



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

**NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS  
RÁPIDAS CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN  
ANÁLISIS AGROALIMENTARIO**

**Tesis Doctoral**

M<sup>a</sup> Luisa Castillo García

Córdoba, 2016

TITULO: *Nuevas metodologías analíticas rápidas con detección luminiscente en análisis agroalimentario*

AUTOR: *María Luisa Castillo García*

---

© Edita: UCOPress. 2017  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---





**NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS  
RÁPIDAS CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN ANÁLISIS  
AGROALIMENTARIO**

LAS DIRECTORAS

Fdo. **Agustina Gómez Hens**  
Catedrática del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba

Fdo. **M<sup>a</sup> de la Paz Aguilar Caballos**  
Profesora Titular del Departamento  
de Química Analítica de la  
Universidad de Córdoba

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en Ciencias  
LA DOCTORANDA

Fdo. **M<sup>a</sup> Luisa Castillo García**  
Licenciada en Química



**Agustina Gómez Hens**, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba y **M<sup>a</sup> de la Paz Aguilar Caballos**, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, en calidad de directoras de la Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Química, M<sup>a</sup> Luisa Castillo García,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral **“NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS RÁPIDAS CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN ANÁLISIS AGROALIMENTARIO”** ha sido desarrollada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Córdoba, y que, a nuestro juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Que M<sup>a</sup> Luisa Castillo García es la primera autora de todos los trabajos científicos presentados en esta Tesis Doctoral. De acuerdo con la normativa de esta Universidad y los acuerdos internos, el primer autor es el responsable de la realización del trabajo experimental y de la producción del manuscrito. Además, ha participado en reuniones periódicas con los supervisores para evaluar y discutir los resultados obtenidos durante la Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Córdoba, a 28 de octubre de 2016.

**Agustina Gómez Hens**

**M<sup>a</sup> de la Paz Aguilar Caballos**





## **TÍTULO DE LA TESIS: NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS RÁPIDAS CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN ANÁLISIS AGROALIMENTARIO**

**DOCTORANDA: M<sup>a</sup> Luisa Castillo García**

### **INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

La doctoranda M<sup>a</sup> Luisa Castillo García cursó los estudios de Máster en Química Fina Avanzada en la Universidad de Córdoba con excelentes resultados. Obtuvo la calificación de Sobresaliente en su Trabajo Fin de Máster, cuyos resultados más relevantes se publicaron en la revista Journal of Agricultural and Food Chemistry.

La temática de la Tesis se encuadra dentro de tendencias muy actuales de la Química Analítica, ya que aborda el desarrollo de nuevas metodologías rápidas mediante el empleo de nanomateriales y/o cromatografía de líquidos. Como resultado de las investigaciones realizadas se han establecido nuevos métodos para la determinación de compuestos interés agroalimentario incidiendo en tres líneas principales: 1) aplicación de la Nanotecnología al proceso analítico, 2) desarrollo de nuevas metodologías de respuesta rápida y 3) utilización de nuevos sistemas de detección luminiscente. Asimismo, se ha llevado a cabo un exhaustivo trabajo de revisión bibliográfica que muestra los últimos avances en el uso de nanomateriales en las etapas básicas del proceso cromatográfico.

La realización de las investigaciones incluidas en esta Memoria ha permitido a la doctoranda adquirir una sólida formación científica. Durante este período formativo ha desarrollado excelentes cualidades para la investigación, tales como la planificación y realización de los experimentos de forma rigurosa y sistemática, así como capacidad para el trabajo independiente, entre otros aspectos. También ha demostrado una enorme perseverancia para superar los problemas técnicos que implica la cromatografía de líquidos ultra-rápida, consiguiendo finalmente excelentes resultados. Junto con la experiencia adquirida en el uso de diversas técnicas analíticas, ha abordado la síntesis y caracterización de nuevos nanomateriales híbridos y el desarrollo de metodologías analíticas, con aplicación al análisis de muestras agroalimentarias, en su mayoría con matrices complejas. Todo ello ha dado lugar a

publicaciones científicas en revistas internacionales, con un total de cinco artículos, de los que cuatro ya han sido publicados y el quinto se ha enviado para su publicación. También ha presentado seis comunicaciones científicas en congresos nacionales e internacionales, dos de ellas en forma de comunicación oral.

Por todo ello, consideramos que la investigación desarrollada y recogida en esta Memoria reúne todos los requisitos necesarios en cuanto a originalidad, innovación y calidad, por lo que autorizamos la presentación de la Tesis Doctoral de D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Luisa Castillo García.

Córdoba, 28 de octubre de 2016

Firma de las directoras

Fdo. Agustina Gómez Hens

Fdo. M<sup>a</sup> de la Paz Aguilar Caballos

**INFORME DEL FACTOR DE IMPACTO DE LAS PUBLICACIONES DE LA TESIS**

**TÍTULO DE LA TESIS: NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS RÁPIDAS CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN ANÁLISIS AGROALIMENTARIO**

**DOCTORANDA: M<sup>a</sup> Luisa Castillo García**

| <i>PUBLICACIÓN</i>  | <i>FACTOR DE IMPACTO (JCR 2015)</i> | <i>CUARTIL</i>                              |
|---|-------------------------------------|---|
| Application of Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> nanoparticles for lasalocid and salicylate determination in food analysis.<br><b>Journal of Agricultural and Food Chemistry</b> 60 (2012) 11741-11747   | 2,857                               | 1 <sup>o</sup><br>Cat. Applied Chemistry    |
| Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography.<br><b>Journal of Chromatography B</b> 985 (2015) 85-90   | 2,687                               | 2 <sup>o</sup><br>Cat. Analytical Chemistry |
| A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples.<br><b>Journal of Chromatography A</b> 1425 (2015) 73-80 | 3,926                               | 1 <sup>o</sup><br>Cat. Analytical Chemistry |
| Nanomaterials as tools in chromatographic methods.<br><b>Trends in analytical chemistry</b> 82 (2016) 385-393   | 7,487                               | 1 <sup>o</sup><br>Cat. Analytical Chemistry |
| Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast liquid chromatography and luminescence detection.<br><b>Analytical and bioanalytical chemistry</b> (2016) enviado para su publicación  | 3,125                               | 1 <sup>o</sup><br>Cat. Analytical Chemistry |





|   |     |
|---|-----|
| <b>OBJETO</b> .....   | 1   |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | 5   |
| <b>CAPÍTULO I. HERRAMIENTAS ANALÍTICAS</b> .....  | 71  |
| <b>CAPÍTULO II. NUEVOS NANOMATERIALES COMO REACTIVOS ANALÍTICOS LUMINISCENTES</b> .....   | 89  |
| <i>II.1 Application of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> nanoparticles for lasalocid and salicylate determination in food analysis</i> .....  | 99  |
| <b>CAPÍTULO III. NUEVAS ESTRATEGÍAS EN CROMATOGRAFÍA CON EL USO DE NANOMATERIALES</b> .....   | 125 |
| <i>III.1 Nanomaterials as tools in chromatographic methods</i> .....  | 131 |
| <i>III.2 A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples</i> ..... | 163 |
| <b>CAPÍTULO IV. NUEVOS DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS RÁPIDA CON DETECCIÓN LUMINISCENTE</b> .....   | 191 |
| <i>IV.1 Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography</i> .....   | 197 |
| <i>IV.2 Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast liquid chromatography and luminescence detection</i> .....   | 219 |
| <b>CAPÍTULO V. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....  | 245 |
| <b>CONCLUSIONES</b> .....   | 305 |
| <b>ANEXOS. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA</b> .....  | 311 |
| <i>Anexo A. Publicaciones científicas derivadas de la Tesis Doctoral</i> .....  | 313 |
| <i>Anexo B. Presentación de comunicaciones a congresos</i> .....  | 317 |
| <i>Anexo C. Posters</i> .....   | 333 |





**OBJETO**





**E**l objetivo genérico de las investigaciones que constituyen esta Memoria ha sido el desarrollo de métodos analíticos rápidos para el análisis de muestras agroalimentarias mediante detección luminiscente. Se ha incidido básicamente en dos aspectos actuales en la Química Analítica, como son la aplicación de la Nanotecnología al proceso analítico y el desarrollo de metodologías de respuesta rápida, utilizando principalmente cromatografía de líquidos. Para alcanzar este objetivo se han realizado las siguientes investigaciones:

- ❑ Estudio de la aplicabilidad de nuevos nanomateriales como sorbentes y como reactivos en análisis agroalimentario.
- ❑ Desarrollo de métodos cuantitativos rápidos mediante cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC).
- ❑ Utilización de sistemas de derivatización post-columna para mejorar la detección en cromatografía de líquidos rápida.
- ❑ Aplicación de las metodologías propuestas al análisis agroalimentario con objeto de demostrar su utilidad práctica.

También ha formado parte del objetivo de la Tesis la formación de la doctoranda mediante la realización de actividades complementarias a la labor investigadora, como la asistencia a cursos formativos y la presentación de comunicaciones a congresos.



An ECG (heart rate) line is positioned on the left side of the page, above a horizontal bar with a colorful geometric pattern. The word "INTRODUCCIÓN" is written in a bold, teal, sans-serif font, starting from the end of the ECG line and extending to the right. To the right of the text are four teal circles of increasing size, arranged in a horizontal line.

# INTRODUCCIÓN





**L**as investigaciones presentadas en esta Memoria han tenido como objetivo el desarrollo de diversos métodos analíticos rápidos, utilizando principalmente la cromatografía de líquidos con detección luminiscente, para el análisis de muestras agroalimentarias. El trabajo realizado ha incidido en tres líneas principales, las cuales pueden estar relacionadas entre sí, como son el desarrollo de nuevas metodologías de respuesta rápida, la utilización de sistemas de detección luminiscente y la aplicación de la nanotecnología al proceso analítico. Como introducción a dichas investigaciones se describen diversos aspectos relacionados con las metodologías desarrolladas, las herramientas analíticas y las especies químicas utilizadas para el establecimiento de los métodos propuestos.

La preocupación por la salud pública y el bienestar de los consumidores han dado lugar a una legislación extensa sobre el control analítico de los niveles de aditivos, residuos y contaminantes en los productos agroalimentarios. Los analitos objeto de las investigaciones realizadas en esta Memoria son fármacos de uso veterinario, para los que la presencia de residuos está regulada a nivel europeo. Por tanto, los métodos desarrollados deben ser capaces de proporcionar respuestas fiables considerando los relativamente bajos niveles de concentración en que se pueden encontrar estas sustancias en las muestras analizadas y la complejidad de estas muestras.

Teniendo en cuenta la investigación recogida en la Memoria, esta introducción se ha dividido en los siguientes apartados: I) metodologías rápidas, II) sistemas de detección luminiscentes, III) nanomateriales en Química Analítica y IV) marco normativo relacionado con el control analítico de residuos de fármacos de uso veterinario. Asimismo, se incluirá dentro de cada sección una visión general, aunque no exhaustiva, de las aplicaciones más recientes en el campo agroalimentario.

