standard in EtOH a 5 mg/L del Mix 1

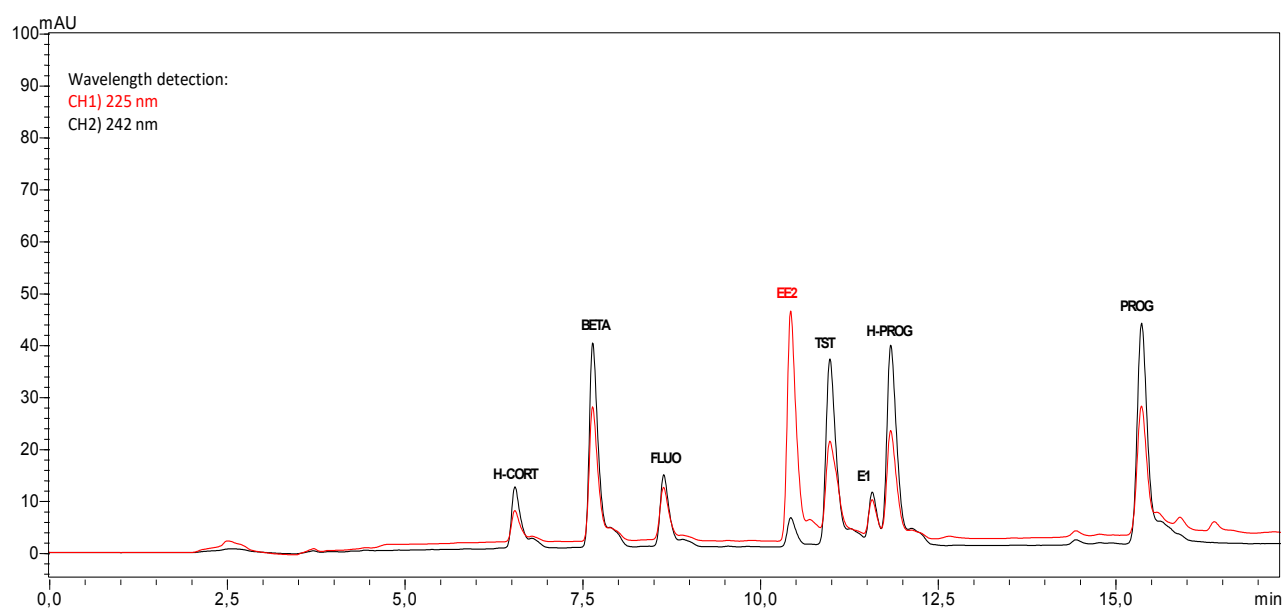


Figura 11. Cromatogramma relativo ad uno standard in EtOH a 5 mg/L del Mix 2

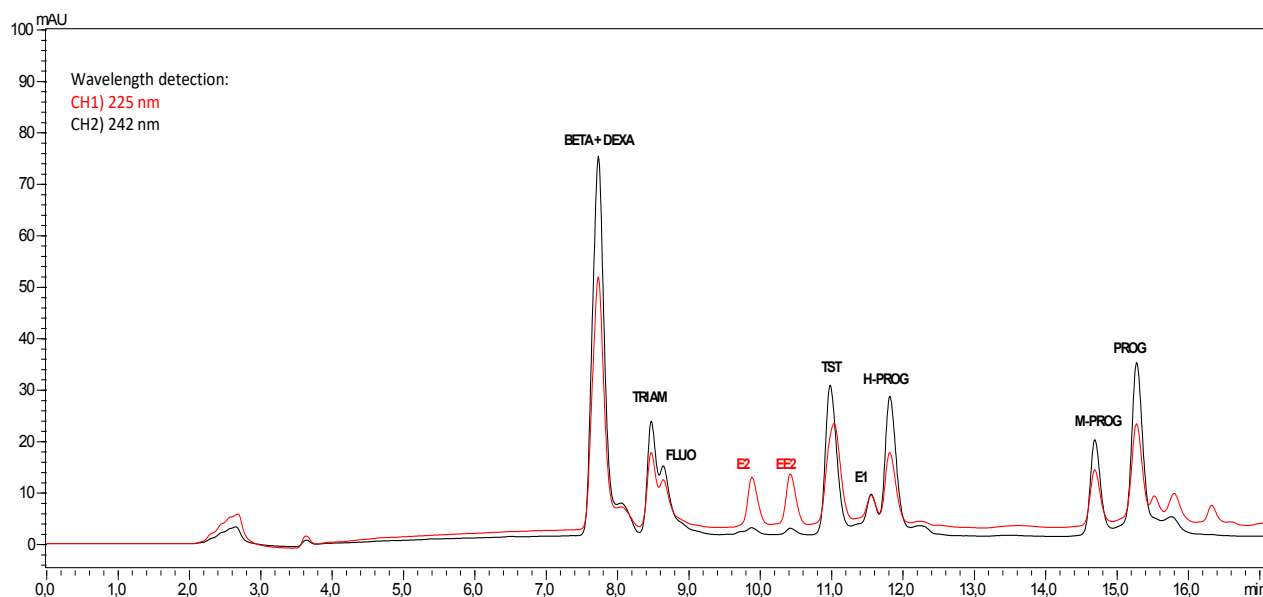


Figura 12. Cromatogramma relativo ad uno standard in EtOH a 5 mg/L del Mix 11

3.5.2 HPLC-MS/MS

Nella seconda parte di questo lavoro di tesi la determinazione degli 11 ormoni steroidei selezionati (Mix 11) nei campioni di acqua (di rete/da bere) e latte (parzialmente scremato/intero/senza lattosio/per lattanti) è stata effettuata abbinando la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) alla rilevazione tramite spettrometria di massa tandem (MS/MS).

Il funzionamento di questo tipo di rilevatore è basato sulla frammentazione molecolare (ionizzazione) degli analiti oggetto di ricerca ed il loro successivo riconoscimento in base al rapporto massa/carica (m/z) degli ioni in fase gassosa generatisi da tale ionizzazione. Una molecola, infatti, per poter essere osservata e misurata nelle sue proprietà di massa deve essere prima ionizzata. Gli ioni prodotti vengono poi accelerati ad una velocità specifica e proiettati in un analizzatore di massa appropriato che separa le diverse entità di massa.

Uno spettrometro tandem, nello specifico, è costituito da due analizzatori disposti in serie; in questo caso si è utilizzato un triplo quadrupolo (QQQ) costituito da due analizzatori intervallati da una camera di collisione. Come schematizzato in Figura 13, attraverso il primo analizzatore (quadrupolo) viene selezionato lo ione desiderato tra i vari ioni presenti in uno spettro, nonché quello più abbondante. Questo ione, chiamato ione padre, viene successivamente fatto collidere nella camera di collisione con un opportuno gas di

collisione (azoto) generando degli ioni figli (ioni target), separati poi dal secondo analizzatore in base al loro rapporto m/z e registrati dal *detector*. Quest'ultimo, in particolare, quantifica gli ioni secondo la modalità MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), altamente selettiva, e genera lo spettro di massa.

Tra le sorgenti per la ionizzazione più utilizzate figura la sorgente ESI (*electrospray ionisation*), nonché quella adoperata in questo lavoro di tesi. Si tratta di una tecnica di ionizzazione soft che preserva le strutture molecolari risultando meno distruttiva. Nel dettaglio, il campione viene aspirato attraverso un capillare e nebulizzato grazie all'elevata differenza di potenziale che viene stabilita all'estremità del capillare. Ne risulta quindi uno spray costituito da goccioline cariche contenenti l'analita ionizzato. Successivamente, con l'aiuto di un gas inerte, il solvente contenuto nelle goccioline viene fatto evaporare. In questo modo gli ioni molecolari si generano direttamente dal campione, di conseguenza è possibile anteporre alla sorgente una separazione cromatografica in modo tale da identificare e quantificare più analiti presenti nello stesso campione.

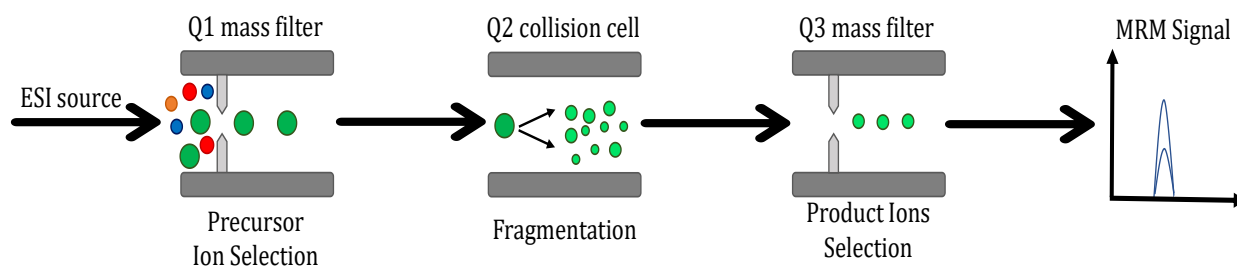


Figura 11. Schema sul funzionamento del sistema HPLC-MS/MS utilizzato

Lo strumento utilizzato prevede un campionamento automatico tramite autocampionatore con volume di prelievo impostato a 10 μL e una separazione fatta con eluizione in gradiente (Tabella 4), per la quale come fasi mobili sono state utilizzate una soluzione acquosa di fluoruro di ammonio (NH_4F) 0.001 M (Fase A) e ACN (Fase B), con velocità di flusso pari a 0,5 mL/min. Per lo studio effettuato si è utilizzato un metodo cromatografico già in uso nel laboratorio che prevede una corsa cromatografica della durata di 20 minuti con un tempo di riequilibrio di 7 minuti (Bianchini P *et al*, 2023).

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	70	30
4	70	30
12	15	85
17	15	85
17,5	2	98
19,5	2	98
20	70	30

Tabella 4. Gradiente impostato per l'analisi HPLC-MS/MS

Si riporta di seguito il cromatogramma TIC (acronimo di *Total Ion Chromatogram*) nelle condizioni cromatografiche selezionate di uno standard in EtOH a 50 µg/L del Mix 11. In esso è possibile notare che i picchi relativi ai tre estrogeni sono meno evidenti in quanto la ionizzazione in negativo è meno efficiente di quella in positivo.

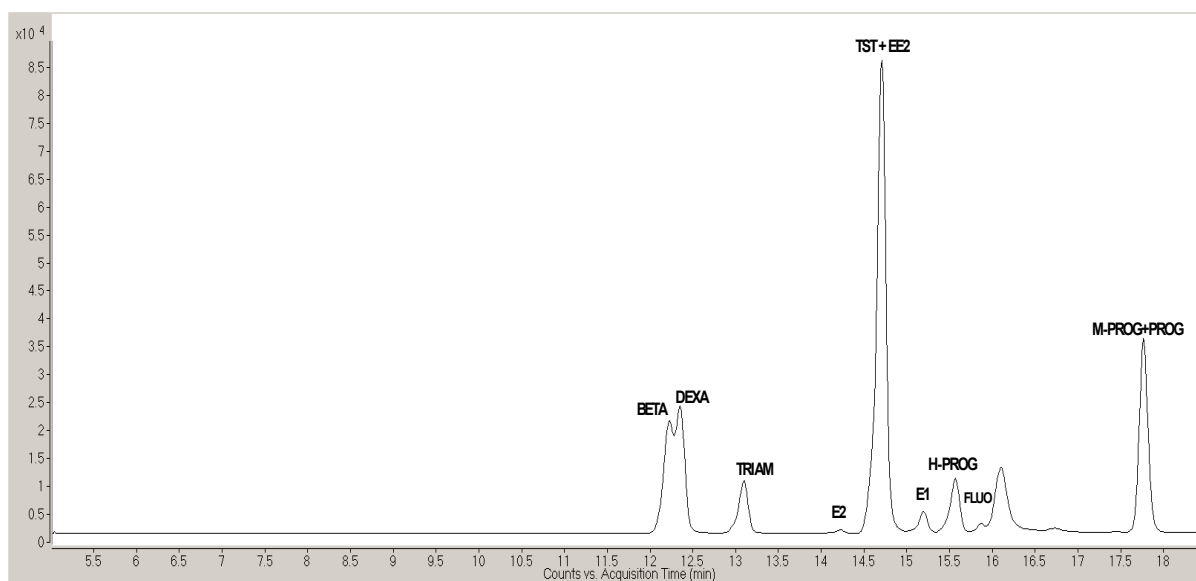


Figura 12. Cromatogramma TIC relativo ad uno standard in EtOH a 50 µg/L del Mix 11

Le condizioni operative della sorgente sono: temperatura del gas 350 °C, flusso del gas 12 L/min, pressione del nebulizzatore 50 psi, temperatura *sheath* gas 400 °C con un flusso di 12 L/min, voltaggio capillare 4000 V positivo e 3000 V negativo, voltaggio *nozzle* 0 V positivo e 1500 V negativo.

Le frammentazioni utilizzate per ciascun analita studiato si riportano nella Tabella 5 (Bianchini P *et al*, 2023) in cui si osserva che tutti gli analiti vengono ionizzati e letti in positivo, tranne gli estrogeni che vengono acquisiti in modalità negativa. Questo è possibile grazie alla presenza di un'inversione di polarità nello strumento che consente quindi di rilevare tutti gli analiti in una sola corsa cromatografica.

Analita	Ione padre (m/z)	Ione figlio (m/z)	Dwell time (ms)	Fragmentor (V)	E di collisione (V)	Polarità
BETA	373	355,3 147,1	15 15	82 82	8 24	Positiva
DEXA	373	355,4 91	15 15	76 76	4 80	Positiva
TRIAM	415	397,3 91	15 15	130 130	8 80	Positiva
FLUO	495	475,3 337,3	15 15	88 88	0 8	Positiva
TST	289	109 97,1	15 15	76 76	24 20	Positiva
E1	269	145,1 143,1	30 30	148 148	44 60	Negativa
E2	271	183,3 143,1	40 40	166 166	50 64	Negativa
EE2	295	145,1 143,1	40 40	154 154	44 68	Negativa
H-PROG	331	109,1 97,1	15 15	118 118	28 24	Positiva
M-PROG	387	327,4 123,1	15 15	106 106	8 24	Positiva
PROG	315	109 97	15 15	94 94	24 20	Positiva

Tabella 5. Frammentazioni e parametri per l'analisi HPLC-MS/MS degli 11 analiti

Si riportano di seguito i cromatogrammi di ciascun analita ottenuti in modalità MRM dall'analisi di uno standard in EtOH a 50 µg/L del Mix11.



Figura 13. Cromatogrammi acquisiti in modalità MRM mediante analisi di una soluzione standard del MIX 11 (50 $\mu\text{g/L}$) in EtOH

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Screening dei polimeri

In questo lavoro di tesi, concernente lo sviluppo di un metodo analitico per la determinazione di ormoni steroidei appartenenti a 4 diverse famiglie (estrogeni, progestinici, androgeni e glucocorticoidi) in matrici complesse, ci si è concentrati in una fase preliminare sulla scelta del polyHIPE con cui effettuare l'estrazione in fase solida (SPE) come step di pretrattamento del campione. Nello specifico, le prove SPE sono state fatte utilizzando come matrice l'acqua di rete (Pavia, Italia) e testando 3 diversi materiali (Lipo, Idro e PEG) la cui composizione era stata precedentemente studiata per applicazioni analitico-farmaceutiche presso il Dipartimento di Scienze del Farmaco e il Dipartimento di Chimica di Pavia (Brusotti G *et al*, 2016; Corti *et al*, 2019; Speltini A *et al*, 2022; De Soricellis *et al*, 2023). Si è considerato il Lipo come polimero di base in quanto la sua composizione conferisce al materiale un carattere idrofobico (tipico di una fase inversa), che evita il rigonfiamento (*swelling*) del polimero stesso impaccato in cartuccia, durante il contatto con la soluzione acquosa ed è, inoltre, potenzialmente adatto all'adsorbimento di composti polari/aromatici come gli analiti in oggetto.

In questa fase iniziale della ricerca si sono, pertanto, svolte prove in cartuccia SPE per valutare l'affinità dei tre materiali nei confronti degli ormoni steroidei. L'estrazione è stata fatta su campioni di acqua di rubinetto (10 mL, pH nativo) arricchiti con 1 mg/L di ciascun analita. Si è scelto di testare i 15 analiti target raggruppati in 2 diverse miscele (Mix 1 e Mix 2), sia per evitare di saturare il materiale adsorbente sia per garantire una soddisfacente successiva separazione cromatografica in HPLC-UV. Pertanto, tale screening ha previsto la preparazione di cartucce SPE (capacità 6 mL) impaccate con ciascun polimero (200 mg), da testare in parallelo per l'estrazione del Mix 1 (PRED, PREDLO, CORT, DEXA, TRIAM, E2 e M-PROG) e del Mix 2 (H-CORT, BETA, FLUO, TST, E1, EE2, H-PROG e PROG).

Per valutare l'adsorbimento, l'analisi strumentale in HPLC-UV è stata successivamente eseguita iniettando il campione prima e dopo il passaggio sulla cartuccia, in entrambi i casi dopo l'aggiunta di MeOH in rapporto 7:3 (campione:MeOH) a causa della scarsa e non riproducibile stabilità di risposta strumentale dei glucocorticoidi in acqua. La % di

adsorbimento è stata calcolata confrontando le risposte nelle soluzioni prima e dopo il contatto con il materiale secondo la seguente formula:

$$\% \text{ Ads} = \left(1 - \frac{\text{Area}_{\text{Percolato}}}{\text{Area}_{\text{Campione}}} \right) \times 100$$

Formula 1. Calcolo della % di adsorbimento

In Figura 16 vengono, quindi, riportate le percentuali di adsorbimento medie ottenute per i 15 analiti, riportati in ordine di LogP crescente, in relazione a ciascun materiale testato. Dal grafico è possibile osservare che per i composti con LogP > 3 l'estrazione è quantitativa per tutti i polimeri, con adsorbimenti medi superiori al 90%. Per quanto riguarda i glucocorticoidi, invece, il loro più basso grado di lipofilia (LogP < 3) spiega il minor adsorbimento rispetto agli altri analiti che, al contempo, migliora rendendo più idrofilo il polimero. In particolare, per questi analiti le migliori efficienze di estrazione si sono ottenute utilizzando come fase adsorbente il polimero PEG. Nello specifico, gli incrementi più evidenti si sono osservati per i 4 analiti meno lipofili (CORT, PRED, H-CORT e PREDLO), seppur raggiungendo valori medi di adsorbimento nell'intervallo 39-48%, ma comunque più elevati di quanto ottenuto con Lipo (11-22%) e Idro (20-36%). Nel contempo, lo stesso materiale ha garantito un'estrazione quantitativa per tutti gli altri analiti, compresi BETA, DEXA e TRIAM.