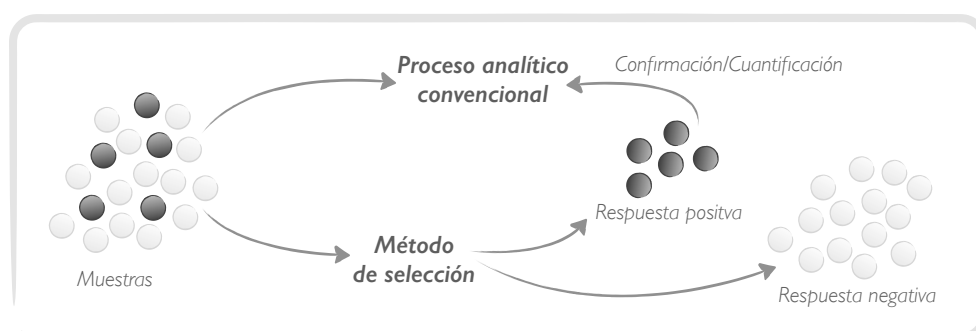
### **1.1 METODOLOGÍAS RÁPIDAS**

La necesidad de nuevas metodologías analíticas rápidas y fiables ha dado lugar a que se continúe trabajando en este área de investigación dentro de la Química Analítica. La demanda de una mayor velocidad de procesamiento de muestras está impulsando el desarrollo de nuevas metodologías de respuesta rápida, con las consecuentes innovaciones instrumentales que ello implica. La Química Analítica debe responder a las nuevas necesidades que la sociedad actual plantea, desarrollando métodos adecuados que ofrezcan sensibilidad, selectividad, rapidez y facilidad de automatización.

La rapidez requerida en las metodologías analíticas puede conseguirse mediante dos estrategias claramente diferenciadas: 1) la utilización de métodos de selección o "screening" para reducir el número de muestras sometidas a análisis completo y 2) la disminución en la duración del proceso analítico.

Los métodos de selección desempeñan un papel destacable en el contexto de la Química Analítica actual ya que, al reducir el número de muestras que requieren un análisis confirmatorio, no sólo aumenta la velocidad del análisis, sino que también reduce el coste del análisis de rutina. Los métodos de selección se caracterizan por generar una respuesta de tipo cualitativo, la cual suele ser binaria (Si/No), lo que indica la presencia/ausencia de una especie o especies determinadas en la muestra por encima de un nivel de corte [1], permitiendo clasificar las muestras en dos grupos (positivas o negativas) de una forma rápida y segura. Sólo las muestras

que proporcionen un resultado positivo en el sistema de “screening” se someterán al proceso analítico completo para confirmar la respuesta obtenida y ampliar la información analítica [2], mientras que, sin la utilización de un método de selección, todas las muestras tendrían que ser sometidas al análisis completo (Figura 1).



**Figura 1.** Separación de muestras mediante un método de selección

El desarrollo de métodos de selección requiere que los niveles de sensibilidad y selectividad alcanzados sean adecuados para reducir al mínimo el número de resultados falsos negativos y positivos. Es deseable que el método no origine falsos negativos, ya que estas muestras son rechazadas, mientras que, si existen falsos positivos, se detectan al aplicar el método confirmatorio.

Una clasificación aceptada de los métodos de selección es la basada en el sistema de detección utilizado, pudiendo distinguir entre: 1) análisis cualitativo clásico o sensorial, en el que la detección se realiza utilizando los sentidos humanos, como el olfato o la vista, y 2) análisis cualitativo instrumental, en el que la detección se realiza mediante una señal óptica, electroquímica o de otro tipo. En el primer caso, la respuesta se obtiene de forma directa sin necesidad de tratamiento de datos. Estos métodos se basan normalmente en la aparición de un cambio apreciable debido a una reacción química (ácido-base, formación de complejos, precipitación,

etc), o bioquímica. Dentro de este grupo se encuentran los ensayos en forma de 'kits', que son dispositivos comerciales diseñados para una aplicación concreta, los cuales contienen los reactivos necesarios para la obtención de una respuesta rápida y sencilla. En el segundo grupo, la respuesta instrumental debe transformarse en respuesta binaria del tipo SI/NO, lo que implica un tratamiento de datos. En estos casos, a diferencia de los métodos cuantitativos, no es necesaria una curva de calibrado, sino que se establece una respuesta instrumental como referencia, correspondiente a la concentración que se desea cribar, y la respuesta binaria se obtiene por comparación con ésta.

Los métodos de alto rendimiento o alta velocidad de muestreo (*"high-throughput"*) constituyen la máxima expresión en lo que se refiere a rapidez de respuesta. Estos métodos experimentaron un gran avance para aplicarlos a la síntesis combinatoria utilizada para la selección de nuevos candidatos en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos [3]. Fueron necesarios nuevos desarrollos metodológicos para procesar un número elevado de muestras de forma prácticamente simultánea. Los sistemas *"microarray"*, principalmente los que utilizan microplacas con pocillos, son una opción muy adecuada ya que se requieren pequeños volúmenes de muestras y reactivos, lo que posibilita la miniaturización de los ensayos. Aunque estos métodos son muy utilizados en las áreas farmacéutica y clínica, no han tenido una aplicación masiva dentro del análisis agroalimentario. Se ha descrito un método automático de respuesta rápida para la determinación de tetraciclinas en miel y orina animal basado en la tecnología de reactivos secos y en la medida de la luminiscencia sensibilizada del complejo  $\text{Eu}_2\text{O}_3$ -tetraciclina [4]. El ensayo es muy sencillo y rápido ya que el reactivo se encuentra inmovilizado en los pocillos de una microplaca y sólo se requiere la adición de la muestra al pH adecuado en el momento del análisis.

Los sensores son sistemas de respuesta rápida utilizados frecuentemente como método de selección, aunque también proporcionan medidas cuantitativas o

semi-cuantitativas. Son dispositivos analíticos en los que se combina un elemento de reconocimiento y un transductor, que permite medir la señal originada por la presencia del analito o los analitos. El funcionamiento de los mismos se basa en la capacidad del transductor para procesar una señal, que puede ser óptica, electroquímica, piezoeléctrica o térmica, como consecuencia de la interacción del elemento de reconocimiento con el analito y convertirla en una señal eléctrica medible. Estos sistemas deben ser sensibles y selectivos, ya que deben responder a pequeños cambios en la concentración de analito y asegurar que la respuesta obtenida es debida exclusivamente a la presencia de éste. Cuando el elemento de reconocimiento o receptor es una biomolécula se le denomina biosensor, utilizando para este fin anticuerpos (inmunosensores), enzimas, células o ADN [5], aunque en los últimos años han comenzado a introducirse otros tipos de receptores tales como aptámeros o péptidos [6, 7]. Los biosensores combinan el poder analítico de los transductores químicos con la selectividad propia de los biorreceptores, dando lugar a sistemas para la detección muy selectivos y sensibles.

Las aplicaciones de los sensores en análisis agroalimentario son muy numerosas [8], habiendo sido objeto de revisión recientemente las relacionadas con la determinación de compuestos intrínsecos de los alimentos, tales como el ácido ascórbico [9] y la glucosa [10]. También se han descrito sensores para la determinación de contaminantes, en concreto de patógenos, basados en distintas configuraciones [11 – 13], pudiendo utilizar en algunos casos dispositivos móviles *smartphone* [11]. Otros contaminantes cuyas determinaciones mediante sensores han sido objeto de revisión son bisfenol A [14, 15] y micotoxinas [15, 16]. La aplicabilidad de los sensores se ha extendido al control del estado de conservación de los alimentos, con objeto de garantizar la calidad y seguridad alimentarias antes que éstos lleguen al consumidor, lo que permite conocer aspectos tales como la estabilidad del alimento durante el almacenamiento o la integridad de los envases. Un ejemplo es el reciente desarrollo de un sensor para oxígeno basado en medidas

de fosforescencia que permite evaluar si el envase se ha abierto después de su sellado [17].

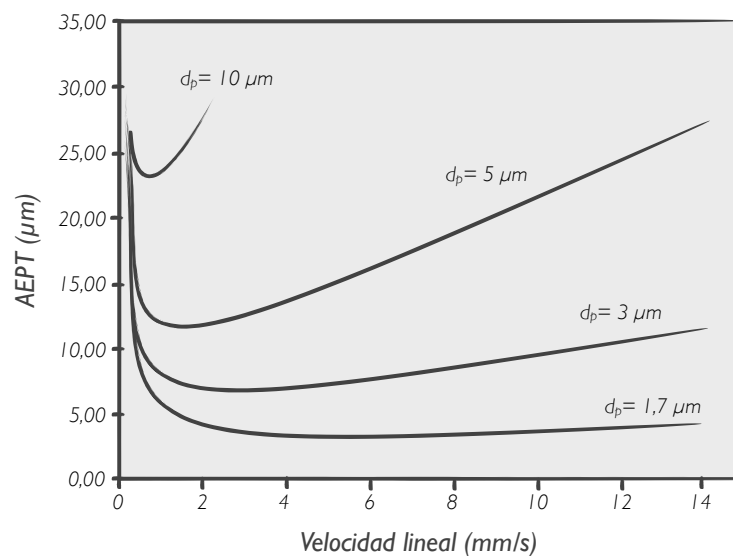
Por otra parte, es deseable que los métodos analíticos usados fundamentalmente para la cuantificación también originen una respuesta rápida, lo que puede conseguirse acortando la duración del proceso analítico. En esta Memoria se van a abordar algunos desarrollos en cromatografía de líquidos rápida ("fast liquid chromatography"), cuyos aspectos teóricos han sido objeto de revisión recientemente [18 – 22]. Bajo esta denominación se aglutinan diversas opciones instrumentales relacionadas con: 1) el desarrollo de instrumentos con sistemas de bombeo capaces de soportar presiones de hasta 2400 bares [23, 24], provistos de detectores de respuesta rápida y en los que la dispersión extra-columna sea mínima para conseguir la máxima eficacia en la separación, y 2) el uso de diversas tecnologías de fabricación de fases estacionarias formadas por: partículas totalmente porosas con diámetros inferiores a 2  $\mu\text{m}$  (sub-2- $\mu\text{m}$ ), partículas parcialmente porosas (denominadas genéricamente "core-shell") con diámetros entre 1,3 y 2,7  $\mu\text{m}$  y, por último, fases estacionarias monolíticas.

La técnica más ampliamente aceptada es la cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC). Se comercializaron los primeros instrumentos a partir de 2004, los cuales incluían las mejoras mencionadas anteriormente junto con el uso de columnas empaquetadas con fases estacionarias formadas por partículas totalmente porosas, con diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ , a diferencia de las convencionales que suelen presentar un tamaño de 3–5  $\mu\text{m}$  [18].

Cuando el tamaño de partícula del empaquetamiento de la columna disminuye, características como la eficacia, la capacidad de pico (número de picos resueltos por unidad de tiempo) y la velocidad de análisis aumentan. De hecho, según la ecuación de van Deemter, que describe la relación entre la velocidad del flujo de la fase móvil y la altura equivalente de plato teórico (AEPT) de la columna

[25], cuando se usan partículas con un diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$  no solo se obtiene un aumento significativo en la eficacia, sino que ésta no disminuye al aumentar la velocidad del flujo [19].

Como puede observarse en la Figura 2, un aumento en el caudal de la fase móvil tiene como consecuencia el aumento de la AEPT, lo que se traduce en una disminución de la eficacia cromatográfica, ya que ambas variables están inversamente relacionadas. Esto no ocurre para tamaños de partícula inferiores a 2  $\mu\text{m}$ , donde se observan unos valores de AEPT significativamente menores, lo que indica una mayor eficacia y un perfil más plano de la curva de Van Deemter, sin consecuencias negativas al aumentar la velocidad de flujo.



**Figura 2.** Curvas de van Deemter para diferentes tamaños de partícula (10, 5, 3 y 1,7  $\mu\text{m}$ )

El uso de partículas pequeñas totalmente porosas para el empaquetamiento de columnas de UHPLC da lugar a separaciones más rápidas con una elevada capacidad de pico. Sin embargo, para aprovechar esta ventaja, es necesario trabajar a

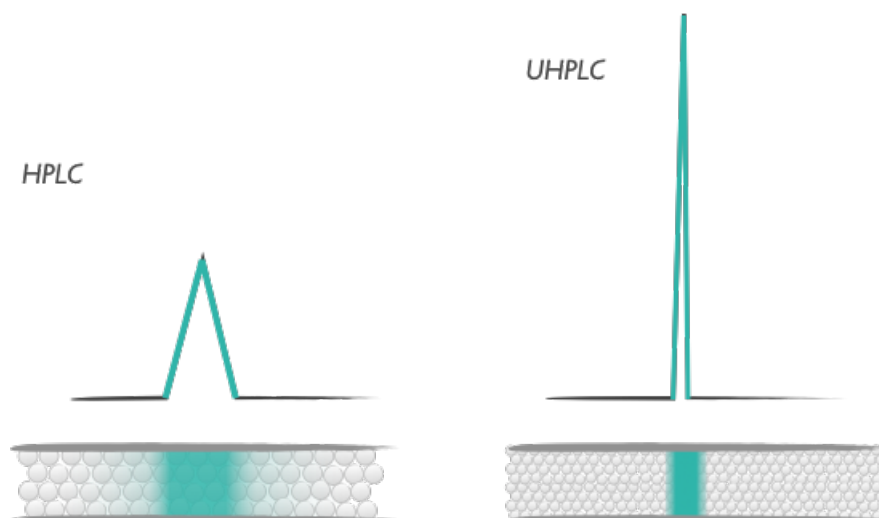


presiones más elevadas que las empleadas en HPLC. Generalmente, un sistema de UHPLC soporta 1000-1200 bares, llegando los más modernos hasta 2400 bares, frente a los 400 soportados en la mayoría de los instrumentos de HPLC. Esta capacidad para trabajar a presiones más elevadas aumenta la velocidad del análisis, ya que disminuye la duración del proceso cromatográfico, y reduce el consumo de disolvente y el coste del análisis, contribuyendo también a la protección del medio ambiente. Además, puesto que la eficacia cromatográfica es proporcional a la longitud de la columna e inversamente proporcional al tamaño de partícula, es posible realizar separaciones más rápidas con columnas más cortas y/o velocidades de flujo mayores incrementado, además, la resolución y la sensibilidad.

El aumento de la sensibilidad en UHPLC puede explicarse en base a un menor ensanchamiento de banda en columnas con partículas de menor tamaño, ya que al disminuir el diámetro de las partículas a través de las cuales se lleva a cabo la migración, disminuye la difusión de Eddy implicada en la ecuación de van Deemter, dando lugar a picos más altos y estrechos que mejoran la sensibilidad (Figura 3). La difusión de Eddy o difusión en remolino contempla el fenómeno por el cual las moléculas en disolución pueden atravesar la columna cromatográfica siguiendo trayectorias de distinta longitud, dando lugar a tiempos de retención ligeramente diferentes. La probabilidad de que esto suceda es directamente proporcional al diámetro de las partículas que componen el relleno de la columna

Por todo esto, puede afirmarse que las ventajas que presenta esta técnica frente a HPLC son claras, ya que los principios cromatográficos y mecanismos de separación se mantienen, mientras que la velocidad de análisis, resolución y sensibilidad se mejoran frente a la técnica convencional. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones como son el coste de la instrumentación (20-50% más elevado que el de HPLC), y el de las columnas cromatográficas y su aún escasa disponibilidad para modalidades distintas de la fase reversa [20]. En la actualidad existen fases estacionarias para distintas modalidades: interacciones hidrofílicas [26],

separaciones quirales [27] y exclusión por tamaños [28] para la separación de analitos de baja masa molecular. Asimismo, se han desarrollado fases estacionarias para la determinación de macromoléculas de hasta 2 MDa [28 – 32].



**Figura 3.** Impacto del ensanchamiento de banda en la forma del pico. Comparación entre HPLC y UHPLC

Uno de los avances más significativos de los últimos años ha sido impulsado por el uso de columnas empaquetadas con partículas parcialmente porosas, las cuales contienen un núcleo sólido recubierto de una fina capa de material poroso, en lugar de las partículas de sílice completamente porosas utilizadas de forma convencional. Esta nueva tecnología se conoce con el nombre general de “core-shell” o “fused-core” y proporciona separaciones rápidas y eficaces, similares a las obtenidas con columnas rellenas de partículas de diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ , pero con presiones notablemente inferiores. Asimismo, proporcionan separaciones más eficaces que las columnas que contienen partículas totalmente porosas de similares dimensiones.

Actualmente existen diversas columnas comerciales con este tipo de empaquetamiento bajo distintos nombres según la empresa fabricante: Poroshell (Agilent), Halo (Advanced Materials Technology), Cortecs (Waters), Kinetex (Phenomenex) o Accucore (Thermo Fisher Scientific). Todas ellas se caracterizan por contener partículas que presentan un núcleo sólido en el que los analitos no pueden penetrar y un recubrimiento poroso, aunque los materiales utilizados, su estructura, así como los métodos de síntesis de las partículas varían en función de la casa comercial [21].

La reducción del volumen muerto es una de las principales ventajas del uso de partículas de núcleo sólido como empaquetamiento en columnas cromatográficas. El espacio ocupado con este tipo de partículas en comparación con partículas completamente porosas aumenta entre un 20-30%. Como resultado se obtiene una menor difusión longitudinal a través de la columna, dando lugar a separaciones rápidas de alta eficacia, comparables a las obtenidas mediante columnas de partículas con diámetros inferiores a 2  $\mu\text{m}$ . Además, presentan la ventaja añadida de que, debido a que la presión depende fundamentalmente del diámetro de las partículas que componen el relleno de la columna, ésta no se afecta prácticamente por las nuevas partículas, lo que permite la utilización de instrumentación convencional de HPLC para la realización de la separación cromatográfica.

Una tendencia más reciente en el uso de fases estacionarias “*core-shell*” es el desarrollo y utilización de fases estacionarias integradas por partículas de diámetros inferiores a 2  $\mu\text{m}$  [22 - 24]. Se han desarrollado partículas de 1,3  $\mu\text{m}$  de diámetro, las cuales experimentan problemas de sobrepresión [23] y de escasa retención de los analitos para partículas con capas porosas delgadas [33]. Más recientemente, se han desarrollado sistemas de UHPLC capaces de soportar hasta 2400 bares de presión y que utilizan partículas con diámetros entre 0,6 y 1  $\mu\text{m}$  [24]. El principal inconveniente es la falta de reproducibilidad en la eficacia de las columnas debido a irregularidades

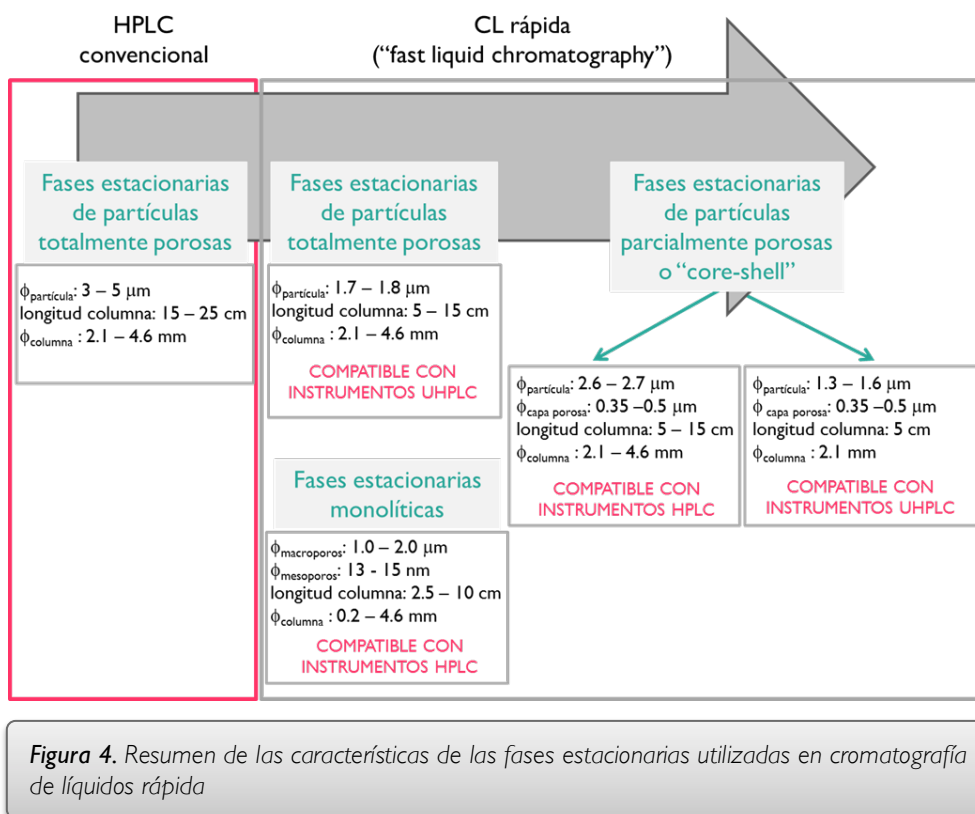
en el empaquetamiento, especialmente para columnas de diámetros inferiores a 4,6 mm.

El uso de fases estacionarias monolíticas es otra opción para conseguir separaciones rápidas mediante cromatografía de líquidos, compatible con la instrumentación utilizada en HPLC [34]. Estas fases pueden desarrollarse a partir de sílice o de monómeros orgánicos. Para las fases estacionarias basadas en sílice, el monolito inorgánico poroso se obtiene mediante un procedimiento sol-gel a partir de sílice de alta pureza. El esqueleto ramificado obtenido presenta una estructura de poro bimodal, compuesta por macroporos (con diámetros de 1 – 2  $\mu\text{m}$ ) y mesoporos (con diámetros inferiores o iguales a 15 nm). Los macroporos permiten la aplicación de caudales elevados mientras que los mesoporos tienen un área superficial elevada que permite maximizar la carga de fase activa de la columna. La pared del monolito se suele recubrir con un polímero impermeable para eliminar los fenómenos de difusión a través de las paredes de la columna. Las fases estacionarias monolíticas basadas en polímeros orgánicos, principalmente derivados del metacrilato, se suelen utilizar fundamentalmente para separaciones en fase normal y de cambio iónico, observándose una tendencia al uso de estos materiales monolíticos para el tratamiento en muestras de alimentos [34].

Las columnas monolíticas tienen una mayor porosidad total que las de partículas porosas empaquetadas por lo que presentan menor resistencia al flujo de la fase móvil. La sobrepresión es, por tanto, baja y permite el uso de caudales relativamente elevados sin pérdidas sustanciales de resolución. Estas prestaciones posibilitan el uso de un instrumento HPLC convencional para el desarrollo de separaciones rápidas ya que son capaces de operar con caudales próximos a 5 mL  $\text{min}^{-1}$  con presiones inferiores a 200 bares, que suele ser la presión máxima recomendada por los fabricantes. Una ventaja adicional es el menor desgaste experimentado por los componentes del sistema de bombeo. Un aspecto que hay que considerar es la compatibilidad con el sistema de detección, ya que si la

velocidad de adquisición de datos es baja, el detector no registrará adecuadamente los picos con tiempos de residencia relativamente cortos. En general, si los tiempos de adquisición son cercanos a los 200 ms o incluso inferiores [22], los resultados pueden ser satisfactorios, no existiendo además un aumento apreciable del ruido de la señal analítica.

La Figura 4 muestra a modo de resumen las dimensiones más usuales de las fases estacionarias utilizadas en cromatografía de líquidos convencional y rápida con fines analíticos.