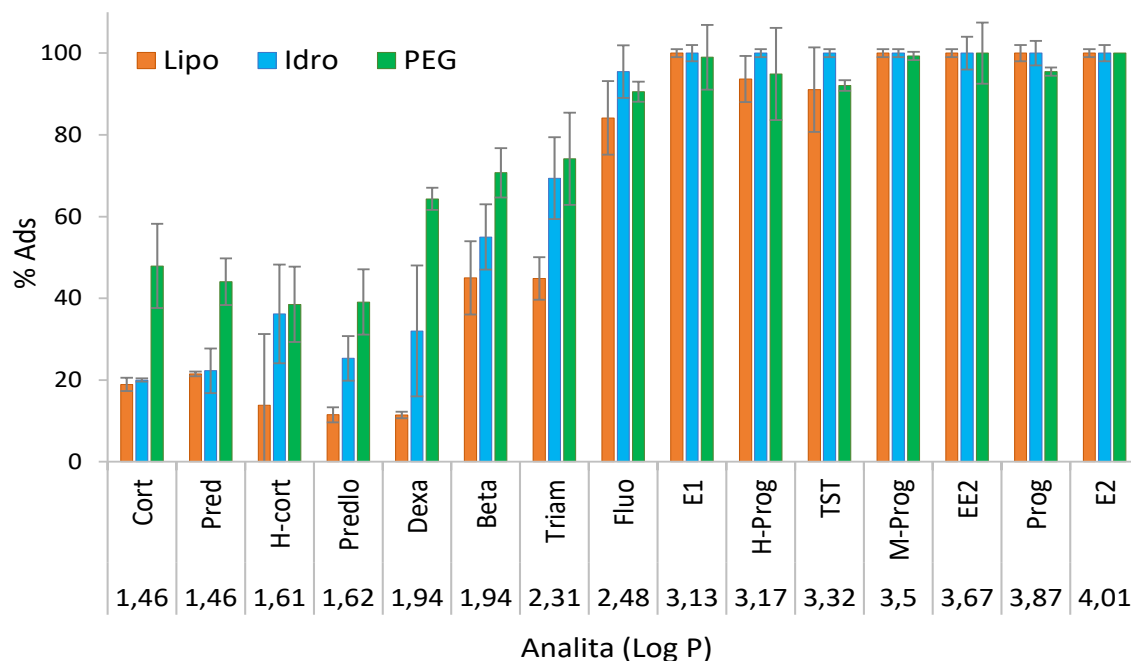


Figura 14. Efficienza media di estrazione ottenuta sui tre polimeri da campioni di acqua di rubinetto arricchiti con 1 mg/L di ogni ormone steroideo (RSD inter-day < 18%, n=3)

La modificazione della composizione del polimero mediante polimerizzazione *in situ* in presenza di monomeri più idrofilici rispetto al butil acrilato è stata, quindi, condotta con successo, come evidenziato dalle misure dell'angolo di contatto. Per il polimero PEG si è infatti osservato un angolo di contatto medio pari a 20° (RSD 25%, $n=10$), non misurabile invece per il polimero Idro (la deviazione standard è abbastanza alta a causa della morfologia irregolare della superficie del polimero esposta alla misura). Si evince, di conseguenza, una scala di idrofilia crescente nell'ordine Lipo < PEG < Idro. In questo modo è stato, dunque, possibile preparare polimeri porosi "anfifilici", ovvero a doppia interazione lipofila-idrofila, evidenziando nel contempo la versatilità della preparazione via HIPE.

I risultati hanno portato alla selezione del PEG come fase SPE, in quanto si presta meglio degli altri per l'estrazione multiclasse dei composti target, in virtù del suo specifico bilanciamento tra carattere lipofilo e idrofilico derivante dalla sua composizione chimica.

Per migliorare la sua affinità in termini di adsorbimento verso i glucocorticoidi, si è poi provato a renderlo più selettivo mediante la strategia di *imprinting* molecolare in fase di sintesi. In particolare, sono stati allora preparati 3 diversi MIP-polyHIPE (*molecular imprinted polymer*), MIP 1:5 FLU, MIP 1:5 BETA e MIP 1:5 CORT, come riportato al punto 3.2. Sono state, quindi, eseguite delle prove SPE ($n=2$ per MIP BETA 1:5 e MIP CORT 1:5; $n=4$ per MIP 1:5 FLU) nelle stesse condizioni delle prove precedentemente descritte, anche in questo caso valutando l'adsorbimento mediante HPLC-UV. In Figura 17 vengono riportati i risultati ottenuti con i materiali imprantati insieme a quelli precedentemente ottenuti sul polimero PEG non imprantato.

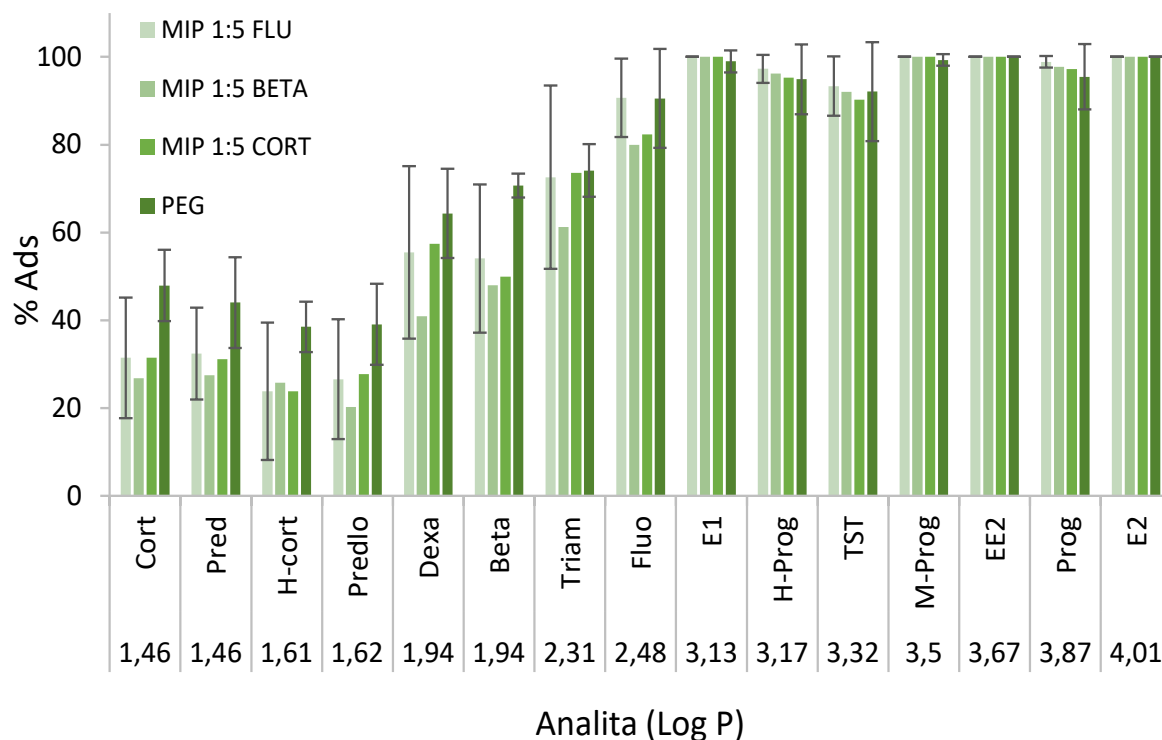


Figura 15. Efficienza media di estrazione ottenuta sui tre polimeri MIP-PEG e sul polimero NIP-PEG da campioni di acqua di rubinetto arricchiti con 1 mg/L di ogni ormone steroideo

Dal grafico non si evince alcun miglioramento nell'adsorbimento dei glucocorticoidi, a fronte di risultati pressoché sovrapponibili per quanto riguarda invece i restanti analiti. Di conseguenza, prima di scartare definitivamente l'approccio MIP, si sono eseguite delle prove, parallelamente su PEG non imprantato e sul MIP per il quale si sono registrati gli adsorbimenti medi più alti (MIP-FLU), analoghe a quelle fatte, caricando però sulle cartucce 10 mL di acqua di rubinetto a pH nativo arricchiti a 1 mg/L e a 8 mg/L di templat. Le percentuali di adsorbimento medio ($n=2$) ottenute per i due materiali sono state rispettivamente dell'86% e del 97% nelle prove alla concentrazione più bassa; nelle prove a 8 mg/L l'adsorbimento osservato per il polimero non imprantato si è confermato e risulta quindi quantitativo, mentre per quanto riguarda il MIP si è dimezzato. Di conseguenza è possibile concludere che l'*imprinting* non è di fatto avvenuto, come già osservato per MIP-BETA e MIP-CORT con i rispettivi templati dalle prove di adsorbimento del Mix 1 e 2. Una possibile spiegazione può essere ricercata nella non ottimale ripartizione del templat nella fase oleosa dell'emulsione e/o nell'interferenza della componente polare acquosa nella stessa riguardo la coordinazione della molecola stampo con i monomeri.

Sulla base di quanto messo in luce dalle diverse prove di screening, si è eletto il PEG non improntato come materiale adsorbente da studiare ulteriormente, la cui struttura porosa interconnessa, tipica di un polyHIPE, è visibile in Figura 18. Considerando gli adsorbimenti non soddisfacenti di PRED, PREDLO, CORT e H-CORT, questi quattro analiti sono stati esclusi dalle prove successive, in cui si è invece lavorato sugli altri 11 ormoni steroidei (4 glucocorticoidi, 1 androgeno, 3 estrogeni e 3 progestinici).

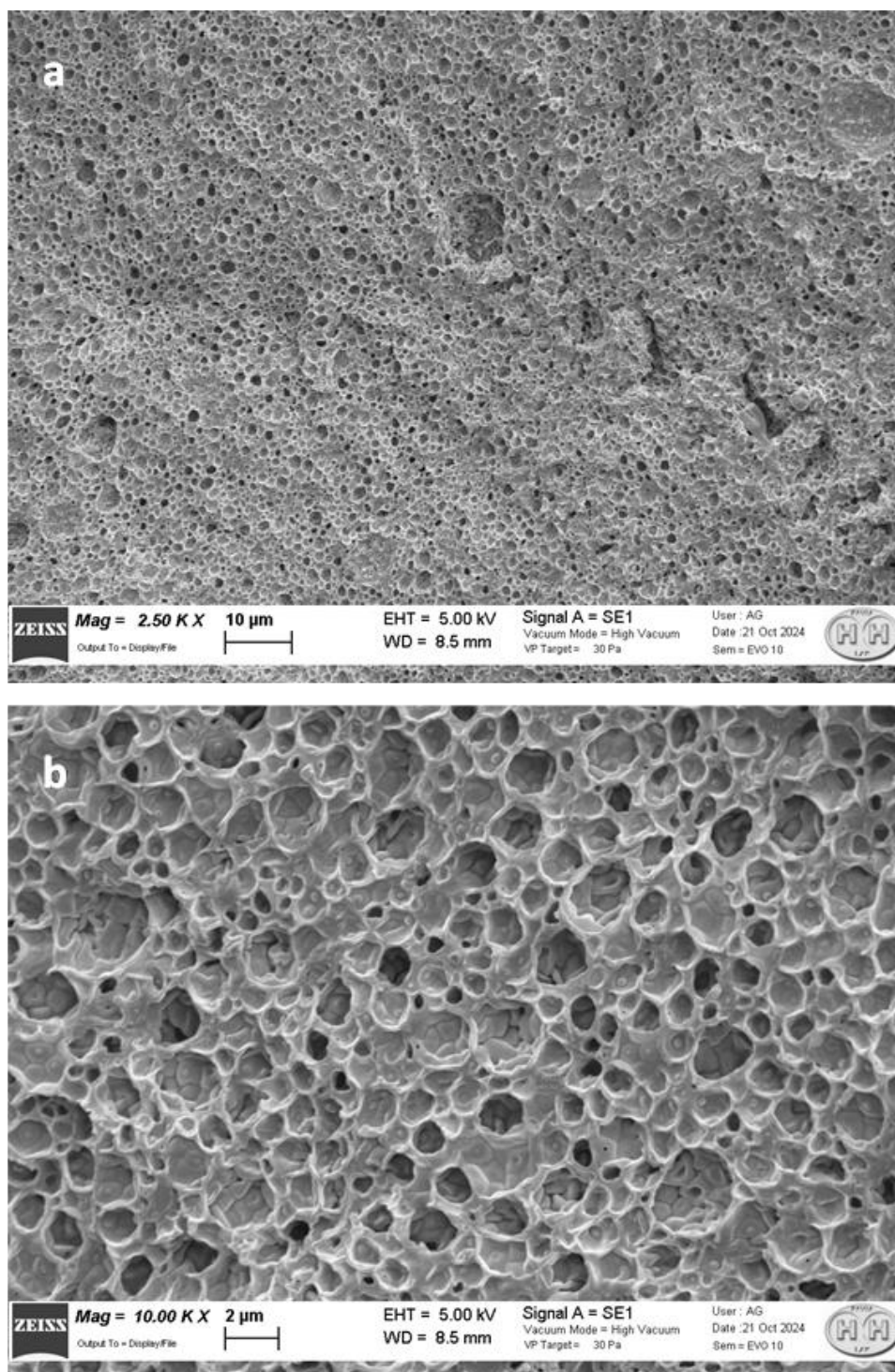


Figura 16. Immagini SEM acquisite su polimero PEG a 2,50 K MAG (a) e 10,00 K MAG (b) con un microscopio Zeiss EVO MA10 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germania), dopo gold sputtering.

Al fine di mettere a punto un protocollo di pre-concentrazione, il sorbente deve essere in grado non solo di trattenere gli analiti, ma anche di desorbirli in opportuno sorbente. Pertanto, il materiale polyHIPE selezionato è stato ulteriormente studiato attraverso l'esecuzione di test di recupero in acqua. Quindi, dopo il caricamento del campione (10

mL di acqua di rubinetto a pH nativo arricchiti a 1 mg/L di ciascuno degli 11 analiti), gli ormoni steroidei adsorbiti sulla fase solida sono stati eluiti attraverso il passaggio in cartuccia di 2 mL di solvente eluente in un unico step. Gli eluati tal quali raccolti sono stati poi analizzati in HPLC-UV.

In questo lavoro di tesi si è scelto di utilizzare come solvente di eluizione l'EtOH, già selezionato in studi precedenti per la sua efficacia nell'eluizione di ormoni steroidei in procedure di estrazione diverse, come, ad esempio, la *thin film microextraction* e la *in-vial SPE* (Merlo F et al, 2024; Bianchini P et al, 2024). Inoltre, si è optato per questo eluente in quanto meno tossico e quindi più ecologico e sicuro per la salute rispetto ad altri solventi organici utilizzati a questo scopo, anche in forma acidificata e in volumi fino a decine di mL, tra cui:

- MeOH, puro o in miscela, ad esempio MeOH:EtAc 2:8 v/v o MeOH:NH₃ 95:5 v/v (Kong DM *et al*, 2023; Yuan Y *et al*, 2019);
- EtAc (acetato di etile);
- ACE (acetone), anche in miscela con DCM (diclorometano) 30:70 v/v (Goeury K *et al*, 2022);
- ACN, puro o in miscela, ad esempio ACE:ACN 1:9 v/v (Zhao Z *et al*, 2021);
- CAN (nitrato cerico ammonico) acidificato (2% CH₃COOH) (Xia X *et al*, 2009).

Il MeOH, in particolare, figura come solvente "raccomandato" dalla guida di selezione CHEM21 e, di fatto, tra i solventi maggiormente eletti per l'estrazione di ormoni steroidei, ma anche di altri analiti (Merlo F *et al*, 2023). Tuttavia, si tratta di un solvente tossico per l'uomo e per l'ambiente e, di conseguenza, a parità di efficacia, l'EtOH risulta una scelta ottimale.

Le percentuali di recupero medio relative ai composti selezionati, posti in ordine di LogP crescente, sono riportate in Figura 19.

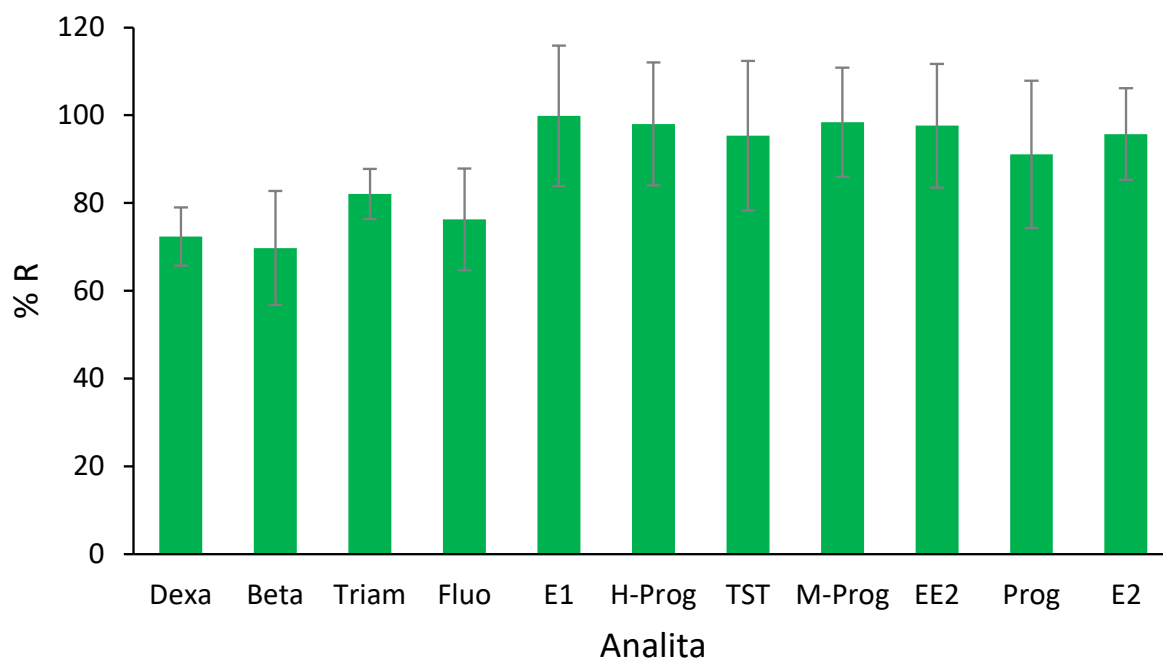


Figura 17. Recuperi medi percentuali ($n=3$) ottenuti da campioni di acqua di rubinetto arricchiti con 1 mg/L di ogni ormone steroideo

Dal grafico è possibile osservare un recupero medio superiore al 70% (70-82%) per i 4 glucocorticoidi selezionati e nell'intervallo 91-100% per tutti gli altri analiti, con un valore di RSD (deviazione standard relativa) inter-giornaliero accettabile ($< 19\%$, $n=3$). Tali recuperi sono stati calcolati mediante calibrazione esterna, come descritto in sezione 4.2.