Como puede observarse, se han incluido las características más comunes de las columnas comerciales preparadas mediante las distintas tecnologías de fabricación de fases estacionarias anteriormente comentadas, y su compatibilidad con los

instrumentos de HPLC y UHPLC. Así, las columnas de partículas totalmente porosas sub-2- $\mu\text{m}$  son apropiadas para su uso en instrumentos de UHPLC, ya que la sobrepresión originada por el aumento del caudal limita la obtención de separaciones eficaces con instrumentos HPLC convencionales. Dentro de las partículas de tipo “*core-shell*”, las de tamaños de 2,6 – 2,7  $\mu\text{m}$  permiten su uso con instrumentos de HPLC para obtener separaciones rápidas, aunque su utilidad práctica va a depender de la composición de la fase móvil utilizada, ya que la viscosidad y la compresibilidad del disolvente orgánico serán factores clave. Para las partículas “*core-shell*” de menor tamaño, se requerirán instrumentos de UHPLC debido a las elevadas sobrepresiones que se pueden originar.

El acoplamiento de la espectrometría de masas (MS) con UHPLC ha propiciado el desarrollo de un elevado número de métodos analíticos para la detección de residuos y contaminantes en muestras de alimentos [35 – 41]. Los relativamente bajos niveles de concentración definidos por la legislación y la complejidad de las matrices de las muestras analizadas convierten estas determinaciones en retos importantes desde el punto de vista analítico. El acoplamiento de ambas técnicas, utilizando espectrómetros de masas de alta resolución, normalmente de tipo OrbiTrap, ha permitido la determinación simultánea de un elevado número de analitos, llegando en ocasiones a 300 [36, 39]. También se ha descrito mediante este acoplamiento la determinación de compuestos de distinta masa que co-eluyen, demostrando que la técnica de detección complementa a la técnica de separación de forma eficaz y posibilita la resolución de mezclas muy complejas. No obstante, un aspecto que limita la eficacia de estas determinaciones es la existencia de efecto matriz [39 – 41], por lo que se han utilizado técnicas de extracción para la limpieza de los extractos y se han propuesto diagramas de flujo para la evaluación de la existencia de efectos matriz [40].

Las columnas monolíticas han sido previamente utilizadas en análisis agroalimentario para separaciones basadas en la modalidad de fase reversa con fases

estacionarias de sílice funcionalizada con  $C_{18}$  [34, 35, 42 – 53] y de polímeros orgánicos [34, 54, 55]. Por ejemplo, se ha descrito ampliamente la determinación de compuestos fenólicos en diferentes matrices [42 – 47], tales como vinos blancos y tintos [42], zumos [43], extractos de soja [44, 45], col lombarda [46] y en muestras obtenidas durante el seguimiento de procesos de maduración de frutas [47], entre otros. La elevada porosidad de las columnas monolíticas posibilita el análisis de muestras con matrices complejas, tales como muestras de vino tinto [42], con un tratamiento de muestra sencillo que sólo requiere la dilución de las muestras para adecuarlas al intervalo de trabajo del método desarrollado. Asimismo, se han determinado caseínas en muestras de leche utilizando la modalidad de fase reversa [52] y también mediante el uso de polímeros orgánicos [54]. En la actualidad, una de las principales limitaciones de las columnas monolíticas de sílice comerciales sigue siendo su relativamente elevado coste, superior en la mayoría de los casos al de las columnas basadas en tecnología “*core-shell*” con funcionalidades similares.

En resumen, es deseable disponer de métodos cromatográficos rápidos alternativos a los ya descritos, pero utilizando detectores convencionales sensibles, selectivos y económicos, tales como los detectores fluorimétricos, para la resolución de problemas analíticos en el contexto agroalimentario. Éste ha sido sin duda, uno de los objetivos principales de las investigaciones contenidas en esta Memoria.

## **1.2 SISTEMAS DE DETECCIÓN LUMINISCENTE**

La luminiscencia consiste en la emisión de radiación electromagnética como consecuencia de la desactivación de una molécula que previamente ha sido excitada. Cuando esta excitación tiene lugar mediante la absorción de fotones se denomina fotoluminiscencia, pudiéndose distinguir entre fluorescencia y fosforescencia, según si las transiciones electrónicas conllevan o no un cambio en el espín electrónico. En la fluorescencia no se produce dicho cambio, por lo que presenta una vida corta, mientras que en la fosforescencia hay un cambio en el espín del electrón, dando lugar a que la emisión de la radiación sea más lenta.

Estos fenómenos han dado lugar a diversas técnicas utilizadas ampliamente como sistemas de detección en metodologías analíticas debido a que presentan ventajas destacables frente a la detección fotométrica, mejorando los límites de detección y la selectividad. Los límites de detección obtenidos con técnicas fotoluminiscentes suelen ser de uno a tres órdenes de magnitud más bajos, ya que la señal analítica puede mejorarse aumentando la energía de la radiación incidente o amplificando la señal obtenida en el detector. Además, la luminiscencia es una característica mucho menos general que la absorción, es decir, existen bastantes especies capaces de absorber radiación, pero el número de ellas que puede emitir es más reducido. También hay que tener en cuenta que las medidas fotoluminiscentes requieren la utilización de dos longitudes de onda, de excitación y de emisión, por lo que el uso de dos parámetros instrumentales puede minimizar interferencias, mientras que en fotometría se utiliza sólo una longitud de onda de máxima absorción.

La emisión fotoluminiscente se ve afectada por factores intrínsecos de las moléculas, relacionados con su estructura, como la rigidez y el grado de conjugación, y por la presencia de átomos pesados. También está afectada por factores externos, más fáciles de controlar, tales como la temperatura, el disolvente, el pH y el oxígeno disuelto.

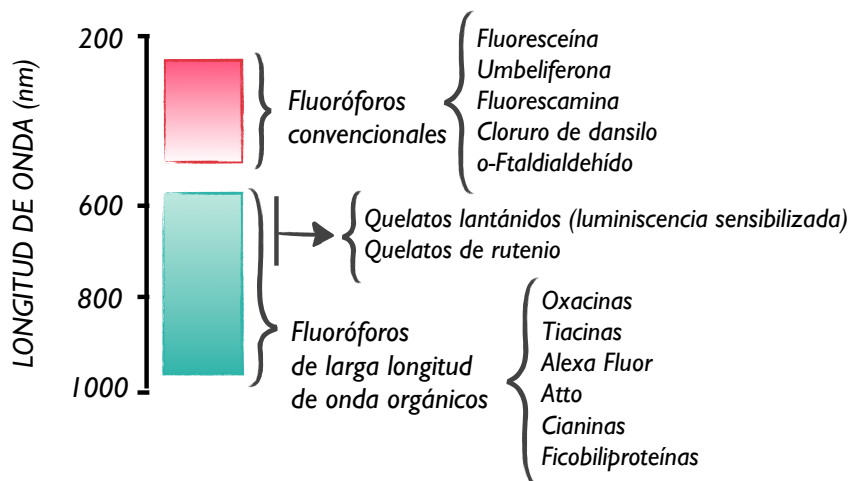
### ***1.2.1 Tipos de fluoróforos***

La emisión de señales luminiscentes puede ocurrir en distintas regiones del espectro electromagnético, desde el ultravioleta hasta el infrarrojo cercano. En la Figura 5 se muestran, a modo de ejemplo, algunos fluoróforos representativos de cada zona del espectro. Los fluoróforos que emiten a longitudes de onda más cortas suelen denominarse fluoróforos convencionales, porque han sido los más utilizados hasta la fecha debido al mayor número de especies orgánicas que emiten en esa región del espectro. La señal luminiscente de estos fluoróforos puede verse interferida por señales de componentes de la matriz de la muestra, las cuales suelen



producirse también en esa zona del espectro. Esta limitación puede evitarse o minimizarse de dos formas: 1) mediante la aplicación de la metodología cinética, ya que normalmente las señales procedentes de la matriz de la muestra tienen una naturaleza estática, y 2) mediante la separación cromatográfica previa a la detección, de forma que se consiga la discriminación espacial de los analitos a través de la columna cromatográfica.

Como se muestra en la Figura 5, además de los fluoróforos convencionales que emiten principalmente en la zona visible del espectro, existen quelatos de iones lantánidos y de rutenio(II) y grupos de compuestos orgánicos cuya emisión ocurre entre el visible más lejano y el infrarrojo cercano. La emisión de estos fluoróforos de larga longitud de onda (LWFs) no se ve prácticamente interferida por las señales de fondo de la matriz de la muestra, lo que les confiere selectividad espectral frente al uso de fluoróforos convencionales [56].



**Figura 5.** Clasificación de los fluoróforos, incluyendo ejemplos representativos de cada grupo

Algunos quelatos de iones lantánidos con ligandos orgánicos originan una luminiscencia intensa cuando se excitan a la longitud de onda de máxima absorción

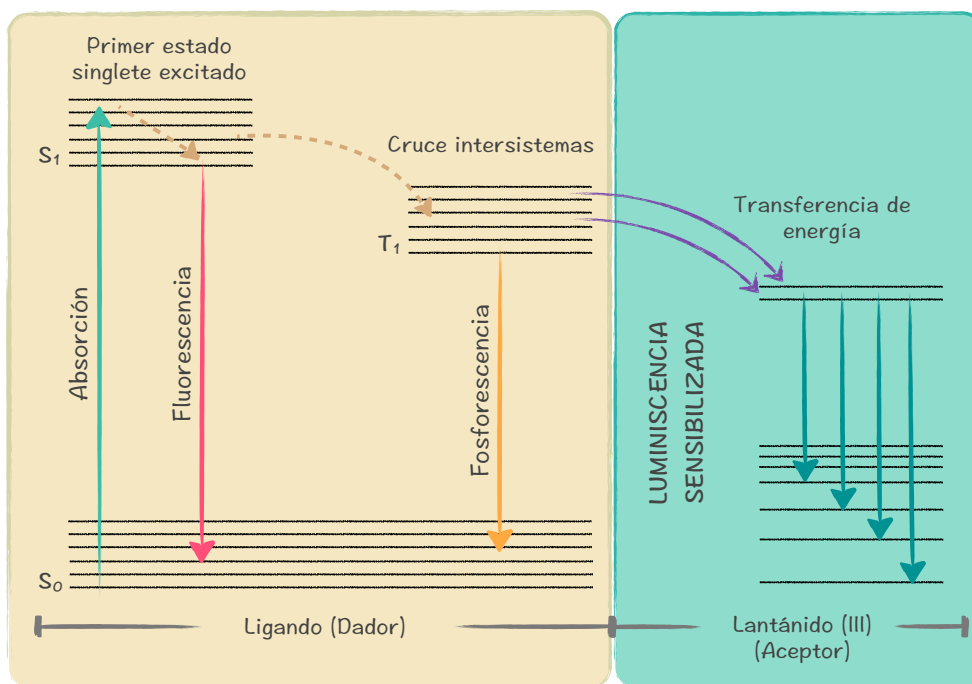
del ligando orgánico debido al fenómeno de luminiscencia sensibilizada [57]. Este fenómeno consiste en un proceso eficaz de transferencia de energía intramolecular desde el estado triplete excitado del ligando hasta un nivel de resonancia del ion lantánido, el cual es muy rápido ya que el lantánido está unido al ligando mediante enlace coordinado. Aunque podría considerarse que la luminiscencia sensibilizada de lantánidos es un tipo especial de fosforescencia sensibilizada a temperatura ambiente, hay una diferencia básica entre ambos procesos ya que el primero es intramolecular y el segundo es intermolecular, lo que hace que la luminiscencia sensibilizada de lantánidos sea menos susceptible a la inhibición de la luminiscencia por colisiones del estado triplete.

Para que se produzca una transferencia de energía eficaz desde el ligando al ion lantánido deben cumplirse los siguientes requisitos: 1) las transiciones no radiantes del ligando ( $S_1 \rightarrow S_0$  o  $T_1 \rightarrow T_0$ ) deben ser mínimas; 2) la energía del nivel de resonancia del ion lantánido debe ser ligeramente inferior a la del estado triplete excitado del ligando, de forma que exista una elevada probabilidad de que se produzca la transferencia de energía; y 3) no deben producirse transiciones no radiantes del ion lantánido excitado.