I risultati soddisfacenti, oltretutto ottenuti lavorando con lotti di sintesi del materiale diversi, hanno confermato ulteriormente la buona prestazione del polyHIPE PEG per l'estrazione multiclasse degli 11 analiti target. Pertanto si è proceduto con lo sviluppo della procedura SPE in acqua di rubinetto.

4.2 Sviluppo della procedura SPE in acqua

La messa a punto della procedura SPE in acqua di rubinetto ha previsto la valutazione di diversi parametri:

- Volume di campione;
- Quantità di fase solida;
- Portata di caricamento del campione;
- Volume di eluente;

- Concentrazione degli analiti;
- Riutilizzo della cartuccia.

Mantenendo un volume di campione di 10 mL come nelle prove iniziali, si è anzitutto sperimentata l'estrazione di una concentrazione più bassa di analiti preparando campioni arricchiti a 0,2 mg/L di ciascuno di essi. In queste prove i recuperi si sono mantenuti complessivamente invariati (>70%), anche testando, poi, un volume di caricamento maggiore (25 mL). Nella fattispecie, l'aumento del volume si è rivelato vantaggioso in termini di fattore di arricchimento ($EF = V_{\text{campione}}/V_{\text{eluente}}$), che da 5 è infatti passato a 12,5 (eluizione in 2 mL), quindi più utile in termini di sensibilità per l'analisi in traccia di questi composti come contaminanti dell'acqua.

Inoltre, con l'obiettivo di aumentare ulteriormente il fattore di arricchimento e diminuire la quantità di solvente utilizzato a favore della sostenibilità del metodo, si è anche sperimentata l'eluizione con 1 mL di EtOH. A questo scopo sono state eseguite delle prove di recupero in doppia eluizione da 1 mL ciascuna in successione. Confrontando i recuperi ottenuti con la prima eluizione e quelli ottenuti dall'insieme delle due eluizioni si è concluso che sono necessari 2 mL di eluente per desorbire efficientemente gli analiti trattenuti dal polimero.

Proseguendo nello sviluppo della procedura di estrazione, si è provato a dimezzare la quantità di fase solida per cartuccia (100 mg) al fine di ridurre il consumo di sorbente per ciascuna prova. Tuttavia, il peggioramento dei recuperi registrato in queste prove, soprattutto per i glucocorticoidi (fino a -50%), ha portato a escludere tale possibilità e a confermare il quantitativo di 200 mg come miglior compromesso.

Durante l'esecuzione delle diverse prove si è anche valutata l'influenza della velocità di flusso del campione sull'adsorbimento e sulla successiva eluizione degli ormoni steroidei target. Cronometrando di volta in volta il caricamento dei campioni di acqua si è osservato che un flusso troppo rapido non consente una buona interazione tra gli analiti e il sorbente. Di contro, un passaggio troppo veloce dell'EtOH non garantisce un'eluizione efficiente. In entrambi i casi, infatti, si è registrato un abbassamento generale dei recuperi degli analiti e, pertanto, si è infine stabilita come portata di caricamento ed eluizione un flusso di circa 0,5 mL/min. Seppure il tempo necessario per il completamento della singola SPE

potrebbe risultare svantaggioso in relazione alla dimensione dei campioni, tale criticità è compensata dalla possibilità di processare fino a 10 campioni simultaneamente sul collettore multiposizione, il che contribuisce a migliorare la produttività della procedura.

Una volta definito il protocollo SPE finale, si sono condotti ulteriori test di recupero su campioni arricchiti a concentrazioni più basse di quelle già sperimentate. Si sono dunque testati, in doppio ($n=2$), livelli di concentrazione pari a 1 $\mu\text{g/L}$, 200 ng/L e 50 ng/L , successivamente quantificati con sistema HPLC-MS/MS sfruttando l'elevata selettività della modalità MRM. Per le prove a 50 ng/L si è inoltre optato per l'evaporazione a secco dell'eluato in flusso di N_2 , poi ricostituito in 0,25 mL di EtOH, al fine di aumentare ulteriormente il fattore di arricchimento da 12,5 a 100 e favorire la successiva quantificazione. Le percentuali di recupero medio degli 11 analiti ordinati per famiglia di appartenenza (glucocorticoidi, androgeni, estrogeni e progestinici) sono riportate in Figura 20. Dal grafico è possibile constatare l'affidabilità della procedura anche allo *spike* più basso testato, in cui si sono confermati i recuperi dei glucocorticoidi, più bassi rispetto agli steroidi sessuali, ma comunque superiori a circa il 50% consentendone quindi la quantificazione.

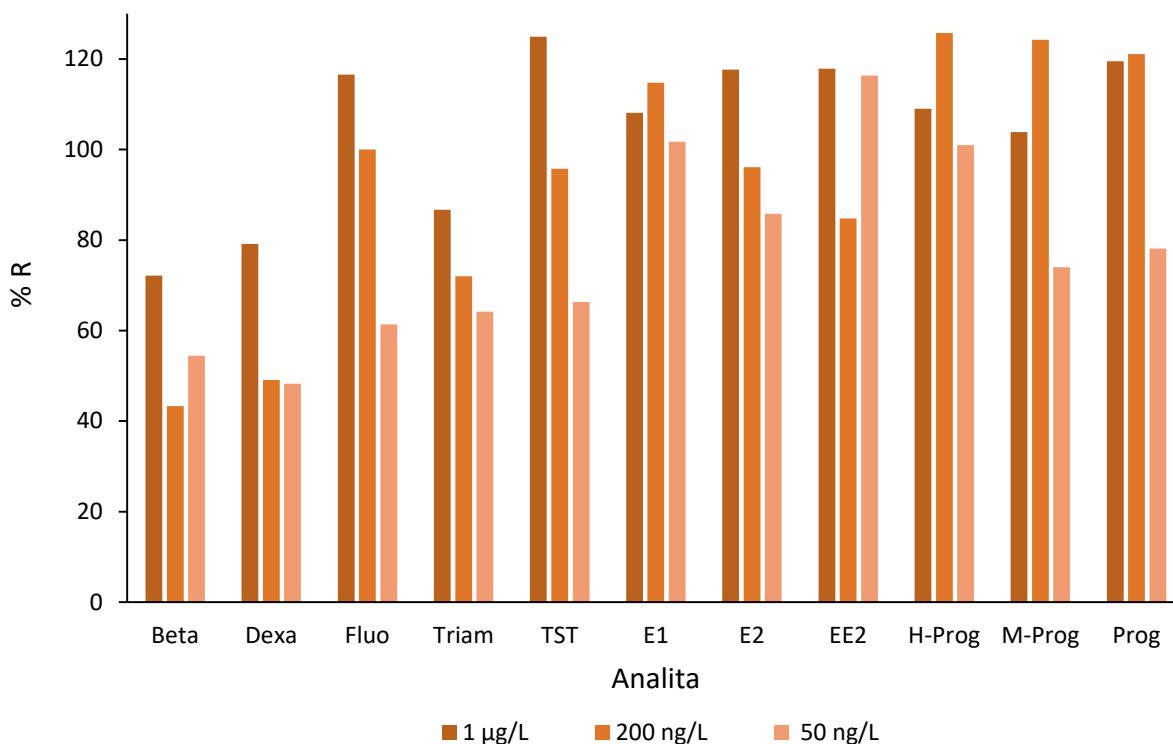


Figura 18. Recuperi medi percentuali ($n=2$) ottenuti da campioni di acqua di rubinetto (25 mL) arricchiti a 1 $\mu\text{g/L}$, 200 ng/L e 50 ng/L di ciascun ormone steroideo

La condizioni SPE così stabilite per concentrazioni a livello di ng/L sono state poi testate su un'acqua potabile commerciale. Nello specifico si è scelta un'acqua minimamente mineralizzata con basso residuo fisso, indicata anche in fase di svezzamento e per la preparazione del latte in polvere e altri alimenti per bambini. L'acqua utilizzata per i neonati deve, infatti, rispettare caratteristiche particolari a tutela del loro benessere. I sali minerali, ad esempio, dovrebbero essere minimi poiché si trovano già nelle corrette quantità all'interno del latte materno o del latte in formula e non è quindi necessario integrarli in nessun altro modo. Per evitare il rischio di sovraccaricare i loro reni, ancora non del tutto sviluppati, un'acqua diuretica risulta pertanto ideale.

Trattandosi di una matrice più semplice di quella impiegata in fase di messa a punto del protocollo, quest'acqua è stata usata in test di recupero allo *spike* più basso sperimentato (50 ng/L). Le percentuali di recupero medio ($n=2$) degli 11 analiti ordinati per famiglia di appartenenza sono riportate a confronto con quelle ottenute precedentemente in acqua di rete in Figura 21. Il grafico mette in evidenza un miglioramento dei recuperi relativi ai glucocorticoidi (>70%) e una conferma di quelli degli altri analiti, con recuperi complessivamente compresi nell'intervallo 70-108%.

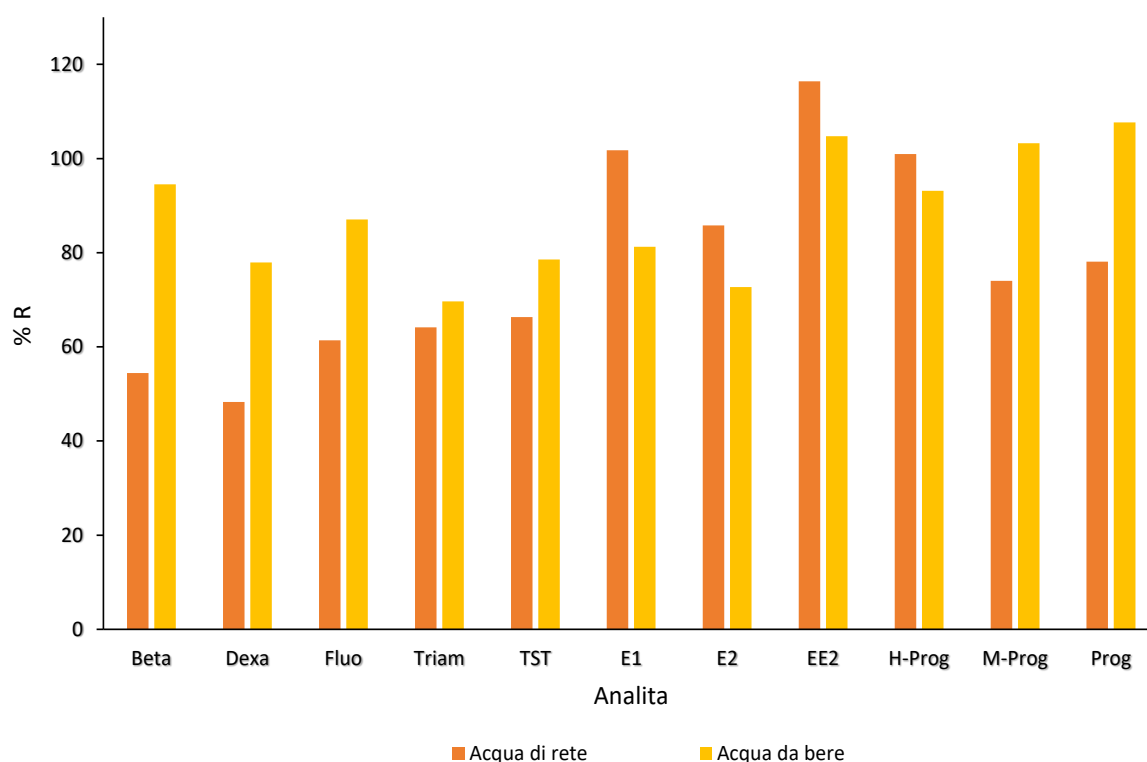


Figura 19. Recuperi medi percentuali ($n=2$) ottenuti da campioni di acqua di rete e minerale in bottiglia (25 mL) arricchiti a 50 ng/L di ciascun ormone steroideo

Seppure la determinazione di componenti in traccia e ultratraccia risulti spesso molto complessa e affetta da interferenze e contaminazioni di natura varia, confrontando la risposta degli analiti nella matrice originale (eluato SPE dalla pre-concentrazione di acqua) e nello standard (EtOH) a parità di concentrazione è stato possibile escludere un eventuale effetto matrice (errore commesso nella determinazione dell'analita a causa degli altri componenti del campione). Per questo motivo si è scelta la quantificazione mediante metodo di calibrazione esterna che, nel dettaglio, è stata effettuata preparando 6 soluzioni standard multiple in EtOH nell'intervallo 2,5-50 µg/L. Si riportano in Tabella 6 per ciascun analita i parametri della calibrazione lineare e i limiti di rivelabilità (IDL, MDL) e di quantificazione (IQL, MQL) strumentali e del metodo, rispettivamente calcolati secondo le seguenti formule:

$$IDL = \frac{3.3 * N}{b} \quad MDL = \frac{IDL}{EF} \quad IQL = \frac{10 * N}{b} \quad MQL = \frac{IQL}{EF}$$

Formula 2. Calcolo di IDL e MDL

Formula 3. Calcolo di IQL e MQL

Con N si indica il *Noise* (rumore) calcolato come altezza; b indica la pendenza della retta di calibrazione ottenuta utilizzando le altezze; con EF (*Enrichment Factor*), infine, si indica il fattore di arricchimento del metodo di estrazione finale.

Per limite di rivelabilità strumentale (IDL, acronimo di *Instrumental Detection Limit*) si intende la più bassa concentrazione analitica che può essere rilevata come segnale significativamente diverso dal bianco, ma non necessariamente determinata quantitativamente, nelle condizioni sperimentali del metodo. Il limite di rivelabilità di un metodo (MDL, acronimo di *Method Detection Limit*) è la più piccola concentrazione di un analita che il metodo può rilevare nel campione sottoposto all'analisi. Invece, con limite di quantificazione strumentale (IQL, acronimo di *Instrumental Quantification Limit*) ci si riferisce alla più bassa concentrazione analitica che può essere determinata dallo strumento quantitativamente con accettabile precisione ed esattezza nelle condizioni sperimentali del metodo. Il limite di quantificazione di un metodo (MQL, acronimo per *Method Quantification Limit*) è la più piccola concentrazione che può essere quantificata con buona precisione ed esattezza in un campione. MDL e MQL tengono conto dell'intera procedura di pretrattamento del campione e pertanto si distinguono da IDL e IQL. Tali limiti rientrano tra le caratteristiche di prestazione associate alla validazione di un metodo analitico, processo di definizione dei requisiti analitici e di conferma che il metodo in

esame sia in grado di soddisfare quanto richiesto per quella specifica applicazione (ISO 9000; ISO/IEC 17025), e spesso vengono valutate durante lo sviluppo del metodo stesso.

Analita	Equazione della retta	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)
BETA	$y = 864(25) x + 270(664) (R^2=0.9975)$	4	11
DEXA	$y = 1104(30) x + 1336(806) (R^2=0.9977)$	1	3
FLUO	$y = 74(3) x + 117(83) (R^2=0.9947)$	1	3
TRIAM	$y = 279(10) x + 91(272) (R^2=0.9960)$	3	9
TST	$y = 1697(59) x + 583(1575) (R^2=0.9963)$	0,3	0,8
E1	$y = 379(18) x + 76(479) (R^2=0.9932)$	3	8
E2	$y = 44(2) x + 23(66) (R^2=0.9904)$	5	14
EE2	$y = 42(2) x + 25(49) (R^2=0.9942)$	1	3
H-PROG	$y = 698(33) x + 950(867) (R^2=0.9934)$	1	2
M-PROG	$y = 995(46) x + 1404(1228) (R^2=0.9935)$	0,3	0,8
PROG	$y = 1907(136) x + 3535(3613) (R^2=0.9849)$	0,1	0,3

Tabella 6. Parametri di calibrazione lineare (equazione della retta e R^2) in EtOH nell'intervallo 2,5-50 ng/L per gli 11 ormoni steroidei selezionati; tra parentesi le incertezze associate alla pendenza e all'intercetta della curva di calibrazione media ottenuta mediante regressione lineare con metodo dei minimi quadrati (OLLSR). MDL e MQL per ciascun analita

Dalla tabella si può osservare una buona linearità in solvente ($R^2 > 0,9849$) e inoltre i valori di MDL e MQL riportati sottolineano l'effettiva possibilità di applicare il metodo per il monitoraggio degli ormoni steroidei su matrici reali a livello di traccia/ultratraccia.

Considerato il crescente interesse odierno nel realizzare un iter di preparazione del campione quanto più sostenibile possibile, in questo lavoro di tesi è stata anche testata la sostenibilità della procedura SPE messa a punto per la matrice acqua, in termini di reimpiego di cartucce già utilizzate. Nello specifico, la riutilizzabilità è stata studiata tramite cicli consecutivi di adsorbimento/desorbimento, utilizzando campioni di acqua di rubinetto (10 mL a pH nativo arricchiti a 1 mg/L di ciascuno degli 11 analiti). Con questi esperimenti è stato possibile appurare la stabilità nel tempo dell'efficienza del polimero come sorbente per più campioni, a favore, quindi, della sostenibilità del metodo. Il

materiale, nello specifico, ha mantenuto la capacità di estrazione per 5 riutilizzi e quindi 6 estrazioni totali, come mostrato in Figura 22. Oltre il quinto riutilizzo, infatti, si è osservato un peggioramento dei recuperi dei glucocorticoidi, per i quali, quindi, non ne potrebbe essere garantita un'estrazione efficiente. Il recupero medio ottenuto dai 5 cicli di riutilizzo per gli 11 analiti ordinati per famiglia di appartenenza è mostrato in Figura 23 ($RSD < 20\%$).