Existen factores, tales como la presencia de agentes sinérgicos, surfactantes, de otros iones lantánidos y átomos pesados, además del pH, que contribuyen a que se cumplan estos requisitos. Por ejemplo, debido al elevado número de coordinación del Tb(III), al formar quelatos con ciertos ligandos existen sitios de coordinación que pueden quedar libres y ser ocupados por moléculas de agua, lo que favorece la inhibición de la luminiscencia debido a procesos de desactivación no radiante. Para evitar este efecto pueden utilizarse agentes sinérgicos, como ligandos aminopolicarboxilatos o el óxido de tri n-octilfosfina (TOPO), que entran a formar parte de la esfera de coordinación del ión lantánido, desplazando a las moléculas de agua. También se pueden utilizar tensoactivos que al

formar las micelas protegen al complejo de procesos de desactivación no radiante [57].

El mecanismo de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos se representa en la Figura 6, donde puede observarse que el ligando orgánico absorbe energía, pasando al estado singlete excitado ( $S_1$ ), de ahí pasa al estado triplete excitado ( $T_1$ ) y, en lugar de emitir fosforescencia, transfiere su energía al ion lantánido, el cual se excita y emite su radiación característica en forma de picos estrechos.



**Figura 6.** Diagrama de niveles de energía de diversos fenómenos fotoluminiscentes, incluyendo la luminiscencia sensibilizada de lantánidos

El uso de la luminiscencia sensibilizada de lantánidos ofrece numerosas ventajas frente a otros sistemas luminiscentes, entre las que cabe destacar:

- \* La buena estabilidad de los iones lantánidos, cuyas disoluciones pueden almacenarse durante un periodo largo de tiempo, así como el carácter relativamente inocuo de los mismos.
- \* La formación de quelatos con compuestos orgánicos muy luminiscentes debido al proceso de transferencia de energía, el cual también da lugar a un gran desplazamiento Stokes, evitando problemas de solapamiento entre las bandas de excitación y emisión como ocurre en ocasiones con los fluoróforos convencionales.
- \* La emisión se produce a larga longitud de onda, eliminando o minimizando interferencias procedentes de la matriz de la muestra, ya que estas suelen emitir a longitudes de onda más cortas.
- \* Se mejora la selectividad espectral, ya que la emisión ocurre a través de los niveles de resonancia del ión lantánido, originando bandas muy estrechas.
- \* También presentan buena selectividad temporal, ya que la duración de la luminiscencia de los complejos formados es relativamente larga.

La luminiscencia sensibilizada se ha utilizado de forma convencional mediante la formación de quelatos a partir de la sal inorgánica y el ligando orgánico. No obstante, en los últimos años, se han obtenido materiales luminiscentes bidimensionales y tridimensionales, tales como los “metal-organic frameworks” (MOFs) [58 – 60], que han despertado un gran interés desde el punto de vista analítico para la detección de iones metálicos [59] y el desarrollo de sensores para medidas de pH [60], entre otras aplicaciones. Cabe destacar que existen otros materiales tridimensionales luminiscentes que presentan luminiscencia anti-Stokes, los “*up-converting phosphors*” (UCP), los cuales emiten en el visible tras excitarlos con radiación infrarroja.

Un caso especial de LWFs utilizados en Química Analítica son los quelatos de rutenio(II), los cuales muestran luminiscencia con una duración ligeramente superior a la de los fluoróforos orgánicos. La principal ventaja que presentan es la posibilidad de usar diferentes ligandos que permiten modificar las propiedades químicas y espectroscópicas de estos complejos, mostrando máximos de emisión, generalmente, entre 610 y 650 nm. La estructura química del quelato utilizado en las investigaciones incluidas en esta Memoria se muestra en la Figura 7. El cloruro de rutenio(II)-tris-(2,2'-bipiridina) absorbe radiación visible a unos 450 nm y la emite alrededor de 610 nm, presentando una banda de emisión relativamente ancha, a diferencia de las bandas estrechas que originan los quelatos de iones lantánidos anteriormente comentados. La duración de su estado excitado depende del disolvente utilizado, siendo de 890 ns en acetonitrilo y 650 ns en agua [61], valores superiores a los de algunos fluoróforos orgánicos, tales como la fluoresceína (3 - 4 ns), pero inferiores a los de algunos quelatos de iones lantánidos, que suelen ser del orden de ms [57].

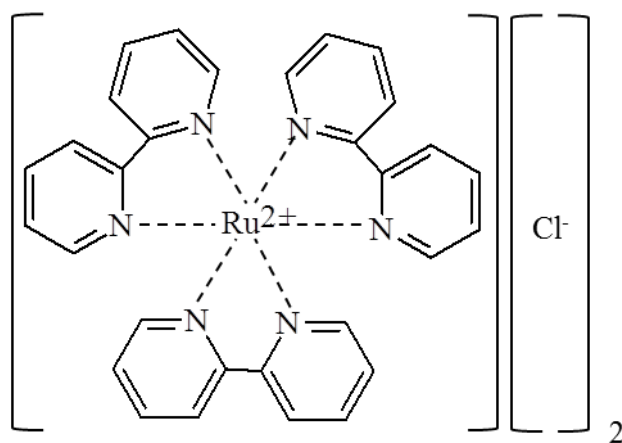


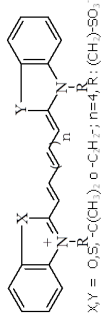
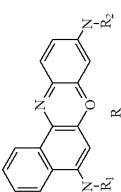
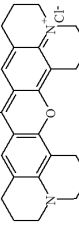
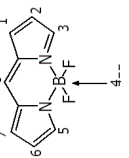
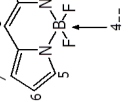
Figura 7. Estructura química del quelato cloruro de rutenio(II)-tris-(2,2'-bipiridina)  $(Ru(bpy)_3)^{2+}$

El uso analítico de los quelatos de rutenio se ha orientado principalmente al desarrollo de sensores [62–66]. En concreto, se han propuesto sensores para la determinación de iones Cu(II) [62] y ácido hipocloroso [63], aunque una de sus aplicaciones más destacadas ha sido su uso como sensores para oxígeno, en los que se mide la inhibición de la fluorescencia del quelato de Ru(II) originada por el oxígeno disuelto en el medio [65, 66].

En lo que se refiere a los LWFs orgánicos, que emiten en la región de baja energía del espectro electromagnético ( $>600$  nm), además de una buena selectividad espectral, presentan otras características, tales como bajo riesgo de degradación de la muestra debido a la baja energía utilizada para la excitación y baja probabilidad de sufrir fenómenos de inhibición ya que presentan un tiempo de vida corto. Estos compuestos orgánicos poseen una estructura rígida, con una serie de enlaces conjugados o anillos aromáticos condensados, y pueden pertenecer a distintas familias, tales como cianinas, oxacinas y rodaminas, entre otros, como se muestra en la Tabla I.

En dicha tabla se incluyen las estructuras químicas básicas de cada familia de compuestos, a excepción de los fluoróforos Atto y Alexa, que tienen estructuras genéricas de oxacinas y cianinas, pero las casas comerciales que los suministran no dan información de sus estructuras concretas. Estos dos grupos de fluoróforos comerciales emiten en el visible y en el IR cercano y, aunque tienen ciertas limitaciones, tales como pequeño desplazamiento Stokes, baja solubilidad, inestabilidad y tendencia a sufrir procesos de oxidación o foto-oxidación, han sido ampliamente utilizados, especialmente en análisis biológico, donde la señal procedente de la matriz de la muestra puede ser una importante fuente de interferencias [56]. Sin duda, una de las aplicaciones más destacadas de los LWFs orgánicos se ha centrado en su uso como aceptores en sistemas basados en transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) [67, 68].

Tabla 1. Principales tipos de fluoróforos de larga longitud de onda

| Familia     | Estructura básica   | Fluoróforo  | Longitud de onda (nm)<br>Excitación | Emisión                         |
|-------------|---|---|-------------------------------------|---------------------------------|
| CIANINAS    |  | Cy3.5<br>Cy5<br>Cy5.5<br>Cy7<br>Verde de Indocianina  | 545<br>646<br>673<br>747<br>780     | 643<br>664<br>692<br>774<br>820 |
| OXACINAS    |  | Violeta de Cresilo<br>Azul Nilo<br>Oxacina 750        | 585<br>620<br>670                   | 624<br>660<br>685               |
| RODAMINAS   |  | Rodamina 800<br>Rojo Texas                            | 680<br>568                          | 700<br>610                      |
| BODIPY      |  | BODIPY TR<br>BODIPY 630/650<br>BODIPY 650/665         | 589<br>625<br>646                   | 617<br>640<br>660               |
| ATTO        |  | ATTO 647<br>ATTO 680<br>ATTO 700                      | 645<br>680<br>700                   | 669<br>700<br>719               |
| ALEXA FLUOR | ---   | Alexa Fluor 647<br>Alexa Fluor 660<br>Alexa Fluor 700 | 650<br>663<br>702                   | 668<br>690<br>723               |

### ***1.2.2 Reacciones de derivatización en cromatografía de líquidos***

El fenómeno de la luminiscencia está limitado a un número relativamente restringido de sistemas, ya que requiere unas características estructurales y ambientales que permitan que los procesos de desactivación no radiantes se ralenticen para que la emisión pueda competir cinéticamente con ellos. Una opción para determinar compuestos que no presentan fluorescencia intrínseca es el uso de reacciones de derivatización que posibiliten la obtención de los niveles adecuados de sensibilidad y selectividad.

La formación de quelatos luminiscentes de iones lantánidos ha sido muy utilizada para la determinación directa de compuestos orgánicos mediante derivatización química en ausencia de separación cromatográfica. A las ventajas anteriormente mencionadas de la luminiscencia sensibilizada, incluyendo la emisión a longitudes de onda relativamente largas, hay que añadir que se trata de una metodología relativamente selectiva ya que solo ciertos compuestos orgánicos transfieren eficientemente la energía a iones lantánidos. Entre sus aplicaciones al análisis agroalimentario se encuentran la determinación de fluoroquinolonas [69–71], tetraciclinas [4, 71–73] y esporas bacterianas y cisteína [74].

Las separaciones cromatográficas permiten mejorar la selectividad de las determinaciones de compuestos orgánicos que presentan fluorescencia nativa, ya que se pueden separar las señales de los analitos de la señal de fondo de la matriz de la muestra. Estas determinaciones siguen siendo de interés en el ámbito agroalimentario como se deduce del número de publicaciones recientes que abordan la determinación de micotoxinas en alimentos, tales como ocratoxina A en vinos [75], ocratoxina A y citrinina en cerveza [76], y de aflatoxinas en zumos de soja [77]. Se ha descrito también la determinación de salicilatos en especias, bebidas, frutas y verduras [78]. Dentro de este grupo de métodos cabe citar la determinación de bisfenol A, octilfenol y nonilfenol en muestras de bebidas, en la que se consiguen límites de detección comprendidos entre 1 y 2,7 ng mL<sup>-1</sup> utilizando disoluciones



estándar, pero que alcanzan valores entre 0,06 y 0,11 ng mL<sup>-1</sup> en las muestras de bebidas tras la introducción de una etapa de extracción en fase sólida [79].

En los métodos cromatográficos que incluyen procesos de derivatización, éstos pueden realizarse antes o después de la separación, dando lugar a:

- Derivatización precolumna, en la que la formación de los derivados tiene lugar fuera del sistema cromatográfico (off-line) o al inyectar la muestra (on-line), encontrándose en este caso el reactivo derivatizante en la fase móvil.
  
- Derivatización postcolumna, la cual se realiza generalmente “on-line” mediante la introducción del reactivo derivatizante en el flujo cromatográfico con uno o varios puntos de confluencia entre la columna y el sistema de detección.