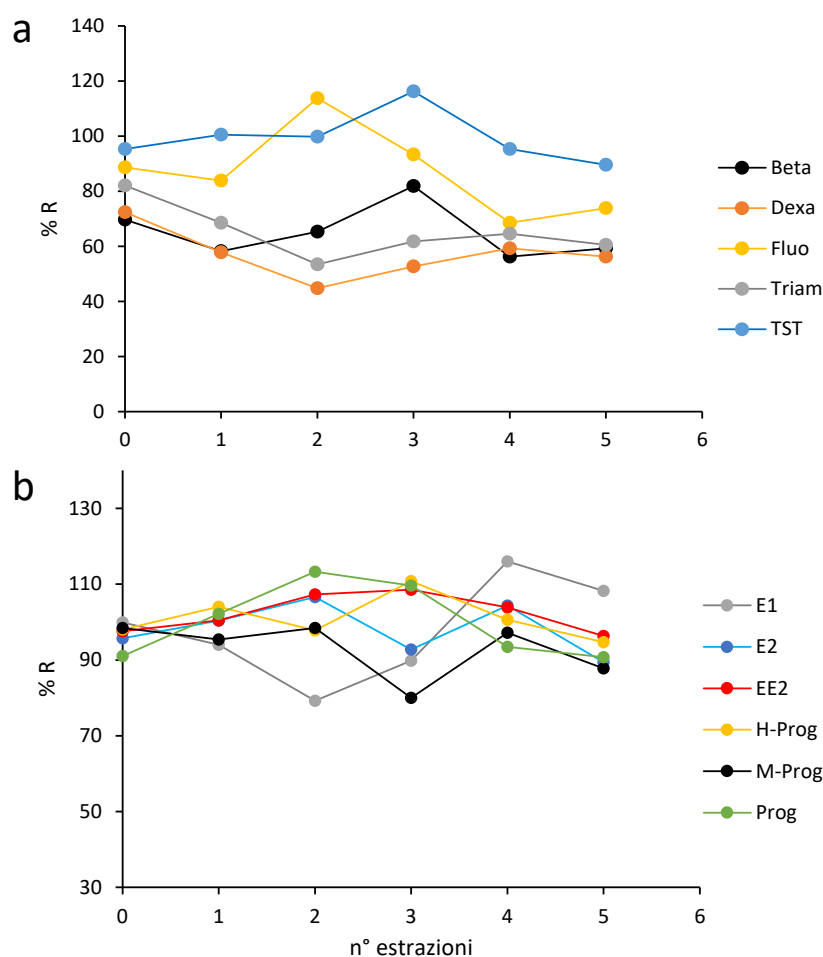


Figura 20. Recuperi percentuali degli 11 analiti relativi a 6 cicli di adsorbimento/desorbimento su una stessa cartuccia. a) glucocorticoidi e TST, b) estrogeni e progestinici

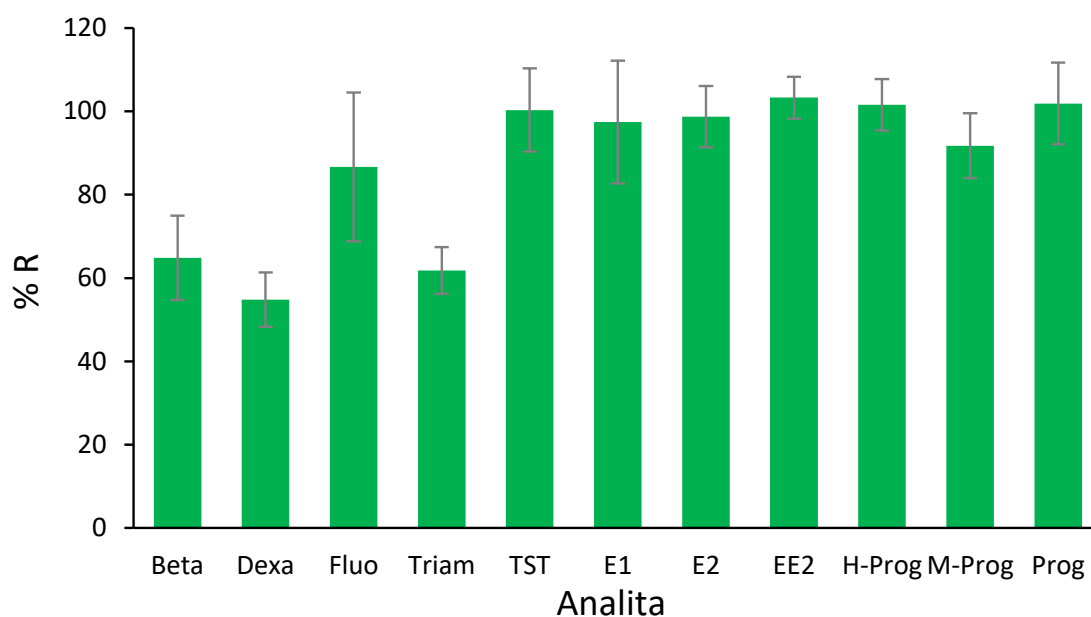


Figura 23. Recuperi medi percentuali degli 11 analiti ottenuti da 5 cicli di riutilizzo di una stessa cartuccia

La possibilità di usare la stessa cartuccia per 6 estrazioni consecutive è sicuramente importante in quanto la sostenibilità delle fasi solide polimeriche risiede proprio nella possibilità di un loro riutilizzo, come anche messo in luce nella valutazione della *greenness* riportata in sezione 4.4 (Ma X *et al*, 2023).

4.3 Sviluppo della procedura SPE in latte

Lo sviluppo della procedura SPE in latte ha previsto la valutazione di ulteriori parametri oltre quelli analizzati per le acque potabili. Nella composizione del latte vaccino, infatti, oltre l'acqua, che ne costituisce la componente principale (circa 87%), rientrano anche grassi (per la maggior parte saturi e in forma di trigliceridi), zuccheri (soprattutto lattosio), proteine e altri microcomponenti che lo rendono una matrice più complessa rispetto a quella già indagata e che possono interferire con la determinazione di composti target. Come riportato più in dettaglio al punto 1.3.1, l'estrazione di ormoni steroidei dal latte è, pertanto, generalmente preceduta da una fase di pretrattamento dei campioni (diluizioni, deproteinizzazione, rimozione dei grassi), il più delle volte laboriosa in termini di tempi, costi, ma anche d'impatto ambientale.

In linea con le tendenze attuali e rispetto a quanto noto dalla letteratura, in questo lavoro di tesi si è cercato di escludere lo step di pretrattamento del campione e di elaborare, al

contempo, una procedura SPE in latte quanto più semplificata e sostenibile per l'estrazione degli 11 ormoni steroidei selezionati. Infatti, se da un lato specifici pretrattamenti permettono di rimuovere suddette interferenze, dall'altro possono causare un abbassamento dell'efficienza di estrazione e, quindi, della sensibilità del metodo finale a causa dei limiti di quantificazione più alti. Questo è dovuto al fatto che tali trattamenti possono rimuovere anche altri composti presenti nel latte insieme agli interferenti.

In quest'ottica, durante questo studio si è allora pensato di introdurre una fase di lavaggio dopo il caricamento del campione per rimuovere eventuali costituenti della matrice debolmente legati al polimero. Ne segue, dunque, che la messa a punto del protocollo SPE in latte ha previsto nel complesso la valutazione di:

- Volume di campione;
- Eventuale diluizione del campione;
- Procedura di lavaggio.

In primo luogo si sono eseguiti test di recupero preliminari con quantificazione in HPLC-UV utilizzando come matrice un latte vaccino parzialmente scremato arricchito a 1 mg/L di ciascun analita al fine di valutare l'effetto di proteine (33 g/L) e grassi (16 g/L) sul processo di estrazione. Si sono quindi impaccate delle cartucce da 6 mL con un quantitativo di sorbente (PEG-polyHIPE) pari a 200 mg, scelto sulla base di quanto osservato precedentemente per l'acqua potabile (sezione 4.2). I volumi di campione testati in queste prove esplorative sono stati rispettivamente di 1 mL e 2 mL, tipici delle procedure SPE in latte (Yuan Y *et al*, 2019; Guedes-Alonso R *et al*, 2021). Dopo l'arricchimento con la miscela di analiti target, ciascun campione è stato sottoposto a 30 secondi di vortex a 2000 rpm e lasciato equilibrare a temperatura ambiente per 30 minuti, per avere una distribuzione omogenea degli analiti nella matrice. Dopo il caricamento in cartuccia, lo step di lavaggio è stato eseguito con 2 mL di una soluzione acquosa acida di ACN (2% FA, 5% ACN) sulla base di precedenti studi su SPE in matrici biologiche (Speltini A *et al*, 2021; Merlo F *et al*, 2022; Merlo F *et al*, 2023). In Figura 23 si riportano le percentuali di recupero medio relative ai composti target per i due volumi testati (BETA e DEXA co-eluiti). Dal grafico è possibile osservare una diminuzione significativa dei recuperi per i campioni da 2 mL (30-67%) rispetto a quelli più promettenti ottenuti per i campioni da 1 mL (47-113%), il che ha condotto alla selezione di quest'ultimo come volume di caricamento.

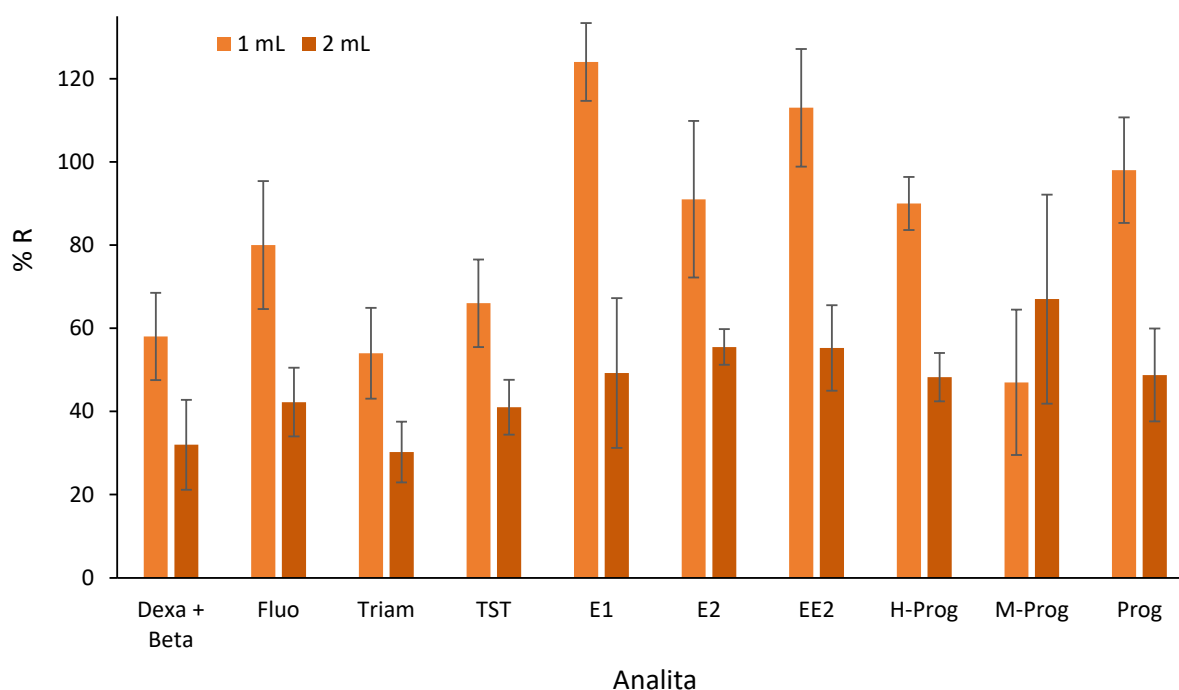


Figura 21. Recuperi medi percentuali ottenuti da campioni di latte vaccino parzialmente scremato (1 mL e 2 mL) arricchiti a 1 mg/L di ciascun ormone steroideo ($n=4$)

Per quanto riguarda il quantitativo di fase, 200 mg si sono dimostrati utili ai fini dell'estrazione degli analiti dal latte pur riducendo il volume di campione in quanto si tratta di una matrice più “sporca” rispetto all'acqua e, quindi, non sono state considerate quantità minori o maggiori.

Una volta stabiliti tali parametri, ci si è soffermati sulla messa a punto di un *clean-up* mirato a rimuovere l'interferenza delle proteine presenti naturalmente nella matrice. L'obiettivo, in particolare, è stato perseguito affiancando all'analisi dei recuperi, condotta nelle condizioni sopra menzionate, il saggio di Bradford.

Il saggio di Bradford è un metodo colorimetrico semplice, rapido e sensibile che figura tra i più diffusi per la quantificazione delle proteine. Il principio chimico alla base è il legame del colorante “*Coomassie Brilliant Blue*” ai gruppi amminici e carbossilici delle proteine che si manifesta come un cambiamento di colore della soluzione, misurabile spettrofotometricamente a una lunghezza d'onda di 595 nm (picco di assorbimento del colorante). In particolare, tanto più è l'intensificazione del colore blu della soluzione che ne risulta (tradotto in un aumento di assorbimento), tanto maggiore è la sua concentrazione proteica. La legge di Lambert-Beer, infatti, afferma che esiste una proporzionalità diretta

tra assorbanza e concentrazione, pertanto l'assorbanza misurata è proporzionale alla quantità di colorante legato e quindi alla quantità di proteine nella soluzione. Per garantire l'accuratezza del saggio, si costruisce una curva di calibrazione misurando l'assorbanza di soluzioni a concentrazione nota di una proteina di riferimento, ovvero BSA (*Bovine Serum Albumin*), dalla quale, per interpolazione, è possibile determinare la concentrazione proteica nei campioni sconosciuti a partire dal rispettivo segnale di assorbanza.

In questo lavoro di tesi, nello specifico, si sono preparate diverse curve di calibrazione ($n=3$) nell'intervallo 2,5-40 μg partendo da una soluzione di BSA a 50 mg/L. Dopo l'aggiunta di 1 mL del reagente di Bradford, le soluzioni sono state lasciate reagire per 5 minuti per poi essere trasferite nelle cuvette e sottoposte alla lettura UV-Vis. Misurandone, quindi, l'assorbanza in funzione delle rispettive concentrazioni di BSA, si è calcolata la curva di taratura media riportata in Figura 24. Questo metodo dà un responso sufficientemente accurato, seppur non lineare, per un ampio intervallo di concentrazione proteica.

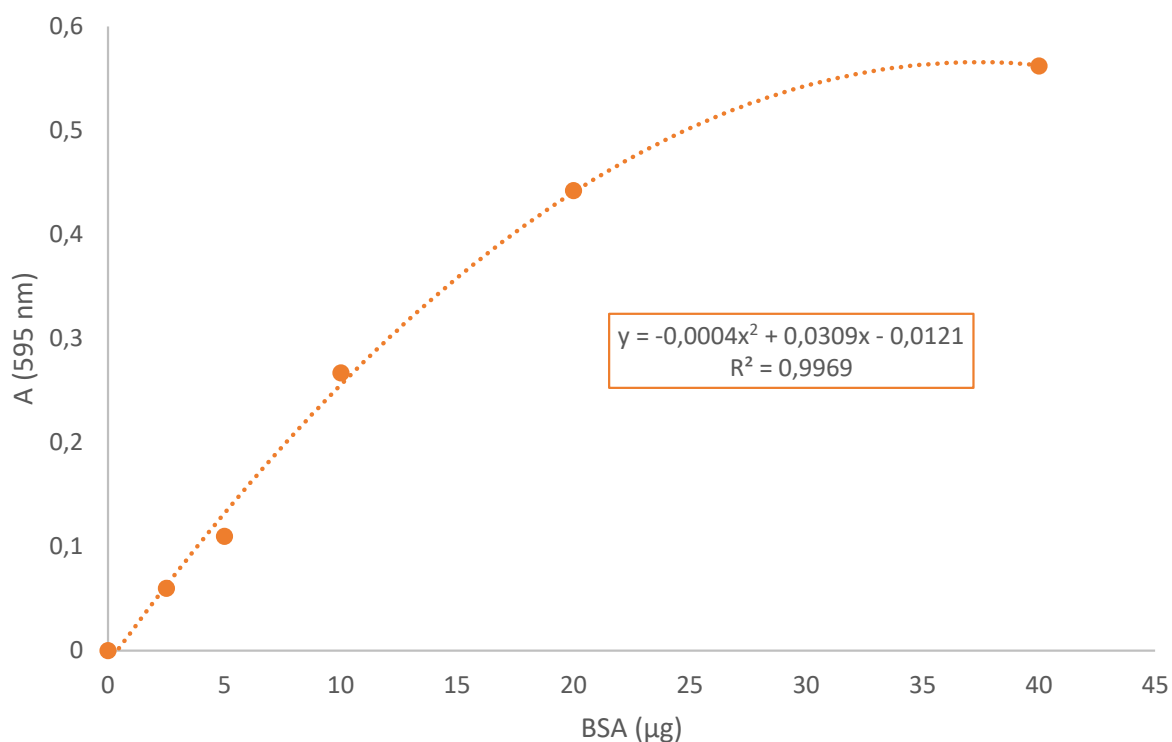


Figura 22. Curva e parametri di calibrazione ottenuti misurando l'assorbanza a 595 nm di soluzioni di BSA

In questo modo, nel valutare diversi parametri di *clean-up*, si sono potute quantificare, operando le opportune diluizioni, le proteine rimosse con i lavaggi e residue negli eluati, al fine di formulare una strategia di pulizia soddisfacente che, al contempo, non alterasse i recuperi degli analiti e quindi l'efficienza di estrazione. Per ottimizzare ulteriormente il lavoro, si è inoltre scelto di non iniettare direttamente gli eluati tal quali nel sistema HPLC-UV, ma di filtrarli tramite filtri in nylon da 0.45 μm in modo da operare una prima rimozione degli interferenti di più grandi dimensioni.

Si è quindi proceduto col valutare anzitutto l'effetto del **volume** della soluzione di lavaggio per cui si è inizialmente optato (soluzione acquosa 2% FA, 5% ACN), sui recuperi (Figura 25) e sul contenuto proteico (Tabella 7), testando volumi rispettivamente di 2 mL ($n=4$, RSD < 24%) e 5 mL ($n=2$).

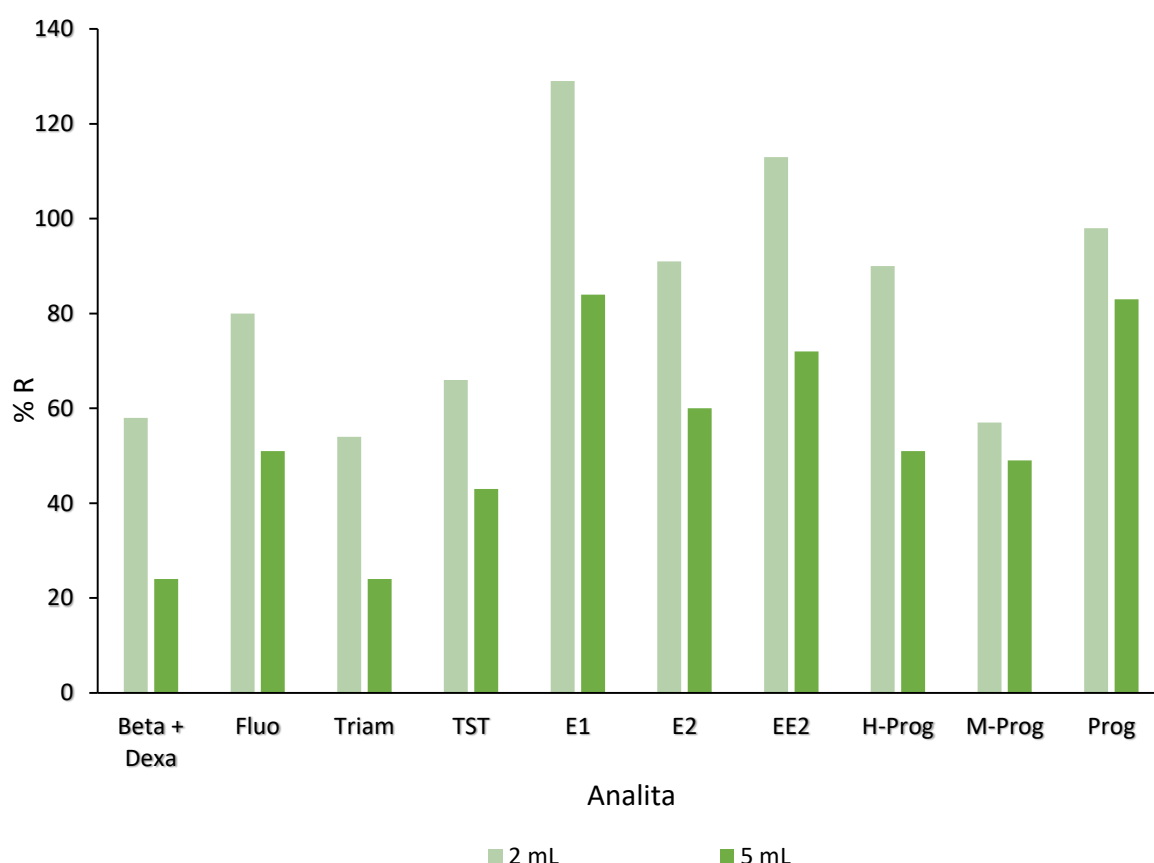


Figura 23. Recuperi percentuali degli 11 analiti ottenuti con i due volumi di lavaggio testati (2 mL e 5 mL)

Volume di lavaggio	Proteine rimosse con lavaggio	Proteine residue eluato
2 mL	3503 µg	358 µg
5 mL	4147 µg	339 µg

Tabella 7. Proteine rimosse con il lavaggio e residue negli eluati SPE in seguito a lavaggio con soluzione acquosa 2% FA, 5% ACN nei due volumi testati

Non essendoci una differenza significativa nel contenuto proteico residuo tra i due lavaggi e considerando che il lavaggio con 5 mL di soluzione porta a una perdita di analiti, con un abbassamento dei recuperi fino a circa il 40%, si è, quindi, scelto di lavorare con 2 mL di soluzione.

La composizione della soluzione di lavaggio è stata studiata anzitutto valutando l'effetto della **concentrazione dell'acido** (FA), sperimentando anche una composizione al 5% v/v. Non avendo apportato miglioramenti significativi nella rimozione delle proteine e trattandosi di un acido corrosivo, si è optato per l'utilizzo della sua % più bassa testata.

Si è poi valutato l'impiego di un **solvente organico** alternativo all'ACN (MeOH) in uguale percentuale (5% v/v) che non ha apportato miglioramenti nel *clean-up* rispetto a quanto ottenuto con ACN. Considerato anche che nei test di recupero precedenti non si è registrata perdita di analiti, l'ACN è stato confermato come solvente organico.

La composizione della soluzione di lavaggio è stata inoltre studiata testando altre **concentrazioni di solvente organico** (ACN), nello specifico 7,5% e 10% v/v. Seppure il saggio colorimetrico abbia evidenziato una rimozione più efficace della frazione di proteine adsorbite sulla fase solida, soprattutto utilizzando il 10% di ACN, non si osserva un miglioramento così netto del contenuto proteico residuo nell'eluato all'aumentare del contenuto organico (Tabella 8); inoltre l'aumento della % di ACN ha causato un peggioramento pressoché generale dei recuperi osservabile in Figura 26.

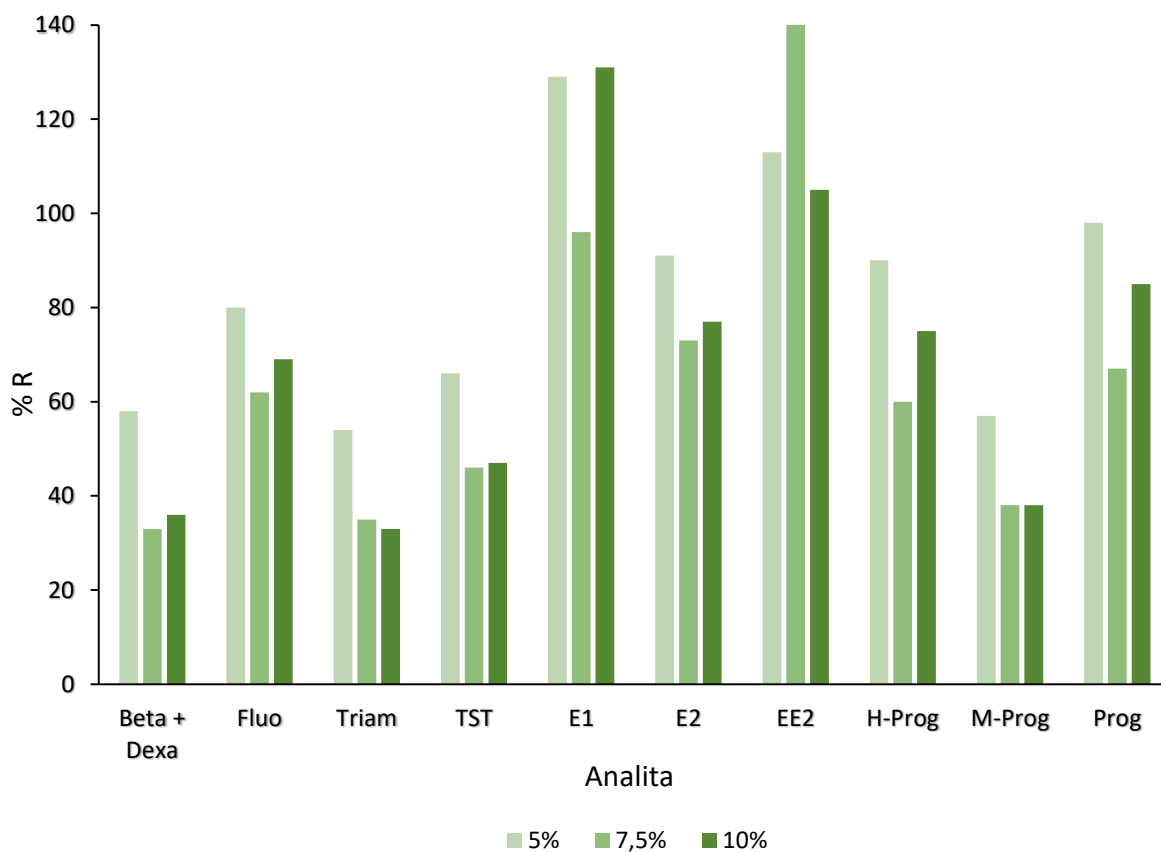


Figura 24. Recupero percentuale degli 11 analiti ottenuti con le tre percentuali di ACN testate (5%, 7,5% e 10% v/v) in 2 mL di soluzione di lavaggio

% ACN	Proteine rimosse con lavaggio	Proteine residue eluato
5%	3503 µg	358 µg
7,5%	3409 µg	360 µg
10%	7202 µg	311 µg

Tabella 8. Proteine rimosse con il lavaggio e residue negli eluati SPE in seguito a lavaggio con soluzioni acquose al 2% v/v di FA a diverse percentuali di ACN

In definitiva, le condizioni di lavaggio selezionate prevedono un volume di 2 mL di soluzione acquosa al 5% di ACN e al 2% di FA. Considerando la composizione della matrice di partenza, un contenuto proteico medio di circa 350 µg misurato negli eluati

SPE in seguito al lavaggio, è indice di un *clean-up* pressoché quantitativo (~ 99,5%), al quale, al contempo, si associa un'estrazione soddisfacente degli 11 analiti steroidei.

La positività di tali risultati ha poi portato a sperimentare la procedura su latte vaccino intero, in cui la componente grassa è doppia (32 g/L) rispetto al parzialmente scremato. Le proteine residue pressoché simili determinate negli eluati tramite saggio di Bradford (380 µg) hanno dimostrato ancora una volta il funzionamento del *clean-up* messo a punto. D'altra parte, però, non è stato possibile constatare lo stesso per quanto riguarda l'efficienza di estrazione dei composti target. Eseguendo, infatti, dei test di recupero su questa matrice nelle stesse condizioni operative si osserva un'influenza negativa del maggiore contenuto di grassi che apparentemente ostacola la ritenzione degli steroidi sul sorbente, come già verificato in precedenti studi in cui similmente non si è previsto uno step di rimozione dei lipidi in fase di preparazione del campione (Guedes-Alonso R *et al*, 2021). Nello specifico, dal grafico in Figura 27 si evince una diminuzione generale dei recuperi, fino al 30%.

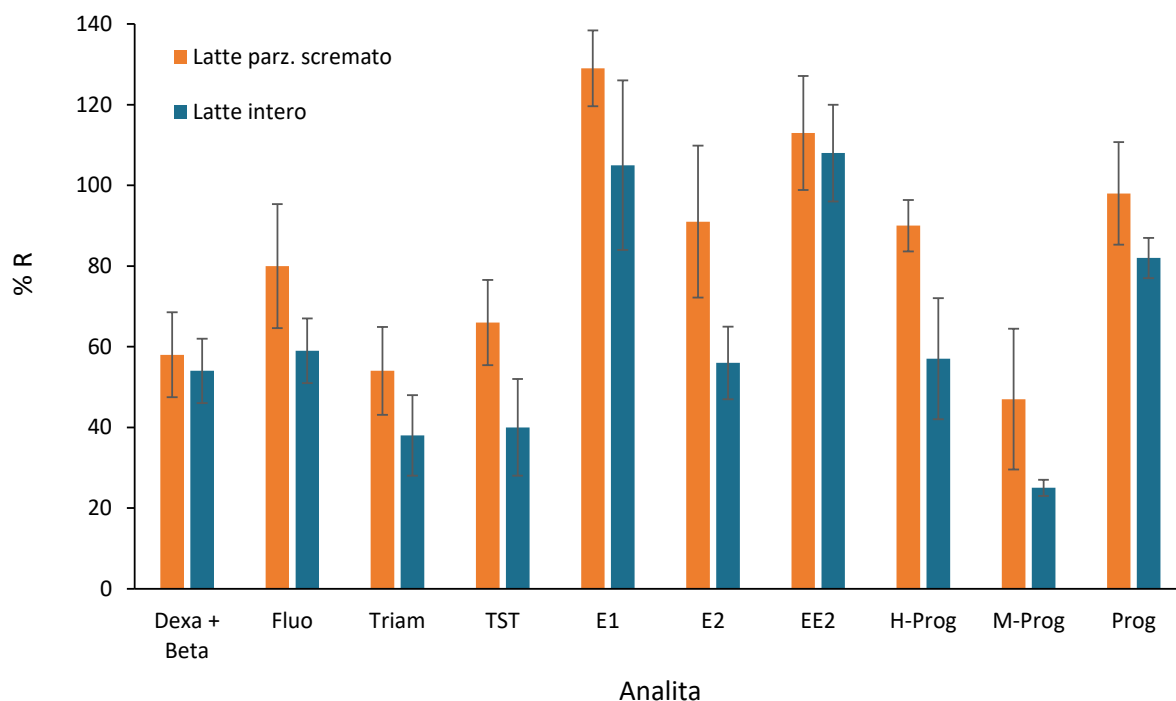


Figura 25. Recuperi medi percentuali ottenuti da campioni di 1 mL di latte vaccino parzialmente scremato/intero arricchiti a 1 mg/L di ciascun ormone steroideo (n=4)

Poiché, secondo quanto documentato finora, gli ormoni steroidei si possono ritrovare come contaminanti nel latte prevalentemente a livello di traccia, fino a concentrazioni di

circa 150 µg/L, si sono condotti ulteriori test di recupero su campioni di latte vaccino parzialmente scremato e intero arricchiti a una concentrazione più bassa di quella già sperimentata (Decheng F *et al*, 2021). Nel dettaglio si è testato, in triplicato ($n=3$), un livello di concentrazione pari a 80 µg/L, con successiva analisi strumentale in HPLC-MS/MS (modalità MRM). Le percentuali di recupero medio degli 11 analiti sono riportate in Figura 28.

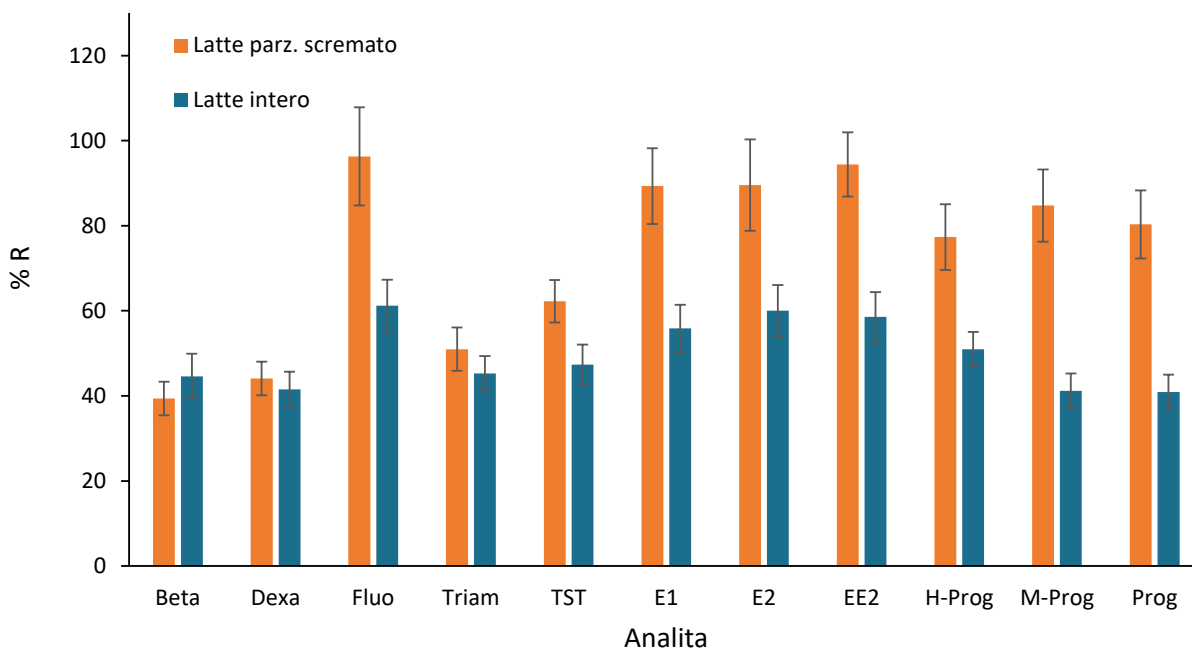


Figura 26. Recuperi medi percentuali ottenuti da campioni di 1 mL di latte vaccino parzialmente scremato/intero arricchiti a 80 µg/L di ciascun ormone steroideo ($n=3$, $RSD < 12\%$)

Dal grafico è possibile constatare che per il latte intero, come già osservato per concentrazioni più alte (Figura 27), l'efficienza di estrazione è minore, con recuperi compresi nell'intervallo 41-61%. In particolare, tale riduzione risulta più evidente per gli ormoni sessuali ($\text{LogP} > 3$), probabilmente perché essendo più lipofili interagiscono maggiormente con la componente grassa della matrice rispetto, ad esempio, a BETA e DEXA.

A questo proposito, si è dapprima provato a rimuovere i lipidi aggiungendo uno step di lavaggio con 2 mL di acetone che, tuttavia, ha portato a un crollo significativo dei recuperi di tutti gli analiti, fino al 60% ($n=2$). Rispetto ai trattamenti del campione più drastici noti dalla letteratura disponibile, come l'uso di n-esano puro o in combinazione con acetone, acetonitrile o acetato di piombo (punto 1.3.1), si è poi tentato di mitigare l'interferenza lipidica sull'estrazione semplicemente operando una diluizione contenuta del campione (1:1 v/v) che, così, arriva ad avere un contenuto teorico di grassi analogo al latte

parzialmente scremato. Il campione così preparato è stato usato in test di recupero, i cui risultati sono mostrati in Figura 29.