La principal diferencia entre ambas radica en las especies que se separan en la columna cromatográfica, bien los analitos propiamente dichos en el caso postcolumna o bien los productos de la reacción en la modalidad precolumna [80]. Debe tenerse en cuenta que, a menudo, la derivatización conlleva la formación de derivados más voluminosos reduciendo así las diferencias físico-químicas de los analitos en las que se basa la separación cromatográfica, por lo que la alternativa precolumna puede originar una disminución de la resolución cromatográfica. También puede ocurrir que la derivatización de especies de una misma familia conduzca a la formación del mismo derivado, siendo en este caso inviable el proceso precolumna.

Por otro lado, hay que tener presente que las condiciones cromatográficas óptimas pueden ser diferentes a las de la reacción derivatizante. En estos casos, si se utiliza una reacción post-columna, deberá llegarse a una solución de compromiso entre las condiciones experimentales óptimas de ambos procesos, aunque esta

opción más versátil que la modalidad pre-columna “on-line”, es decir, cuando el reactivo derivatizante forma parte de la fase móvil. La alternativa pre-columna “off-line” permite que las condiciones experimentales de ambas etapas sean más independientes, pudiendo utilizar, por ejemplo, valores de pH y temperatura más drásticos para acelerar el proceso de derivatización o para conseguir un mayor rendimiento.

La derivatización pre-columna requiere la formación de derivados estables y bien definidos, por lo que, si no se cumple este requisito, es imprescindible la alternativa post-columna ya que, al realizarse de forma continua, las condiciones hidrodinámicas son constantes y, por tanto, la reproducibilidad suele ser aceptable. Por otra parte, la cinética de formación de los derivados no afecta en gran medida a la derivatización pre-columna, entendiendo ésta como una derivatización discontinua, mientras que la alternativa post-columna necesita cinéticas rápidas.

Aunque la derivatización post-columna requiere un montaje experimental más complejo, presenta ciertas ventajas frente a la derivatización pre-columna ya que se consigue la automatización “on-line” de esta etapa, aumentando normalmente la frecuencia de muestreo. Además, es más adecuada para el análisis de muestras con matrices complejas ya que la derivatización se realiza sobre los analitos separados y no sobre la muestra completa, evitando así posibles interferencias. Sin embargo, el consumo de reactivo derivatizante puede ser un factor limitante en esta modalidad.

La forma más simple de utilizar una reacción de derivatización consiste en el uso de un reactivo que reaccione con algún grupo funcional del analito, como amino, carboxilo o tiol, entre otros, dando lugar a un producto que presente alguna propiedad medible. Entre los reactivos más comunes para formar derivados fluorescentes se encuentran el o-ftalaldialdehído (OPA), la fluorescamina y el cloruro de dansilo [80].

El OPA ha sido ampliamente usado para la derivatización de compuestos que contienen aminas primarias o grupos tiol, debido a que reacciona rápidamente a temperatura ambiente y forma derivados muy fluorescentes [81]. Además, es un reactivo relativamente económico y, generalmente, proporciona una baja señal de fondo, ya que no presenta fluorescencia nativa. Entre sus múltiples aplicaciones destaca su utilización para la determinación de aminoácidos y proteínas [80–84], aunque también ha sido ampliamente usado para la determinación fluorimétrica de otros compuestos orgánicos en matrices alimenticias, biológicas y farmacéuticas [85–89]. Estudios recientes de la reacción de derivatización con OPA han demostrado que la estabilidad de los derivados de aminoácidos es menor cuando contienen grupos “CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>” [81]. Este reactivo puede utilizarse solo o con cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo, el cual se añade para derivatizar también grupos amino secundarios. Esta estrategia ha demostrado su utilidad en la determinación simultánea de aminas y aminoácidos para obtener derivados de prolina e hidroxiprolina [85]. También se ha utilizado para la determinación de antibióticos aminoglucósidos en alimentos [90].

La fluorescamina es un compuesto espiro que reacciona con grupos amino primarios, dando lugar a derivados muy fluorescentes que, generalmente, emiten a 475 nm cuando se excitan a 390 nm. Al igual que el OPA, este compuesto no presenta fluorescencia intrínseca, por lo que no origina señales de fondo intensas. Se ha utilizado bastante como reactivo derivatizante con fines analíticos [91–93], aplicándolo al análisis agroalimentario, por ejemplo, para la determinación de 16 antibióticos sulfonamida en muestras de carne [92].

El cloruro de dansilo es un reactivo que contiene grupos cloruro de sulfonilo y que reacciona con aminas primarias y secundarias [85]. El proceso requiere tiempos de reacción más largos y temperaturas más altas que con OPA, por lo que se suele utilizar en derivatización pre-columna. Otra limitación es su fluorescencia intrínseca por lo que hay que eliminarlo tras la reacción de derivatización. Un

reactivo relacionado es el cloruro de dabsilo, cuyos derivados presentan características similares a los obtenidos con cloruro de dansilo, el cual se ha utilizado recientemente para la derivatización de aminoácidos y aminas biógenas en vinos [94].

Además de los ejemplos indicados sobre la aplicabilidad de estos reactivos derivatizantes al análisis agroalimentario, en la Tabla 2 se muestran métodos en los que se utilizan otros reactivos para la derivatización pre-columna de analitos de interés agroalimentario [95–104]. En ella se incluye información sobre los analitos, el reactivo derivatizante, las condiciones de derivatización, las longitudes de onda de excitación y emisión de los derivados y los límites de detección, así como las muestras analizadas. Como puede observarse, las longitudes de onda son similares a las de los fluoróforos convencionales.

En general, cabe indicar que en las metodologías analíticas más recientes aplicadas al ámbito agroalimentario, y que implican la modalidad post-columna, la mayoría utilizan OPA como reactivo derivatizante [105–110]. Entre las especies determinadas se encuentran amino alcoholes [105], aminas biógenas [106, 107], residuos de plaguicidas [108], mixocotoxinas fumonisina B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> [109], y bases esfingoides procedentes de la hidrólisis de glucosilceramidas [110], y las muestras analizadas son principalmente cereales [106, 108–110].

Tabla 2. Aplicaciones recientes de la CL con derivatización pre-columna y detección luminiscente al análisis de alimentos

| Análisis                              | Reactivo derivatizante   | Condiciones de derivatización                                | $\lambda_{ex}$ , $\lambda_{em}$ (nm) | Límites de detección | Muestras   | Referencia |
|---------------------------------------|--|--|--------------------------------------|----------------------|--|------------|
| 2-alkilciclo-butanonas                | 1-naftilhidracina  | 1-naftilhidracina + CH <sub>3</sub> COOH                     | 270,380                              | 2,5 ng/g grasa       | Músculo de pollo                                       | [95]       |
| Semicarbazida                         | Cloruro de fluorenilmetiloxicarbonilo (1-Fmoc)                       | 1-Fmoc, pH 8, 5 min  | 260,320                              | 0,15 µg/Kg           | Pescado  | [96]       |
| Ácido glicirretínico                  | 2-oxo-benzo[b]-acridine-5(12H)-il-etil-4-tolueno sulfonato (BAETS)   | BAETS + DMF + K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 33 min, 90 °C | 272,505                              | 1,7 ng/mL            | Regaliz, extractos de regaliz                          | [97]       |
| Nitrito                               | 2,3-diaminonaftaleno (DAN)   | Reactivo de Griess + DAN                                     | 375,415                              | 0,0,1 – 0,05 mg/Kg   | Agua<br>Alimentos infantiles<br>Came<br>Yogur<br>Leche | [98]       |
| Promotores del crecimiento en plantas | 2-(11H-benzo[a]-carbazol-11-yl)-etil-4-metilbencenosulfonato (BCETS) | DMF, K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 20 min, 90 °C          | 279,380                              | 0,34 – 0,73 ng/mL    | Melocotón<br>Plátano<br>Manzana<br>Patata<br>Tomate    | [99]       |

**Tabla 2.** Aplicaciones recientes de la CL con derivatización pre-columna y detección luminiscente al análisis de alimentos (cont.)

| Análisis                    | Reactivo derivatizante   | Condiciones de derivatización                                   | $\lambda_{ex}$ , $\lambda_{em}$ (nm) | Límites de detección         | Muestras                              | Referencia |
|-----------------------------|--|---|--------------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|------------|
| Gelatina                    | 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC)                    | AQC, pH 8,2 – 10, 40 min, 90 °C                                 | 250,395                              | ---                          | Tejidos de: Bovino, porcino y pescado | [100]      |
| Lactonas macrocíclicas      | 1-metilimidazol (MI)   | MI, ácido trifluoroacético, trietilamina, 30 min, 70 °C         | 365,470                              | 0,03 – 0,05 $\mu\text{g/Kg}$ | mantequillas                          | [101]      |
| Histamina                   | 2-cloro-4-metoxi-6-(4piren-4-il)butoxi-1,3,5-triacina (CMPT)             | CMPT: DMF, piridina, 20 min, 50 °C, oscuridad                   | 325,475                              | 15 $\mu\text{g/L}$           | Salsa de soja                         | [102]      |
| Ácidos carboxílicos polares | 4-(N,N)-dimetilamino sulfonil-7-piperacina-2, (3benzoxadiazole) (DBD-Pz) | DBD-Pz, 4-(4,6-dimetoxi-1,3,5-triacin-2-il)-4-morfolino, 40 min | 450,560                              | 0,19 – 1,1 $\mu\text{M}$     | Zumos<br>Vino                         | [103]      |
| Metilgloxal<br>Gloxal       | 3,4-diaminopindina   | pH 2, 10 min, 90 °C   | 307,371                              | 0,44 – 7,4 $\mu\text{g/L}$   | Vinos                                 | [104]      |

La luminiscencia sensibilizada ha sido utilizada como sistema de detección en métodos cromatográficos mediante el uso de iones lantánidos como derivatizantes. Aunque se han descrito con anterioridad metodologías pre- y post-columna [57], las aplicaciones más recientes en análisis agroalimentario se han restringido a la modalidad post-columna [42, 43, 111]. Por ejemplo, se han descrito métodos para la determinación de compuestos fenólicos en vino [42], de flavonoides en zumo de naranja [43] y de fluoroquinolonas en leche [111]. Los relativamente bajos límites de detección obtenidos han permitido el análisis directo de las muestras, a diferencia de otros métodos con detección fotométrica, electroquímica o espectrometría de masas. Más recientemente se ha descrito el uso de nanopartículas de óxido de terbio ( $Tb_4O_7$  NPs) como reactivo derivatizante post-columna de quinolonas, con las que forma quelatos luminiscentes, para la determinación mediante cromatografía de líquidos de residuos de estos antibióticos en muestras de leche [112].

Entre otros sistemas de derivatización post-columna cabe citar el uso de  $Mg(II)$  en dimetilformamida para la determinación de tetraciclinas, con las que forma complejos fluorescentes [113]. Aunque las longitudes de onda son las características de los antibióticos tetraciclina, las señales obtenidas fueron más intensas, lo que permitió rebajar los límites de detección.

El uso de los LWFs orgánicos como derivatizantes constituye una alternativa a los fluoróforos convencionales, especialmente cuando no es posible eliminar algún interferente de la matriz de la muestra. En ocasiones, los LWFs pueden ser modificados mediante reacciones redox que posibilitan o mejoran su interacción con los analitos para la formación de derivados luminiscentes. Por ejemplo, se ha desarrollado un método para la determinación de flavonoides en alimentos utilizando violeta de cresilo oxidado como reactivo derivatizante post-columna [114].

La derivatización post-columna sin reactivo, utilizando irradiación fotoquímica del eluyente procedente de la columna, es una opción que ha sido ampliamente

utilizada en análisis agroalimentario en los últimos años. Este proceso se ha utilizado en algunos casos en combinación con una reacción química para acelerar el proceso de derivatización. En el diseño de un reactor fotoquímico se deben tener en cuenta el tipo y diseño de los tubos y la lámpara de irradiación con objeto de evitar pérdidas de eficiencia y sensibilidad en la separación cromatográfica.

En general, puede considerarse que la derivatización fotoquímica ofrece una serie de ventajas con respecto a la derivatización química [115]: 1) los fotones se generan en el momento del análisis mediante el reactor fotoquímico en condiciones controladas, por lo que no se necesita un reactivo, su almacenamiento o la eliminación del exceso del mismo; 2) los fotones pueden liberarse a varias intensidades y longitudes de onda para mejorar la cinética de la reacción y la eficacia; 3) no se necesita una bomba adicional; y 4) los analitos mantienen su estructura original durante la separación, originándose los derivados después de la irradiación. Por tanto, esta modalidad requiere una instrumentación más simple que la derivatización química ya que sólo se utiliza la bomba de alta presión del cromatógrafo [80]. Algunos ejemplos de su aplicación en análisis agroalimentario han sido la determinación de aflatoxinas en harinas de cereales [116], resveratrol en vinos [117], antibióticos sulfamidas en músculo y huevos [118] y aflatoxinas, ocratoxina A y zearalenona en pimienta molida [119]. Por ejemplo, la irradiación con luz UV de disoluciones alcohólicas de trans-resveratrol origina su isómero c, débilmente fluorescente, que evoluciona rápidamente hacia la formación de compuestos muy fluorescentes [117].

### **1.3 NANOMATERIALES EN QUÍMICA ANALÍTICA**

La Nanociencia y la Nanotecnología se basan en la manipulación de átomos y moléculas para producir materiales a escala sub-microscópica y en el conocimiento de sus propiedades físicas, químicas y biológicas [120]. Los nanomateriales son estructuras que se caracterizan por tener al menos una de sus tres dimensiones dentro de la denominada "nanoescala", comprendida entre 1 y 100 nm. El interés de



las nanoestructuras radica en dos aspectos principales: la elevada relación superficie/volumen y la distinta reactividad química que presentan en comparación con la materia a micro y macroescala, ofreciendo unas propiedades químicas, eléctricas, ópticas, mecánicas, térmicas y magnéticas únicas [121].

Los nanomateriales pueden encontrarse formando distintas estructuras, tales como nanocristales, nanofibras, nanotubos, nanopartículas, nanoalambres o como materiales nanoporosos. Para la síntesis de estas nanoestructuras existen diferentes métodos, entre los que se encuentran métodos físicos (como los basados en técnicas de deposición o pirólisis), métodos químicos (tales como técnicas de microemulsión o síntesis hidrotérmal) y métodos biológicos (como biogénesis asistida por microorganismos o extractos de plantas) [122]. La amplia disponibilidad de métodos reproducibles, tanto de síntesis como de caracterización, ha dado lugar a una gran diversidad de nanomateriales que presentan una extensa gama de propiedades, lo que permite su uso en muy diversos campos de aplicación, tales como química, física, ciencia de los materiales, biología, medicina y electrónica, entre otros [123].

La clasificación de los nanomateriales pueden realizarse en base a diferentes criterios: origen, homogeneidad, naturaleza química y dimensiones, siendo los dos últimos, probablemente, los de mayor interés. Atendiendo a sus dimensiones, los nanomateriales se clasifican en 1D, 2D, o 3D, según el número de dimensiones que posean por debajo de 100 nm (Tabla 3) [120]. Así, por ejemplo, las nanopartículas son nanomateriales 3D, mientras que las nanofibras y los nanotubos son nanomateriales 2D.

En función de su naturaleza, los nanomateriales pueden ser orgánicos, inorgánicos o mixtos. Dentro de los nanomateriales orgánicos cabe destacar las nanoestructuras de carbono, como nanotubos, grafeno y fullerenos, ampliamente usados en Química Analítica [124 – 126]. Otros tipos de nanomateriales orgánicos

son los agregados supramoleculares (liposomas, nanomicelas, nanovesículas) y los nanomateriales poliméricos, como los polímeros de impresión molecular (MIPs), que presentan sitios de reconocimiento específicos para la molécula utilizada como molde durante su síntesis, proporcionando una alternativa a los receptores biológicos convencionales [127].

**Tabla 3.** Dimensiones típicas de algunas nanoestructuras

| <b>Nanoestructura</b>                                 | <b>Dimensión, tamaño (nm)</b>           | <b>Material</b>   |
|---|---|---|
| Nanocristales, puntos cuánticos, otras nanopartículas | Radio, 1 – 10 nm                        | Aislantes, semiconductores, materiales metálicos magnéticos, óxidos cerámicos |
| Nanobiomateriales                                     | Radio, 5 – 10 nm                        | Proteínas de membrana   |
| Nanohilos   | Diámetro, 1 – 100 nm                    | Metales, semiconductores, óxidos, sulfuros, nitruros                          |
| Nanotubos   | Diámetro, 1 – 100 nm                    | Carbono, calcogenuros   |
| Nanobarras biológicas                                 | Diámetro, 5 nm                          | ADN   |
| Superficies y películas delgadas                      | Espesor, 1 – 1000 nm                    | Aislantes, semiconductores, metales, ADN                                      |
| Arrays 2-D  | Área, nm <sup>2</sup> - μm <sup>2</sup> | Metales, semiconductores, materiales magnéticos                               |
| Entramados 3-D /nanopartículas                        | Radio, varios nm                        | Metales, semiconductores, materiales magnéticos                               |

Entre los materiales nanoestructurados de naturaleza inorgánica se encuentran las nanopartículas metálicas y de óxidos metálicos, de las que pueden destacarse las nanopartículas de oro, por sus múltiples aplicaciones debido a su actividad catalítica [128] y sus propiedades ópticas [129], las nanopartículas de plata, por su utilización como sustrato en espectroscopía Raman amplificada en superficie

(SERS) [130] y las nanopartículas magnéticas, generalmente constituidas por óxidos de hierro, que han demostrado su utilidad para la extracción y preconcentración de analitos [131]. Existen otros tipos de nanomateriales inorgánicos ampliamente utilizados con fines analíticos o bioanalíticos, como los quantum dots (QDs), usados en el diseño de sensores debido a sus propiedades ópticas y eléctricas [132], y las nanopartículas de sílice, empleadas en inmunoensayos [133] y biosensores [134], así como para el encapsulamiento de moléculas [135].

Hay que destacar también el creciente interés por los nanomateriales híbridos, formados por dos o más tipos de nanocomponentes individuales [136]. Además, el avance en procedimientos para la funcionalización de la superficie de los nanomateriales ha contribuido a ampliar su aplicabilidad, convirtiéndolos en una herramienta muy versátil [137].

El interés que tienen los nanomateriales en Química Analítica, atendiendo a su función, se ha redefinido recientemente considerando tres facetas distintas [138]: 1) como analitos, 2) como herramientas analíticas y 3) como analitos y como herramientas dentro de un mismo proceso analítico. En el primer caso, los analitos se pueden caracterizar y/o determinar en una amplia variedad de muestras donde la información analítica obtenida es un importante apoyo para el desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología. Estos estudios analíticos suponen alrededor del 30 – 35% de los totales realizados en este ámbito. En la segunda definición, los nanomateriales pueden tener distintas funciones como sorbentes, fases estacionarias y pseudo-estacionarias, marcadores fluorescentes o conductores eléctricos, entre otras. Este concepto se encuentra más desarrollando, abarcando el 65 – 70% de las publicaciones en Nanociencia y Nanotecnología analíticas. El empleo de nanomateriales como herramientas analíticas ha dado lugar al establecimiento de nuevas metodologías de análisis y a la mejora de otros métodos y técnicas ya existentes en términos de sensibilidad, selectividad, precisión y velocidad de muestreo. La tercera faceta, propuesta muy recientemente, tiene como objetivo el

desarrollo de nuevas metodologías para la extracción de información analítica útil mediante la investigación de sinergias entre las propiedades de los nanomateriales para actuar conjuntamente como analitos y como herramientas analíticas.

Respecto al desarrollo de nuevas metodologías, diversos nanomateriales han sido utilizados como marcadores y soportes para proponer nuevos métodos de inmunoensayo e inmunosensores [139], metodologías “high-throughput” en bioanálisis [140] y para el desarrollo de nuevos sensores con detección óptica y electroquímica [134]. Asimismo, los nanomateriales también han contribuido a la miniaturización de técnicas mediante el desarrollo de nuevas metodologías basadas en sistemas microfluídicos o sistemas “lab-on-chip” [141].

Por otra parte, la utilización de nanomateriales como herramientas analíticas para la innovación o mejora de procesos analíticos ha abarcado todas las etapas de estos procesos, siendo la de tratamiento de muestra la más beneficiada hasta la fecha. Esta etapa puede considerarse el cuello de botella de un análisis, ya que se trata, generalmente, de procesos lentos, que presentan bajos rendimientos, propensos en ocasiones a introducir contaminación y suelen ser más difíciles de automatizar que otras etapas. Para paliar estas limitaciones se han realizado diversos estudios de la utilidad de los nanomateriales como potenciales sorbentes en técnicas de extracción [142 – 144]. En el Capítulo III de esta Memoria se analiza con más profundidad, a través de una revisión bibliográfica, la evolución experimentada por las técnicas de extracción que incorporan nanomateriales como herramientas analíticas. Técnicas como la extracción en fase sólida (SPE) y la microextracción en fase sólida (SPME) han avanzado notablemente en lo referente a su miniaturización y mecanismos de retención sobre las fibras, respectivamente, mediante el uso de nanomateriales. En cuanto a su utilización como fases estacionarias o pseudoestacionarias, los nanomateriales aportan un aumento del área de la superficie específica, buena estabilidad térmica y facilidad de modificación de su superficie, lo

que se traduce en mejoras en la separación con respecto a resolución, selectividad y eficacia.

La etapa de detección del proceso químico también se ha beneficiado del uso de nanomateriales para mejorar principalmente la detección óptica y electroquímica utilizándolos como amplificadores de la señal en procesos analíticos y bioanalíticos [145]. En la detección electroquímica, los nanomateriales se han utilizado para modificar la superficie de los electrodos, favoreciendo los procesos de electrocatálisis e incrementado la superficie efectiva del electrodo [146]. También se ha demostrado la utilidad de los nanomateriales como reactivos derivatizantes, aprovechando propiedades como la agregación inducida por determinados analitos de nanopartículas metálicas o su efecto catalítico en sistemas quimioluminiscentes. En el Capítulo II de esta Memoria se comentan los antecedentes del uso de nanomateriales de óxidos metálicos como reactivos analíticos y se incluye un estudio sistemático de su comportamiento y la propuesta de nuevas metodologías analíticas aplicadas al análisis agroalimentario.

Para finalizar este apartado sobre el uso de nanomateriales en Química Analítica se ha considerado conveniente comentar algunos aspectos de las implicaciones que puede tener el desarrollo de la Nanociencia y Nanotecnología sobre la sociedad [147, 148]. Se ha descrito recientemente que este desarrollo puede ir acompañado de una serie de implicaciones sociales, tales como ecotoxicidad, nanotoxicidad e, incluso, posible violación de la privacidad, cuyo alcance se desconoce en la actualidad [147]. El uso generalizado de nanomateriales puede afectar al medio ambiente y a la salud humana, mientras que el desarrollo de nanosensores para utilizarlos con fines de seguridad pública puede entrar en conflicto con el derecho personal a la intimidad y privacidad. Puede considerarse que la Nanociencia y la Nanotecnología analíticas han alcanzado una etapa de madurez, tras su gran desarrollo inicial, por lo que es necesario avanzar en el estudio de su impacto sobre el medio ambiente y la salud humana y establecer las normas que regulen el

uso de nanosensores. Se ha propuesto la creación de equipos asesores que puedan analizar y proponer opiniones científicas consensuadas sobre estos aspectos [148].