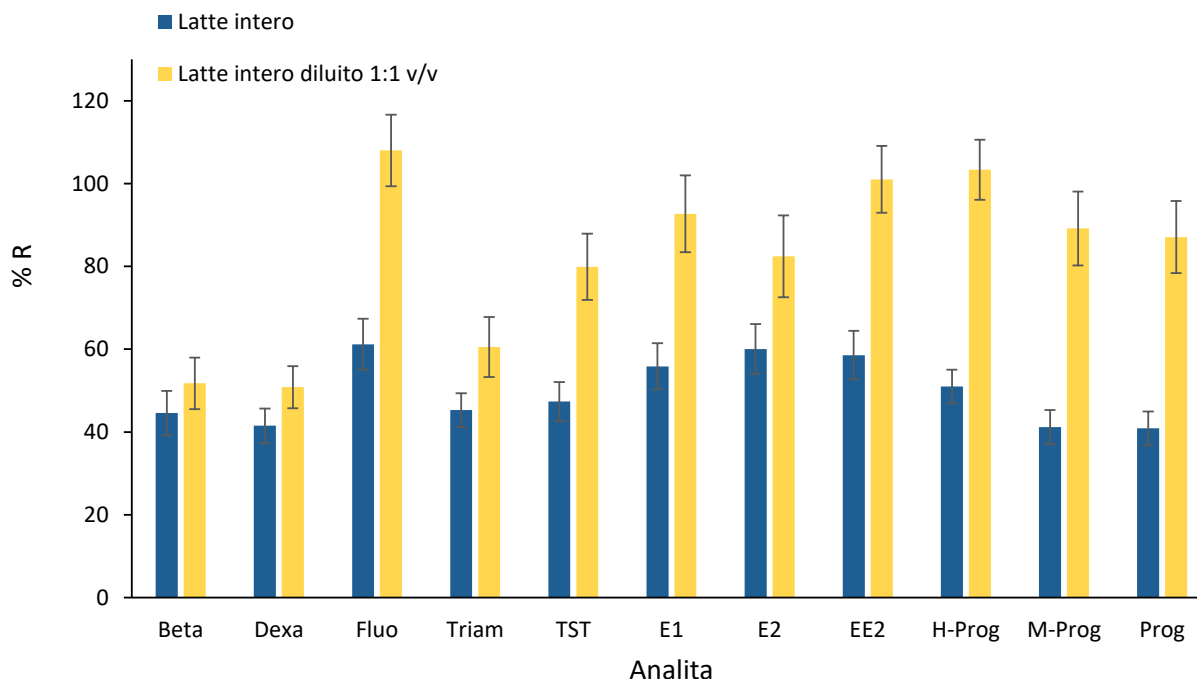


Figura 27. Recupero medi percentuali ottenuti da campioni di 1 mL di latte vaccino intero/intero diluito 1:1 v/v arricchiti a 80 µg/L di ciascun ormone steroideo ($n=3$, $RSD<10\%$)

Il significativo miglioramento dei recuperi (fino al 50%) che si evince dal grafico indica che è sufficiente la diluizione per ottenere dei risultati sovrapponibili a quelli del latte parzialmente scremato. Oltretutto, quanto ottenuto si accompagna al mantenimento dell'efficienza di rimozione proteica, verificato tramite saggio di Bradford e apprezzabile anche nei profili cromatografici mostrati in Figura 30 che si sovrappongono a quelli ottenuti per le soluzioni standard in EtOH (Figura 14).

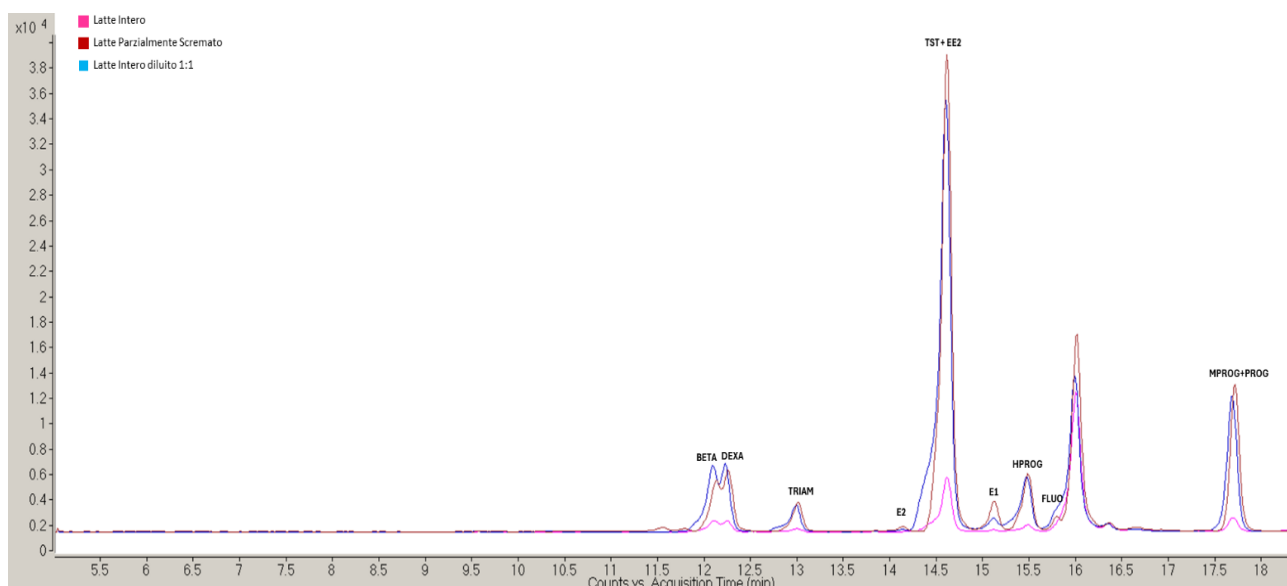


Figura 28. Cromatogrammi TIC relativi ad eluati di campione di latte vaccino parzialmente scremato/intero/intero diluito 1:1 v/v arricchiti a 80 µg/L del Mix 11

Questi risultati sono stati ulteriormente confermati da successivi esperimenti condotti su altre tipologie di latte. In particolare, si è testata la procedura in triplicato su latte vaccino parzialmente scremato senza lattosio e su un latte artificiale per neonati fino al 6° mese di vita. Le percentuali di recupero medio ($n=3$) degli 11 analiti ottenute su queste matrici sono riportate in Figura 31 insieme a quelle ottenute precedentemente con i tipi di latte già esplorati. Per quanto riguarda il latte delattosato, dal grafico si evince una sovrapposizione delle prestazioni con quelle del latte parzialmente scremato, con recuperi compresi nell'intervallo 40-82%, a riprova del fatto che, applicando la procedura messa a punto, il lattosio non esercita una particolare interferenza sull'efficienza di estrazione dei composti target, come invece riscontrato in altri studi (Guedes-Alonso R *et al*, 2021). Anche con il latte per lattanti si sono ottenuti dei recuperi in linea con gli altri campioni (40-90%), senza operare diluizioni nonostante il contenuto in grassi sovrapponibile a quello del latte intero; ciò si potrebbe spiegare tenendo conto che questo tipo di prodotto presenta un contenuto proteico nettamente inferiore rispetto agli altri latti testati e che, dunque, il *clean-up* sviluppato garantisce un'estrazione efficace senza ulteriori pretrattamenti prima della SPE.

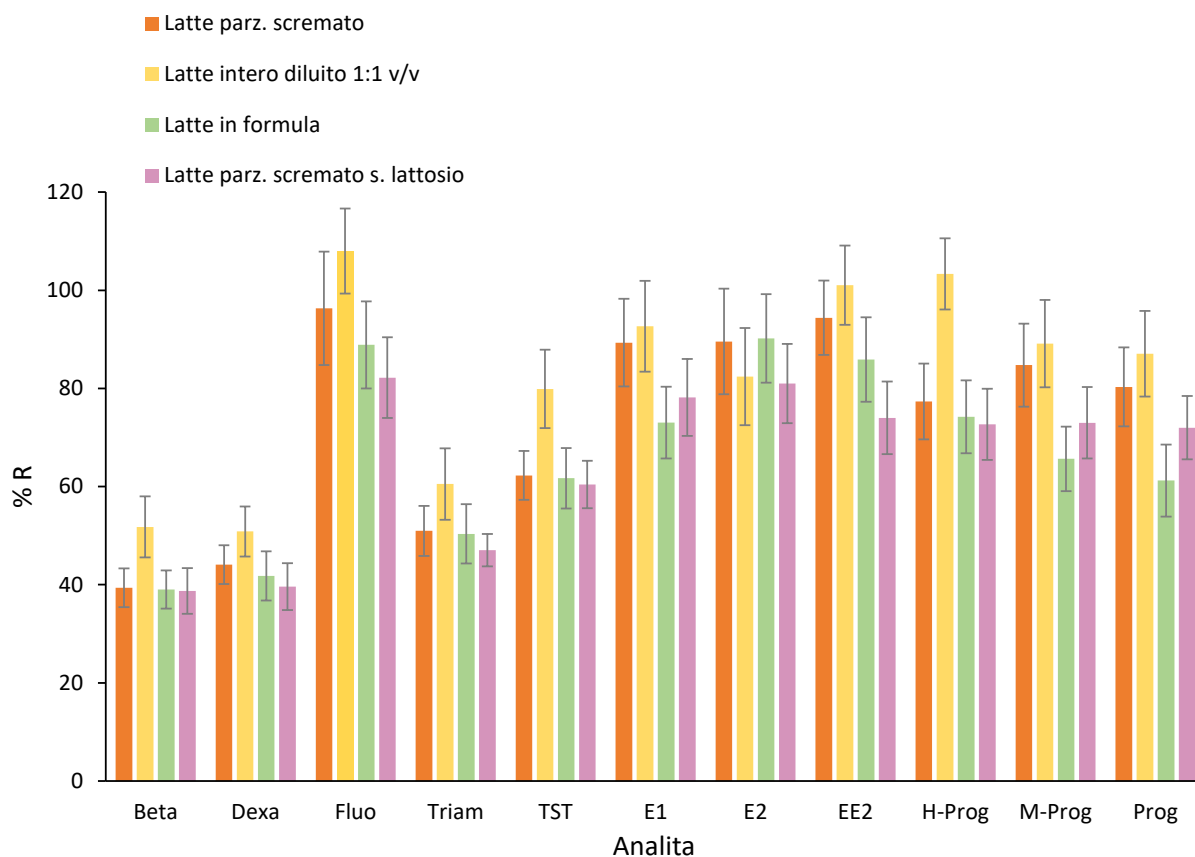


Figura 29. Recupero medi percentuali ottenuti da campioni di 1 mL delle diverse tipologie di latte testato arricchiti a 80 µg/L di ciascun ormone steroideo ($n=3$, $RSD<12\%$)

I cromatogrammi, riportati a scopo esemplificativo in Figura 32, per ciascun analita in modalità MRM dall'analisi dell'eluato SPE di un campione di latte in formula, dimostrano che la procedura sviluppata garantisce una successiva analisi strumentale cromatografica riproducibile in termini di tempi di ritenzione e di forma dei picchi

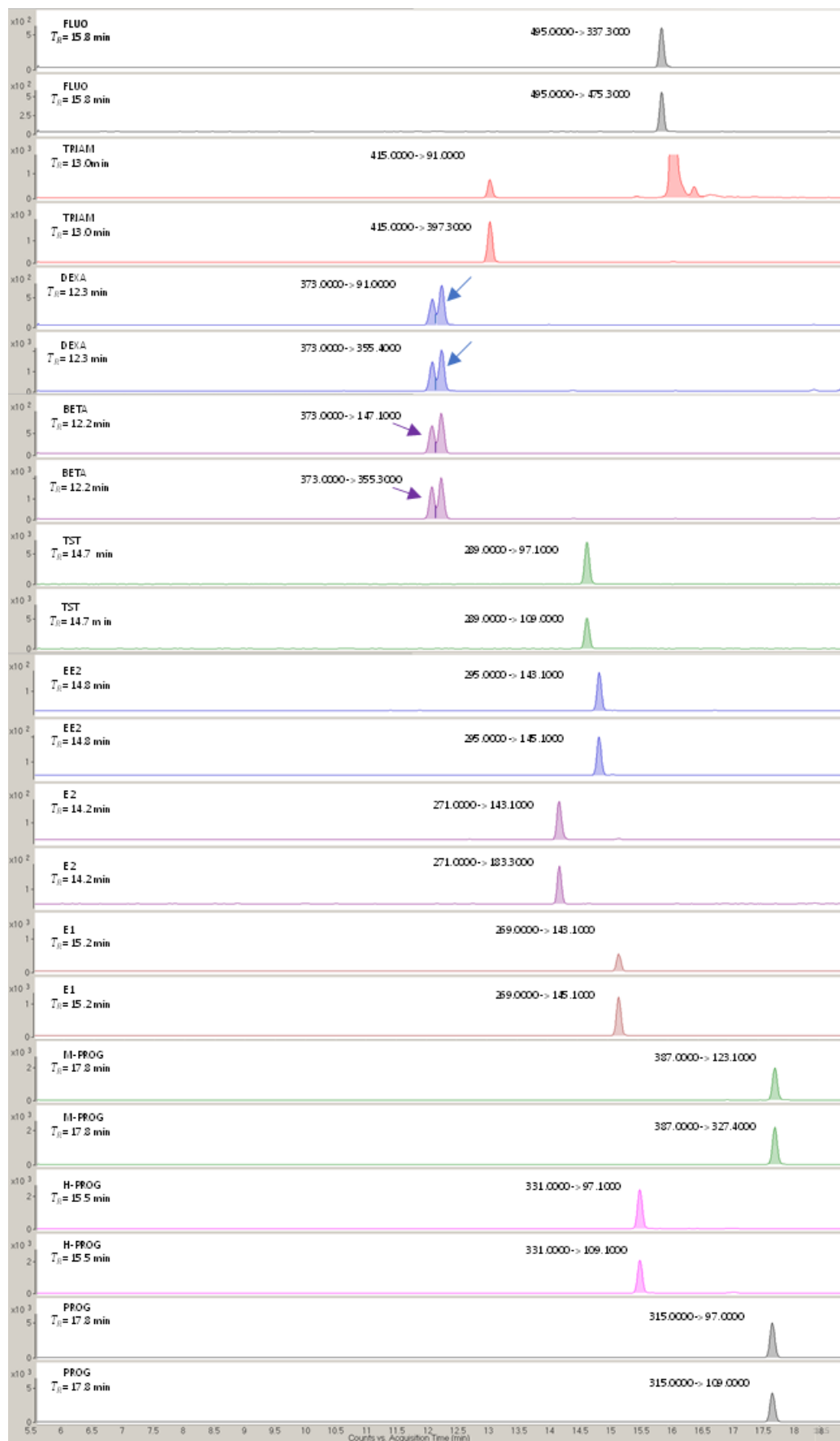


Figura 30. Cromatogrammi acquisiti in modalità MRM mediante analisi di un campione di latte in formula arricchito con MIX 11 (80 µg/L)

Tuttavia, rispetto a quanto visto per l'acqua, dal confronto tra la risposta degli analiti nella matrice originale (eluato SPE dalla pre-concentrazione di latte) e nello standard (EtOH) a parità di concentrazione si è osservata un'interferenza della matrice, nota come effetto matrice (EM). Ciò significa che alcune componenti del latte possono interferire in fase di quantificazione portando ad errori analitici anche consistenti, ovvero a sottostimare e sovrastimare la concentrazione nel caso di soppressione o innalzamento del segnale, rispettivamente. Di conseguenza, al fine di compensare tale interferenza e garantire l'accuratezza dei risultati, per la quantificazione in latte si è optato per la *matrix-matched calibration* (calibrazione abbinata alla matrice) anziché per la calibrazione esterna in solvente come per l'acqua. Questa, nello specifico, è stata effettuata preparando in doppio 5 soluzioni standard multiple nell'intervallo 5-50 µg/L in eluati ottenuti da campioni di latte vaccino parzialmente scremato processati secondo la procedura descritta in precedenza. Per ogni composto si è, quindi, ottenuta la curva di calibrazione media tramite regressione lineare con metodo dei minimi quadrati (OLLSR) delle aree medie in funzione delle diverse concentrazioni (Tabella 9).

Considerata, dunque, la complessità della matrice in esame, lo sviluppo del metodo in latte ha previsto l'analisi in dettaglio, oltre che delle caratteristiche di prestazione già viste per l'acqua, anche dell'effetto matrice, in modo da verificare l'eventuale necessità di apportare ulteriori modifiche alla procedura.

In questo lavoro di tesi per calcolare l'effetto matrice (in termini di EM %) si è operato per ciascun analita un confronto tra le pendenze (b) della retta costruita in matrice (eluato arricchito da SPE di latte, *matrix-matched calibration* Tabella 9), e di quella *matrix-free*, costruita in solvente (Tabella 6, sezione 4.2), secondo la seguente equazione:

$$EM \% = \left(\frac{b_m}{b_s} - 1 \right) \times 100$$

Formula 4. Calcolo EM%. b_m , pendenza della retta in matrice; b_s , pendenza della retta in EtOH

Si riportano, quindi, in Tabella 9 i parametri della calibrazione lineare, l'effetto matrice percentuale, MDL e MQL calcolati per ciascun analita secondo la Formula 3 (sezione 4.2), ma utilizzando la pendenza della *matrix-matched calibration* e EF=0,5.

Analita	Equazione della retta	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	EM %
BETA	$y = 563(32) x + 32(844) (R^2=0.9905)$	2	6	- 35
DEXA	$y = 735(60) x + 218(1587) (R^2=0.9804)$	0.4	1	- 33
FLUO	$y = 60(3) x - 19(72) (R^2=0.9939)$	1	3	- 19
TRIAM	$y = 155(9) x - 51(242) (R^2=0.9896)$	0.8	2.5	- 45
TST	$y = 1343(73) x + 190(1940) (R^2=0.9912)$	0.04	0.14	- 21
E1	$y = 505(29) x - 772(778) (R^2=0.9900)$	0.3	1	+ 33
E2	$y = 58(4) x - 47(101) (R^2=0.9873)$	2	6	+ 33
EE2	$y = 53(3) x - 44(72) (R^2=0.9924)$	0.4	1	+ 27
H-PROG	$y = 558(28) x + 219(739) (R^2=0.9925)$	0.2	0.5	- 20
M-PROG	$y = 699(26) x + 192(697) (R^2=0.9958)$	0.3	1	- 30
PROG	$y = 1441(71) x + 1149(1890) (R^2=0.9927)$	0.2	0.5	- 24

Tabella 9. Parametri di calibrazione lineare (equazione della retta e R^2), MDL, MQL e EM% in matrice nell'intervallo 5-50 ng/L per gli 11 ormoni steroidei selezionati

Dalla tabella si possono osservare effetti di innalzamento del segnale (+), per gli analiti che si ionizzano negativamente in sorgente (estrogeni), e di soppressione (-), per gli altri composti che, invece, hanno una ionizzazione in positivo, dovuti a componenti della matrice co-estratti; l'effetto matrice può di fatto far aumentare il valore misurato o farlo diminuire. Tali valori di EM% sono comunque limitati (< 45%) rispetto a quanto riportato in letteratura per il latte non grezzo, ovvero una soppressione del segnale fino a circa il 90% (Guedes-Alonso R *et al*, 2021). Inoltre, anche per questa matrice sussiste una buona linearità ($R^2 > 0,9804$) e valori di MDL e MQL validi per l'applicazione del metodo su matrici reali.

Complessivamente, con le diverse tipologie di latte testato si sono infatti ottenuti recuperi soddisfacenti e analoghi a quelli in acqua potabile (sezione 4.2), sia per gli steroidi sessuali (60-103%) che per i glucocorticoidi (40-108%), con RSD *inter-day* <12% e accompagnati da un efficiente *clean-up*. I risultati possono essere ricondotti alle proprietà superficiali del polimero a base di PEG che riduce le interazioni aspecifiche con la matrice, diversamente da una fase solida prettamente idrofobica; allo stesso tempo, grazie alla

sua natura anfifilica, il materiale è in grado di catturare i composti target dal campione sia attraverso interazioni apolari (con la struttura base del polimero) sia mediante interazioni dipolo-dipolo e a legame idrogeno con i gruppi ossigenati degli steroidi (Speltini A *et al*, 2021; De Soricellis G *et al*, 2023)

4.4 Valutazione della *greenness* dei metodi sviluppati

L'analisi diretta di un campione è spesso ostacolata da diversi fattori, tra cui la necessità di rendere il campione compatibile con lo strumento di analisi, di ripulirlo da eventuali interferenze e/o di arricchirlo dell'analita d'interesse. Una fase di preparazione del campione, pertanto, risulta in certi casi necessaria, come nel rilevamento di contaminazioni di ormoni steroidei in matrici complesse indagate in questo lavoro di tesi. Infatti, considerando le matrici in esame, per i campioni di acqua è necessario ottenere un fattore di arricchimento adeguato, ma per una matrice più complessa come il latte è fondamentale anche l'applicazione di procedure di pulizia. In questi casi il pretrattamento del campione mira a ottenere estratti limpidi aventi concentrazioni degli analiti quantificabili con i metodi standard per l'analisi multianalita degli steroidi, ovvero le tecniche cromatografiche, tra cui quella liquida adoperata nel presente studio (HPLC). Tuttavia, allo stesso tempo, la preparazione del campione costituisce in generale una fase critica a causa dei requisiti di consumo richiesti (quantità/numero di sostanze, risorse energetiche ecc...) e, quindi, della portata di rifiuti generati connessa. Non a caso, fino a qualche anno fa questa fase costituiva una delle principali fonti di inquinamento ambientale collegato ai processi analitici. In questo contesto si inserisce la crescente attenzione verso la ricerca di fasi adsorbenti alternative e più sostenibili per i processi di estrazione come la SPE; i polimeri porosi da emulsione ad alta fase interna (HIPE) come quelli studiati in questo lavoro meritano, pertanto, di essere presi in considerazione. A fronte dell'evidente problematica ambientale, nel 2022 sono stati elaborati dei criteri di *Green Sample Preparation (GSP)* per implementare quanto già sancito alla fine degli anni '90 dai principi della chimica analitica verde (*Green Analytical Chemistry, GAC*). Nello specifico si tratta di 10 principi (Figura 33) da adottare nei laboratori al fine di sviluppare procedure di preparazione dei campioni analitici quanto più rispettose dell'ambiente e della salute umana (López-Lorente AI *et al*, 2022; Merlo F *et al*, 2023).

-  1. Privilegiare la preparazione del campione *in situ*
-  2. Usare solventi e reagenti più sicuri
-  3. Puntare su materiali sostenibili, riutilizzabili e rinnovabili
-  4. Minimizzare gli sprechi
-  5. Minimizzare le quantità di campione, sostanze chimiche e materiali
-  6. Massimizzare la produttività del campione
-  7. Integrare le fasi e promuovere l'automazione
-  8. Minimizzare il consumo energetico
-  9. Scegliere la configurazione più ecologica possibile per l'analisi post preparazione del campione
-  10. Assicurare procedure sicure per gli operatori

Figura 31. I 10 criteri di preparazione del campione verde (GSP) (López-Lorente AI et al, 2022)

Con lo scopo di rendere tali obbiettivi perseguibili, negli ultimi anni sono stati proposti diversi strumenti metrici, anche avanzati, con cui valutare il grado di conformità dei metodi analitici ai suddetti criteri. In particolare, nel presente lavoro di tesi l'ecosostenibilità del trattamento del campione nel protocollo di estrazione elaborato è stata valutata tramite un software introdotto recentemente e denominato AGREEprep (*Analytical greenness metric for sample preparation*). Alla base di tale strumento vi è un ricalcolo dei 10 criteri GSP in punteggi su scala 0-1; in altre parole, il soddisfacimento di ciascun criterio viene valutato con un punteggio da 0 (non soddisfatto) a 1 (soddisfatto). L'*output* che se ne ricava è un pittogramma rotondo colorato costituito da un cerchio interno contenente un numero che, insieme al suo colore, rappresenta il punteggio complessivo assegnato alle prestazioni della preparazione del campione in esame in termini di impatto ambientale e sanitario, e da 10 sezioni a esso circostanti corrispondenti ai singoli parametri. Si tratta, dunque, di uno strumento di valutazione utile che permette di far luce sui punti deboli della procedura analizzata al fine di migliorarli (Wojnowski W et al, 2022).

In Figura 34 vengono riportati i pittogrammi ottenuti per i metodi sviluppati in questo lavoro di tesi, rispettivamente per l'acqua potabile e per il latte.

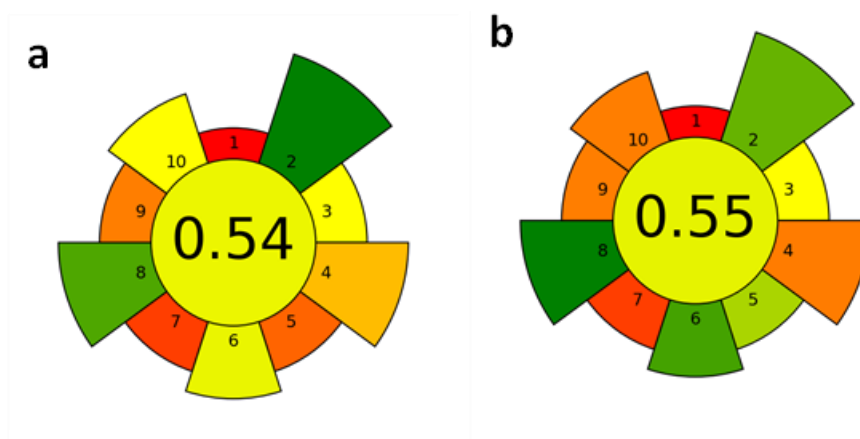


Figura 32. Output grafici della valutazione del grado di greenness tramite metrica AGREEprep per i metodi sviluppati in campioni di acqua (a) e latte (b)

Nell'insieme, i due grafici risultano piuttosto comparabili, sebbene differiscano in termini di dimensione del campione e complessità della matrice. Un punto di forza nel contesto della *greenness* è sicuramente rappresentato dai bassi consumi energetici dovuti alla simultaneità delle estrazioni che, nel contempo, contribuisce a migliorare la produttività del campione. Per quanto riguarda i materiali impiegati, solo l'acido formico utilizzato nel *clean-up* della matrice latte risulta tossico, ma il pericolo ad esso associato è mitigato dal piccolo volume che se ne utilizza nel preparare la miscela di lavaggio, oltre che dagli elementi di sicurezza appropriati presenti in laboratorio (Aguinaga Martínez MV *et al*, 2024). Per il resto, si utilizzano solventi/reagenti sicuri sia nelle procedure sviluppate sia nella sintesi del sorbente, eseguita in mezzi acquosi. Sebbene non si tratti di un biopolimero e provenga da una via sintetica a base di acrilati, il polimero PEG è a tutti gli effetti un biomateriale grazie alla sua comprovata biocompatibilità e atossicità, non a caso è stato originariamente pensato per la somministrazione di farmaci per via dermica/transdermica, ad esempio tramite applicazione diretta sulla pelle lesa (Corti M *et al*, 2019). La sostenibilità di questo materiale è ulteriormente incentivata dalla sua stabilità chimica e durata temporale che ne rendono possibile il riutilizzo su cicli consecutivi di adsorbimento/desorbimento.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di tesi è stato sviluppato un nuovo metodo analitico che prevede l'estrazione multiclasse e la successiva determinazione di 11 ormoni steroidei (4 glucocorticoidi, 1 androgeno, 3 estrogeni e 3 progestinici) in acque potabili e in diverse tipologie di latte attraverso l'utilizzo di un polimero poroso da emulsione ad alta fase interna (polyHIPE) come sorbente SPE.

Si tratta di una nuova frontiera di applicazione per questo tipo di materiale, ottenuto mediante polimerizzazione *in situ* e *one-step* e del quale ne è stata qui studiata l'affinità di adsorbimento verso gli steroidi. Si è quindi selezionato, tra quelli testati, un biomateriale bilanciato a doppia interazione idrofilica-lipofila a base di PEG del quale se ne è anche indagata la possibilità di *imprinting* molecolare, poi esclusa ai fini della messa a punto di una procedura SPE.

Il PEG-polyHIPE, utilizzato in formato di cartuccia, si è rivelato riutilizzabile su più campioni di acqua e ha garantito un isolamento soddisfacente degli analiti target, anche in campioni di latte con diverse composizioni, permettendo, a questo proposito, di evitare fasi di deproteinizzazione e sgrassatura, elevati fattori di diluizione, uso di sostanze chimiche nocive e semplificando al tempo stesso il protocollo analitico che precede la quantificazione strumentale. Grazie alle sue proprietà, il materiale ha di fatto dimostrato buone prestazioni di estrazione e *clean-up* di steroidi appartenenti a 4 famiglie in campioni di acqua e latte, con recuperi soddisfacenti rispettivamente compresi negli intervalli 60-125% e 40-110% per la maggior parte dei composti e con una buona riproducibilità *inter-day* e *inter-batch* (RSD<19%).

Questo protocollo di lavoro, che coinvolge materiali innovativi ancora ampiamente inesplorati, si è dimostrato vantaggioso e semplificato rispetto ai metodi esistenti, sostenibile dal punto di vista ecologico e operativamente funzionale per il monitoraggio di questi composti riconosciuti come inquinanti organici emergenti. Considerando il crescente impiego degli ormoni steroidei, soprattutto in medicina umana e veterinaria, e la conseguente circolazione nell'ambiente e nella catena alimentare, questo studio potrebbe dunque contribuire ad ampliarne la finestra di ricerca per i prossimi anni. Si tratta, infatti, di un campo di ricerca attuale, anche in vista delle sempre più diffuse preoccupazioni circa il loro ruolo da interferenti endocrini e la loro possibile correlazione in processi di cancerogenesi.

I risultati del presente lavoro sono oggetto di:

- presentazione al congresso 3rd European Sample Preparation Conference (EuSP2024) | 2nd Green and Sustainable Analytical Chemistry Conference (GSAC2024), Chania 15-18 Settembre 2024.

Comunicazione orale: “Preconcentration of Bioactive Compounds by New Sorbent Materials: Searching for Sustainability in Solid-Phase Extraction”

Autori: Speltini A., Merlo F., Bianchini P., De Soricellis G., Sammatrice E.S., Quarta V., Ferrari L., Calleri E., Milanese C., Profumo A.

- pubblicazione sottoposta a Microchemical Journal, Novembre 2024

Titolo: “A polyacrylate-based biomaterial for improved sample treatment: application towards multiclass extraction of steroid hormones in drinking water and different milk samples”

Autori: Merlo F., Sammatrice E.S., De Soricellis G., Rinaldi F., Calleri E., Profumo A., Speltini A:

Microchemical Journal

A polyacrylate-based biomaterial for improved sample treatment: application towards multiclass extraction of steroid hormones in drinking water and different milk samples
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	VSI: Sample Preparation (Research article)
Section/Category:	Chromatography and separation techniques
Keywords:	emerging contaminants; solid-phase extraction; sorbent; polymers; trace analysis; sample preparation
Corresponding Author:	Andrea Speltini University of Pavia Department of Chemistry ITALY
First Author:	Francesca Merlo
Order of Authors:	Francesca Merlo Elisa Sofia Sammatrice Giulia De Soricellis Francesca Rinaldi Enrica Calleri Antonella Profumo Andrea Speltini

Ringraziamenti

Questo articolo si basa sul lavoro del Sample Preparation Study Group and Network, supportato dalla Divisione di Chimica Analitica della Società Chimica Europea.

Si ringrazia il Dott. Alessandro Girella (Dipartimento di Chimica, Università di Pavia) per la caratterizzazione SEM e la Dott.ssa Gaia Zucca (Laboratorio di Biofarmaceutica e

Sviluppo Formulativo, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università di Pavia) per le misurazioni dell'angolo di contatto dei materiali utilizzati.

Si riconosce il sostegno del MUR e dell'Università di Pavia attraverso il programma “Dipartimenti di Eccellenza 2023-2027”.

BIBLIOGRAFIA

- *Abdurmumeen A. Hamid, Muritala Bale Issa, Nina Naquiah Ahmad Nizar, 13 - Hormones, Editor(s): Md. Eaqub Ali, Nina Naquiah Ahmad Nizar, In Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods, Woodhead Publishing, 2018, Pages 253-277.*
- *Adeel M, Song X, Wang Y, Francis D, Yang Y. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. Environ Int. 2017 Feb;99:107-119. doi: 10.1016/j.envint.2016.12.010. Epub 2016 Dec 29. PMID: 28040262.*
- *Aguinaga Martínez MV, Peralta FT, Domini CE, Acebal CC. Preparation of a sustainable magnetic sorbent for the extraction and preconcentration of progestogens in natural water samples. Talanta. 2024 Aug 15;276:126189. doi: 10.1016/j.talanta.2024.126189. Epub 2024 Apr 29. PMID: 38718645.*
- *Amitha Unnikrishnan, Nejuma K. Khalid, Manoj P. Rayaroth, Shiny Thomas, Akhil Nazim, Charuvila T. Aravindakumar, Usha K. Aravind, Occurrence and distribution of steroid hormones (estrogen) and other contaminants of emerging concern in a south indian water body, Chemosphere, Volume 351, 2024, 141124, ISSN 0045-6535, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141124>.*
- *Andaluri G, Suri RPS, Graham K. Steroid hormones in environmental matrices: extraction method comparison. Environ Monit Assess. 2017 Nov 9;189(12):626. doi: 10.1007/s10661-017-6345-0. PMID: 29124425.*
- *Attanasio R, Dorizzi R, Martinelli M, Terzolo M. Manuale per valutazione e inquadramento delle patologie surrenaliche e ipertensione arteriosa endocrina, Sezione I, 2008, Pagine 13-20.*
- *Azzouz A, Jurado-Sánchez B, Souhail B, Ballesteros E. Simultaneous determination of 20 pharmacologically active substances in cow's milk, goat's milk, and human breast milk by gas chromatography-mass spectrometry. J Agric*

- Food Chem.* 2011 May 11;59(9):5125-32. doi: 10.1021/jf200364w. Epub 2011 Apr 15. PMID: 21469656.
- Azzouz, A. et al. Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* **108**, 347–369 (2018).
 - Barreiros L, Queiroz JF, Magalhães LM, Silva AMT, Segundo MA. *Microchem. J.*, 126 (2016), pp. 243-262
 - Bianchini P, Merlo F, Maraschi F, Brescia R, Prato M, Profumo A, Speltini A. From Rice Husk Ash to Silica-Supported Carbon Nanomaterials: Characterization and Analytical Application for Pre-Concentration of Steroid Hormones from Environmental Waters. *Molecules*. 2023 Jan 11;28(2):745. doi: 10.3390/molecules28020745. PMID: 36677803; PMCID: PMC9866712.
 - Bianchini P, Merlo F, Quarta V, Ferrari L, Milanese C, Profumo A, Speltini A. Improving sample preparation by biochar-coated sampling tubes: proof-of-concept extraction of sex hormones from real waters, *Advances in Sample Preparation*, Volume 12, 2024, 100129, ISSN 2772-5820, <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2024.100129>.
 - Brusotti G, Calleri E, Milanese C, Catenacci L, Marrubini G, Sorrenti M, Girella A, Massolini G, Tripodo G. (2016). Rational design of functionalized polyacrylate-based high internal phase emulsion materials for analytical and biomedical uses. *Polymer Chemistry*, 7, 7436-7445. <https://doi.org/10.1039/C6PY01992G>.
 - Chang H, Wan Y, Wu S, Fan Z, Hu J. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res.* 2011 Jan;45(2):732-40. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.046. Epub 2010 Sep 17. PMID: 20850861.
 - Chiesa LM, Nobile M, Panseri S, Biolatti B, Cannizzo FT, Pavlovic R, Arioli F. A Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Detection of Antimicrobial Agents from Seven Classes in Calf Milk Replacers: Validation and Application. *J Agric Food Chem.* 2016 Mar 30;64(12):2635-40. doi: 10.1021/acs.jafc.6b00155. Epub 2016 Mar 18. PMID: 26971558.
 - Cole TJ, Short KL, Hooper SB. The science of steroids. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2019 Jun;24(3):170-175. doi: 10.1016/j.siny.2019.05.005. Epub 2019 May 23. PMID: 31147162.

- Colucci MS, Bork H, Topp E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 β estradiol and estrone. *J Environ Qual* 2001;30:2070-6.
- Constanti A, Bartke A, Khardori R. *Basic endocrinology for students of pharmacy and allied health sciences*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 1998
- Corti M, Calleri E, Perteghella S, Ferrara A, Tamma R, Milanese C, Mandracchia D, Brusotti G, Torre ML, Ribatti D, Auricchio F, Massolini G, Tripodo G. (2019). Polyacrylate/polyacrylate-PEG biomaterials obtained by high internal phase emulsions (HIPEs) with tailorable drug release and effective mechanical and biological properties. *Materials Science and Engineering C*, 105, Article 110060. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110060>
- Courant, F., Antignac, J. P., Maume, D., Monteau, F., Andre, F., & Le Bizec, B. (2007). Determination of naturally occurring oestrogens and androgens in retail samples of milk and eggs. *Food Additives & Contaminants*, 24(12), 1358–1366. <https://doi.org/10.1080/02652030701329637>
- Courant, F., Antignac, J. P., Maume, D., Monteau, F., Andre, F., & Le Bizec, B. (2007). Determination of naturally occurring oestrogens and androgens in retail samples of milk and eggs. *Food Additives & Contaminants*, 24(12), 1358–1366. <https://doi.org/10.1080/02652030701329637>
- Czarny K, Szczukocki D, Krawczyk B, Juszczak R, Skrzypek S, Gadzała-Kopciuch R. Molecularly imprinted polymer film grafted from porous silica for efficient enrichment of steroid hormones in water samples. *J Sep Sci*. 2019 Sep;42(17):2858-2866. doi: 10.1002/jssc.201900281. Epub 2019 Jul 4. PMID: 31243868.
- De Soricellis G, Rinaldi F, Tengattini S, Temporini C, Massolini G, Mandracchia D, Milanese C, Casero F, Calleri E. Synthesis of Hydrophilic Polymeric Supports with Poly-HIPE Structures Based on Acrylates for Pharmaceutical Applications. *ACS Applied Polymer Materials* 2023 5 (3), 2113-2123. DOI: 10.1021/acsapm.2c02115
- Decheng S, Xia F, Zhiming X, Shulin W, Shi W, Peilong W. Trace analysis of progesterone and 21 progestins in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled with high-field quadrupole-orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Food Chem*. 2021 Nov 1;361:130115. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.130115. Epub 2021 May 15. PMID: 34049049.

- D'Orazio G, Asensio-Ramos M, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ, Fanali S. Evaluation of the combination of a dispersive liquid-liquid microextraction method with micellar electrokinetic chromatography coupled to mass spectrometry for the determination of estrogenic compounds in milk and yogurt. *Electrophoresis*. 2015 Feb;36(4):615-25. doi: 10.1002/elps.201400452. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25394185.
- Du F, Sun L, Zhen X, Nie H, Zheng Y, Ruan G, Li J. High-internal-phase-emulsion polymeric monolith coupled with liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for enrichment and sensitive detection of trace cytokinins in plant samples. *Anal Bioanal Chem*. 2015 Aug;407(20):6071-9. doi: 10.1007/s00216-015-8782-3. Epub 2015 May 30. PMID: 26025552.
- Dušková M, Kolátorová L, Šimková M, Šrámková M, Malíková M, Horáčková L, Vítků J, Stárka L. Steroid diagnostics of 21st century in the light of their new roles and analytical tools. *Physiol Res*. 2020 Sep 30;69(Suppl 2):S193-S203. doi: 10.33549/physiolres.934517. PMID: 33094618; PMCID: PMC8603733.
- Fent K. Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment. *Environ Int*. 2015 Nov;84:115-30. doi: 10.1016/j.envint.2015.06.012. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26276056.
- Frank Z, Stanczyk, Bhagu R, Bhavnani, Use of medroxyprogesterone acetate for hormone therapy in postmenopausal women: Is it safe?. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 142,2014,Pages 30-38, ISSN 0960-0760, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.011>.
- Gañán J, Morante-Zarcero S, Gallego-Picó A, Garcinuño RM, Fernández-Hernando P, Sierra I. Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion. *Talanta*. 2014 Aug;126:157-62. doi: 10.1016/j.talanta.2014.03.041. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24881547.
- Gao P, Li C, Gong Q, Liu L, Qin R, Liu J. Sex steroid hormone residues in milk and their potential risks for breast and prostate cancer. *Front Nutr*. 2024 Sep 2;11:1390379. doi: 10.3389/fnut.2024.1390379. PMID: 39285863; PMCID: PMC11403374.
- Goeury K, Vo Duy S, Munoz G, Prévost M, Sauvé S. Assessment of automated off-line solid-phase extraction LC-MS/MS to monitor EPA priority endocrine disruptors in tap water, surface water, and wastewater. *Talanta*. 2022 May

- 1;241:123216. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123216. Epub 2022 Jan 10. PMID: 35042051.
- Gore AC et al, (2014). *Introduction to Endocrine Disrupting Chemicals (EDCs)- A Guide for Public Interest Organizations and Policy-makers*
 - Goulding NJ, Flower RJ. *Glucocorticoids. (Edition F, ed.). Springer Basel AG; 2001.*
 - Goyon A, Cai JZ, Kraehenbuehl K, Hartmann C, Shao B, Mottier P. *Determination of steroid hormones in bovine milk by LC-MS/MS and their levels in Swiss Holstein cow milk. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess. 2016 May;33(5):804-16. doi: 10.1080/19440049.2016.1175186. Epub 2016 May 4. PMID: 27055356.*
 - Guedes-Alonso R, Sosa-Ferrera Z, Santana-Rodríguez JJ, Kabir A, Furton KG. *Fabric Phase Sorptive Extraction of Selected Steroid Hormone Residues in Commercial Raw Milk Followed by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Foods. 2021 Feb 5;10(2):343. doi: 10.3390/foods10020343. PMID: 33562860; PMCID: PMC7915805.*
 - Guo C, Wu C, Zhang Z, Tan S, Chen S, Chen G. *Simultaneous determination of 58 glucocorticoid residues in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr A. 2024 Mar 29;1719:464734. doi: 10.1016/j.chroma.2024.464734. Epub 2024 Feb 10. PMID: 38368836.*
 - Haimov-Kochman R, Shore LS, Laufer N. *The milk we drink, food for thought. Fertil Steril. 2016 Nov;106(6):1310-1311. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.031. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27692435.*
 - Háková M, Raabová H, Havlíková LC, Chocholouš P, Chvojka J, Šatínský D. *Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent. Talanta. 2018 May 1;181:326-332. doi: 10.1016/j.talanta.2018.01.043. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29426520.*
 - Handelsman, D.J. (2017). *Use, Misuse, and Abuse of Androgens. In: Simoni, M., Huhtaniemi, I. (eds) Endocrinology of the Testis and Male Reproduction. Endocrinology. Springer, Cham.*
 - Hernández-Mesa M, García-Campaña AM, Cruces-Blanco C. *Novel solid phase extraction method for the analysis of 5-nitroimidazoles and metabolites in milk*

- samples by capillary electrophoresis. Food Chem. 2014 Feb 15;145:161-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.08.002. Epub 2013 Aug 11. PMID: 24128462.*
- *Hiller-Sturmhöfel S, Bartke A. The endocrine system: an overview. Alcohol Health Res World. 1998;22(3):153-64. PMID: 15706790; PMCID: PMC6761896.*
 - *Iparraguirre A, Prieto A, Navarro P, Olivares M, Fernández LÁ, Zuloaga O. Optimisation of stir bar sorptive extraction and in-tube derivatisation-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of several endocrine disruptor compounds in environmental water samples. Anal Bioanal Chem. 2011 Jul;401(1):339-52. doi: 10.1007/s00216-011-5074-4. Epub 2011 May 20. PMID: 21598080*
 - *Istituto Superiore di Sanità. Endocrine disruptors in Italian water for human consumption: methods adopted in a preliminary study of different water suppliers. Edited by Laura Achene, Sara Bogialli, Luca Lucentini, Paola Pettine and Massimo Ottaviani. 2011, iii, 84 p. Rapporti ISTISAN 11/18*
 - *Jiang T, Zhao L, Chu B, Feng Q, Yan W, Lin JM. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of 17beta-estradiol in fishery samples with high performance liquid chromatography. Talanta. 2009 Apr 30;78(2):442-7. doi: 10.1016/j.talanta.2008.11.047. Epub 2008 Dec 9. PMID: 19203606.*
 - *Johnstone C, Hendry C, Farley A, McLafferty E. Endocrine system: part 1. Nurs Stand. 2014 May 27;28(38):42-9. doi: 10.7748/ns.28.38.42.e7471. PMID: 24844520.*
 - *Kim MK, Zoh KD. Occurrence and removals of micropollutants in water environment. Environ Eng Res.2016;21(4):319–332. <https://doi.org/10.4491/eer.2016.115>*
 - *Kong DM, Tang Z, Liu ZH, Dang Z, Guo PR, Song YM, Liu Y. Simultaneous determination of twelve natural estrogens in dairy milk using liquid-liquid extraction and solid-phase extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. Environ Sci Pollut Res Int. 2023 Nov;30(52):112908-112921. doi: 10.1007/s11356-023-30330-0. Epub 2023 Oct 16. PMID: 37843706.*
 - *Kumar V, Johnson AC, Trubiroha A, Tumová J, Ihara M, Grabic R, Kloas W, Tanaka H, Kroupová HK. The challenge presented by progestins in*

- ecotoxicological research: a critical review. Environ Sci Technol. 2015 Mar 3;49(5):2625-38. doi: 10.1021/es5051343. Epub 2015 Feb 10. PMID: 25611781.*
- *Kuster M, Lopez de Alda MJ, Rodriguez-Mozaz S, Barcelò D. Analysis of steroid estrogens in the environment. In: Petrovic M, Barceló D (Ed.). Comprehensive analytical chemistry. analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. Berlin: Elsevier; 2007. p. 219-64.*
 - *Leet JK, Gall HE, Sepúlveda MS. A review of studies on androgen and estrogen exposure in fish early life stages: effects on gene and hormonal control of sexual differentiation. J Appl Toxicol. 2011 Jul;31(5):379-98. doi: 10.1002/jat.1682. Epub 2011 May 10. PMID: 21557264.*
 - *Liu K, Kang K, Li N, An J, Lian K, Kang W. Simultaneous Determination of Five Hormones in Milk by Automated Online Solid-Phase Extraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. J AOAC Int. 2020 Jan 1;103(1):265-271. doi: 10.5740/jaoacint.19-0065. PMID: 31315693.*
 - *Liu ZH, Kanjo Y, Mizutani S. Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: a review. Sci Total Environ. 2009 Sep 1;407(18):4975-85. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.06.001. Epub 2009 Jun 26. PMID: 19559467.*
 - *López-Lorente AI, Pena-Pereira F, Pedersen-Bjergaard S, Zuin VG, Ozkan SA, Psillakis E. The ten principles of green sample preparation. TrAC Trends in Analytical Chemistry, Volume 148, 2022, 116530, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116530>.*
 - *Luo J, Huang Z, Liu L, Wang H, Ruan G, Zhao C, Du F. Recent advances in separation applications of polymerized high internal phase emulsions. J Sep Sci. 2021 Jan;44(1):169-187. doi: 10.1002/jssc.202000612. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32845083.*
 - *Ma L, Yates SR, Ashworth D. Parent and conjugated estrogens and progestagens in surface water of the Santa Ana River: Determination, occurrence, and risk assessment. Environ Toxicol Chem. 2016 Nov;35(11):2657-2664. doi: 10.1002/etc.3447. Epub 2016 Jun 28. PMID: 27061433.*
 - *Ma X, Wang L, He Q, Sun Q, Yin D, Zhang Y. A review on recent developments and applications of green sorbents-based solid phase extraction techniques, Advances in Sample Preparation, Volume 6, 2023, 100065, ISSN 2772-5820, <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2023.100065>.*

- Mainwaring WI. Steroid hormone receptors: a survey. *Vitam Horm.* 1975;33:223-45. doi: 10.1016/s0083-6729(08)60958-9. PMID: 180674.
- Malekinejad H, Rezabakhsh A. Hormones in Dairy Foods and Their Impact on Public Health - A Narrative Review Article. *Iran J Public Health.* 2015;44(6):742-58
- Maruyama K, Oshima T, Ohya K. Exposure to exogenous estrogen through intake of commercial milk produced from pregnant cows. *Pediatr Int.* 2010 Feb;52(1):33-8. doi: 10.1111/j.1442-200X.2009.02890.x. Epub 2009 May 22. PMID: 19496976.
- Merlo F, Anticò E, Merli R, Cabrera-Codony A, Fontàs C, Speltini A, Profumo A. Biochar-based polymeric film as sustainable and efficient sorptive phase for preconcentration of steroid hormones in environmental waters and wastewaters. *Anal Chim Acta.* 2024 Jun 15;1308:342658. doi: 10.1016/j.aca.2024.342658. Epub 2024 Apr 28. PMID: 38740458.
- Merlo F, Bianchini P, Maraschi F, Speltini A, Profumo A. Pipette-tip μ SPE coupled with HPLC-MS/MS for trace determination of fluoroquinolones in human urine. *Talanta Open*, Volume 8, 2023, 100271, ISSN 2666-8319, <https://doi.org/10.1016/j.talo.2023.100271>.
- Merlo F, Montagna J, Maraschi F, Profumo A, Baldanti F, Speltini A. (2022). A versatile method for multiclass determination of β -lactam drugs in urine by solid-phase extraction followed by HILIC-UV. *Journal of Chromatography Open*.
- Merlo F, Profumo A, Speltini A. Sample treatment for the determination of steroid hormone contaminants in water samples: Analytical greenness assessment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 169, 2023, 117393, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.117393>.
- Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev.* 2011 Feb;32(1):81-151. doi: 10.1210/er.2010-0013. Epub 2010 Nov 4. Erratum in: *Endocr Rev.* 2011 Aug;32(4):579. PMID: 21051590; PMCID: PMC3365799.
- Moret S, Conte LS. "Estrazione in fase solida (SPE)." In *Il campione per l'analisi chimica*, 127–76. Milano: Springer Milan, 2014. http://dx.doi.org/10.1007/978-88-470-5738-8_6.
- Norman AW, Henry HL. *Hormones*. third edit.; 2013.

- Odinga ES, Zhou X, Mbaio EO, Ali Q, Waigi MG, Shiraku ML, Ling W. Distribution, ecological fate, and risks of steroid estrogens in environmental matrices. *Chemosphere*. 2022 Dec;308(Pt 2):136370. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.136370. Epub 2022 Sep 13. PMID: 36113656.
- Plotka-Wasyłka J, Jatkowska N, Guardia M, Namieśnik, J. (2016). Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, 77, 23-43. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>
- Rocha MJ, Rocha E. Synthetic Progestins in Waste and Surface Waters: Concentrations, Impacts and Ecological Risk. *Toxics*. 2022 Mar 29;10(4):163. doi: 10.3390/toxics10040163. PMID: 35448424; PMCID: PMC9026682.
- Scott W.N. (2010) *Anatomy & Physiology Made Incredibly Easy*. Lippincott Williams & Wilkins, London.
- Selahle, S.K., Nqombolo, A. & Nomngongo, P.N. From polyethylene waste bottles to UIO-66 (Zr) for preconcentration of steroid hormones from river water. *Sci Rep* 13, 6808 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-34031-z>
- Shen X, Chang H, Sun Y, Wan Y. Determination and occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in surface waters. *Environ Int*. 2020 Jan;134:105278. doi: 10.1016/j.envint.2019.105278. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31711021.
- Silverstein MS. PolyHIPEs: Recent advances in emulsion-templated porous polymers. *Prog. Polym. Sci*. 2014, 39, 199–234
- Socas-Rodríguez B, Lanková D, Urbancová K, Krtková V, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ, Pulkrabová J, Hajšlová J. Multiclass analytical method for the determination of natural/synthetic steroid hormones, phytoestrogens, and mycoestrogens in milk and yogurt. *Anal Bioanal Chem*. 2017 Jul;409(18):4467-4477. doi: 10.1007/s00216-017-0391-x. Epub 2017 Jun 6. PMID: 28585083.
- Speltini A, Merlo F, Maraschi F, Villani L, Profumo A. HA-C@silica sorbent for simultaneous extraction and clean-up of steroids in human plasma followed by HPLC-MS/MS multiclass determination. *Talanta*. 2021 Jan 1;221:121496. doi: 10.1016/j.talanta.2020.121496. Epub 2020 Aug 6. PMID: 33076100.
- Speltini A, Tripodo G, Rinaldi F, Massolini G, Profumo A, Calleri E. Carbon nanotubes-modified poly-high internal phase emulsions for pharmaceuticals pre-concentration and determination. *J Pharm Biomed Anal*. 2022 Jan 5;207:114391. doi: 10.1016/j.jpba.2021.114391. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34624819.

- Springer V, Jacksén J, Ek P, Lista AG, Emmer A. Determination of fluoroquinolones in bovine milk samples using a pipette-tip SPE step based on multiwalled carbon nanotubes prior to CE separation. *J Sep Sci*. 2014 Jan;37(1-2):158-64. doi: 10.1002/jssc.201300980. Epub 2013 Dec 12. PMID: 24227292.
- Suzuki Y, Kubota A, Furukawa T, Sugamoto K, Asano Y, Takahashi H, Sekito T, Dote Y, Sugimoto Y. Residual of 17 β -estradiol in digestion liquid generated from a biogas plant using livestock waste. *J Hazard Mat* 2009; 165:677–82
- Ufer, Joachim and Rainer, E.. *Ormonoterapia in ginecologia: Basi teoriche e applicazioni pratiche*, Berlin, Boston: De Gruyter, 1977.
- Walter L. Miller, Richard J. Auchus, *The Molecular Biology, Biochemistry, and Physiology of Human Steroidogenesis and Its Disorders*, *Endocrine Reviews*, Volume 32, Issue 1, 1 February 2011, Pages 81–151,
- 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
- Wang J, Leung D, Chow W, Chang J, Wong JW. Development and Validation of a Multiclass Method for Analysis of Veterinary Drug Residues in Milk Using Ultrahigh Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2015 Oct 21;63(41):9175-87. doi: 10.1021/acs.jafc.5b04096. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26416602.
- Wangmo C , Jarque S , Hilscherová K , Bláha L , Bittner M . In vitro assessment of sex steroids and related compounds in water and sediments - a critical review. *Environ Sci Process Impacts*. 2018 Feb 21;20(2):270-287. doi: 10.1039/c7em00458c. PMID: 29251308.
- Weizel A, Schlüsener MP, Dierkes G, Ternes TA. Occurrence of Glucocorticoids, Mineralocorticoids, and Progestogens in Various Treated Wastewater, Rivers, and Streams. *Environ Sci Technol*. 2018 May 1;52(9):5296-5307. doi: 10.1021/acs.est.7b06147. Epub 2018 Apr 17. PMID: 29580053.
- Wojnowski W, Tobiszewski M, Pena-Pereira F, Psillakis E. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 149, 2022, 116553, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.

- Wudy SA, Schuler G, Sánchez-Guijo A, Hartmann MF. *The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. J Steroid Biochem Mol Biol.* 2018 May;179:88-103. doi: 10.1016/j.jsbmb.2017.09.003. Epub 2017 Sep 28. PMID: 28962971
- Xia X, Li X, Ding S, Zhang S, Jiang H, Li J, Shen J. *Ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of six resorcylic acid lactones in bovine milk. J Chromatogr A.* 2009 Mar 20;1216(12):2587-91. doi: 10.1016/j.chroma.2009.01.033. Epub 2009 Jan 17. PMID: 19200550.
- Yuan Y, Wang M, Jia N, Zhai C, Han Y, Yan H. *Graphene/multi-walled carbon nanotubes as an adsorbent for pipette-tip solid-phase extraction for the determination of 17 β -estradiol in milk products. J Chromatogr A.* 2019 Aug 30;1600:73-79. doi: 10.1016/j.chroma.2019.04.055. Epub 2019 Apr 22. PMID: 31047658.
- Zhao Z, Liu C, Lian J, Liang N, Zhao L. *Development of extraction separation technology based on deep eutectic solvent and magnetic nanoparticles for determination of three sex hormones in milk. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2021 Mar 1;1166:122558. doi: 10.1016/j.jchromb.2021.122558. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33540148.
- Zhou T, Che G, Ding L, Sun D, Li Y. *Recent progress of selective adsorbents: From preparation to complex sample pretreatment. Trend. Anal. Chem., 121 (2019), Article 115678*