El uso de nanomateriales en la industria alimentaria ha sido objeto de revisión puesto que existen diversos ámbitos en los que inciden, tales como en agricultura, nutrición, mejora de procesos de fabricación o conservación y análisis del producto acabado [149]. En esta revisión se pone de manifiesto la necesidad de examinar en profundidad el uso de la Nanotecnología y los beneficios que incorpora, demandando el análisis de los productos nanomodificados antes de su puesta en circulación en el mercado.

#### ***1.4 REFERENCIAS NORMATIVAS EN ANÁLISIS AGROALIMENTARIO***

En esta sección se abordan algunos aspectos de la normativa que regula la presencia de sustancias farmacológicamente activas en muestras de interés agroalimentario. Los métodos analíticos desarrollados deben responder a las exigencias de la legislación en cuanto a las concentraciones máximas en las que se pueden encontrar estos productos en los alimentos. Se define el concepto de Límite Máximo de Residuo (LMR) y se incluyen los valores actualmente aprobados por la legislación europea para los analitos que han sido objeto de estudio en esta Memoria.

La administración de fármacos a animales destinados al consumo humano es una práctica habitual para prevenir enfermedades infecciosas. También se han utilizado con fines fraudulentos para mejorar la producción, debido a que algunos de estos compuestos son promotores del crecimiento. La forma de administración de los fármacos varía en función de la especie animal que debe tratarse. En general, los animales de gran tamaño son medicados mediante píldoras o soluciones inyectables, mientras que para animales más pequeños, como las aves de corral, los fármacos suelen administrarse disueltos en el agua de bebida o como pre-mezcla para piensos [150].

Tras la administración del fármaco a un animal tiene lugar un proceso de metabolización que favorece la eliminación del mismo, por lo que es necesario establecer el intervalo de tiempo que debe transcurrir desde la administración del medicamento hasta que puedan recogerse sus productos, como leche o huevos, o sacrificar al animal para consumir su carne, con objeto de que su comercialización no constituya un riesgo para el consumidor. Este periodo de tiempo se determina en función del perfil cinético de eliminación del fármaco y/o sus metabolitos en el animal.

Los residuos de un fármaco veterinario son generalmente sustancias farmacológicamente activas, ya sean los principios activos, excipientes, sus productos de degradación o sus metabolitos, que pueden encontrarse en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales tratados con el medicamento si no se ha respetado el tiempo de espera anteriormente indicado. Estos residuos pueden incorporarse al organismo humano a través de la cadena alimentaria, lo que constituye un riesgo para el consumidor. La localización de estos residuos puede ser variable. Generalmente, los tejidos muscular y adiposo son los lugares más frecuentes, aunque también pueden encontrarse en órganos como el riñón o el hígado. La toxicidad de estos residuos también varía, pudiendo ser inocuos o provocar ciertas patologías o reacciones alérgicas. Por ejemplo, los alimentos procedentes de animales tratados terapéuticamente con agentes antimicrobianos pueden contener residuos que provoquen un aumento de la resistencia bacteriana en el consumidor.

La legislación Comunitaria establece que cualquier sustancia farmacológicamente activa empleada como medicamento en prácticas veterinarias sea evaluada exhaustivamente antes de su autorización en base a criterios de calidad, seguridad y eficacia. Con este fin se define el término LMR que es la concentración máxima permitida de un principio activo en alimentos de origen animal, ya sea músculo, hígado, riñón, grasa, leche, huevos y miel, que al ser ingerido por el ser

humano no constituye ningún riesgo para su salud. Durante este proceso de evaluación se establece el tiempo de espera y los LMRs del compuesto permitidos tanto en los tejidos como en los productos comestibles de los animales destinados al consumo humano. El establecimiento de los LMRs se realiza para cada especie animal y para cada tejido en función del tipo y la cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana, teniendo en cuenta la dosis diaria admisible (DDA), o en base a la DDA temporal utilizando un factor de seguridad adicional. Asimismo, se tienen en cuenta otros riesgos relativos a la salud pública y aspectos relacionados con la tecnología alimentaria [151].

Los LMRs de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal fueron establecidos por primera vez en España mediante el Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo de las Comunidades Europeas del 26 de Junio de 1990, el cual fue posteriormente corregido y modificado hasta quedar finalmente derogado por el Reglamento (CE) No 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea [152]. En este último se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. Este Reglamento clasifica las sustancias farmacológicamente activas mediante 4 anexos, en los que se indican las sustancias para las que se ha establecido un LMR de forma definitiva (anexo I), las que debido a su inocuidad no están sujetas a un valor de LMR (anexo II), las sustancias farmacológicamente activas para las que se ha establecido un LMR de forma temporal (anexo III) y las sustancias prohibidas para las cuales, debido a su toxicidad, no se puede establecer un LMR y, por tanto, no pueden ser usadas en animales destinados al consumo humano (anexo IV). Queda terminantemente prohibido, en cualquier estado miembro, la administración de fármacos veterinarios a animales destinados al consumo humano si la Comunidad previamente no los ha



evaluado y autorizado, así como la administración de sustancias incluidas en el anexo IV del Reglamento 2377/90. En la Tabla 4 se muestran los LMR de los agentes antimicrobianos usados como analitos a lo largo de esta Tesis Doctoral, tomados del Reglamento (UE) No 37/2010 [153].

**Tabla 4.** Límites máximos de residuo de antibióticos en diversos productos de origen animal

| <b>Sustancia farmacológicamente activa</b>  | <b>Especie animal</b>   | <b>LMR (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b> | <b>Tejido diana</b> |  |
|---|---|--|---------------------|--|
| <b>Ionóforos</b><br><i>Lasalocid</i>        | <i>Aves de corral</i>   | 20                                       | <i>Músculo</i>      |  |
|   |   | 100                                      | <i>Piel y grasa</i> |  |
|   |   | 100                                      | <i>Hígado</i>       |  |
|   |   | 50                                       | <i>Riñón</i>        |  |
|   |   | 150                                      | <i>Huevos</i>       |  |
| <b>Quinolonas</b><br><i>Ácido oxolínico</i> | <i>Todas las especies destinadas a la producción de alimentos</i> | 100                                      | <i>Músculo</i>      |  |
|   |   | 50                                       | <i>Grasa</i>        |  |
|   |   | 150                                      | <i>Hígado</i>       |  |
|   |   | 150                                      | <i>Riñón</i>        |  |
| <i>Flumequina</i>                           | <i>Bovinos, ovinos, caprinos y porcinos</i>                       | 200                                      | <i>Músculo</i>      |  |
|   |   | 300                                      | <i>Grasa</i>        |  |
|   |   | 500                                      | <i>Hígado</i>       |  |
|   |   | 500                                      | <i>Riñón</i>        |  |
|   |   | <i>Bovinos, ovinos y caprinos</i>        | 50                  | <i>Leche</i>                                   |
|   |   | <i>Aves de corral</i>                    | 400                 | <i>Músculo</i>                                 |
|   | 250   |  | <i>Piel y grasa</i> |  |
|   | 800   |  | <i>Hígado</i>       |  |
|   | 1000  |  | <i>Riñón</i>        |  |
|   |   | <i>Peces</i>                             | 600                 | <i>Músculo y piel en proporciones normales</i> |
|   | <i>Otras de especies destinadas a la producción de alimentos</i>  | 200                                      | <i>Músculo</i>      |  |
| 250   |   | <i>Grasa</i>                             |                     |  |
| 500   |   | <i>Hígado</i>                            |                     |  |
| 1000  |   | <i>Riñón</i>                             |                     |  |

**Tabla 4.** Límites máximos de residuo de antibióticos en diversos productos de origen animal (cont.)

| <b>Sustancia farmacológicamente activa</b>       | <b>Especie animal</b>                                      | <b>LMR (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>)</b> | <b>Tejido diana</b> |
|--|--|---|---------------------|
| <b>Penicilinas</b>                               |  |   |                     |
| Amoxicilina, Ampicilina y bencilpenicilina       | Todas las especies destinadas a la producción de alimentos | 50  | Músculo             |
|  |  | 50  | Grasa               |
|  |  | 50  | Hígado              |
|  |  | 4   | Riñón<br>Leche      |
| Cloxacilina, Nafcilina y Oxacilina               | Todas las especies destinadas a la producción de alimentos | 300   | Músculo             |
|  |  | 300   | Grasa               |
|  |  | 300   | Hígado              |
|  |  | 300   | Riñón               |
|  |  | 30  | Leche               |
| <b>Tetraciclinas</b>                             |  |   |                     |
| Clortetraciclina, Oxitetraciclina y Tetraciclina | Todas las especies destinadas a la producción de alimentos | 100   | Músculo             |
|  |  | 300   | Hígado              |
|  |  | 600   | Riñón               |
|  |  | 100   | Leche               |
|  |  | 200   | Huevos              |

Dentro del marco legal en el que se encuadra el control de la calidad y la seguridad agroalimentaria, cabe destacar que existen planes nacionales de control oficial, tales como el Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR) o el Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PNCOCA) [154]. El PNIR tiene como objetivo la investigación de la presencia de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, mediante tres funciones principales: 1) detectar cualquier tratamiento ilegal medicamentoso en animales, 2) comprobar que los residuos de los fármacos veterinarios cumplen con los LMR fijados y 3) examinar y desvelar las razones de la presencia de residuos en alimentos de origen animal. El Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR) fue aprobado en España mediante el Real Decreto 1749/1998, por el que se establecen las medidas

de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, y que deroga el RD 1262/1989.

El PNCOCA describe los sistemas de control oficial a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde la producción primaria hasta los puntos de venta al consumidor final, realizados en España. Este Plan está regido por el Reglamento (CE) nº 882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, del 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre sanidad animal y bienestar de los animales.

Las muestras biológicas utilizadas para el control de residuos en animales destinados al consumo humano, tales como leche, huevos, hígado, tejido muscular, etc, pueden contener concentraciones de las especies químicas de interés a niveles muy bajos, del orden de  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , y gran cantidad de potenciales interferentes que dificultan la detección de estos residuos, por lo que la necesidad de métodos analíticos muy sensibles y selectivos para el control de la calidad agroalimentaria es innegable. Es en esta área, donde se ha pretendido que los resultados de la presente Tesis Doctoral realicen su aportación.

**REFERENCIAS**

- [1] E. Trullols, I. Ruisánchez, F.X. Ruis, Validation of qualitative analytical methods, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 137–145.
- [2] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, Sample screening systems in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685–694.
- [3] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, Modern analytical approaches to high-throughput drug discovery, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 171–182.
- [4] L. Aguilar-Vázquez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Development of an automatic high-throughput assay for tetracycline determination by using  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  nanoparticles and dry-reagent technology, *Talanta*, 119 (2014) 111–115.
- [5] V. Perumal, A. Hashim, Advances in biosensors: Principle, architecture and applications, *J. Appl. Biomed.* 12 (2014) 1–15.
- [6] R. Sharma, K.V. Ragavan, M.S. Thakur, K.S.M.S. Raghavarao, Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants, *Biosen. Bioelectron.* 74 (2015) 612–627.
- [7] Q. Liu, J. Wang, B.J. Boyd, Peptide-based biosensors, *Talanta* 136 (2015) 114–127.
- [8] E.B. Bahadır, M.K. Sezgintürk, Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and bioterror/biothreat/biowarfare analyses, *Anal. Biochem.* 478 (2015) 107–120.
- [9] A.M. Pisoschi, A. Pop, A.I. Serban, C. Fafaneata, Electrochemical methods for ascorbic acid determination, *Electrochim. Acta*, 121 (2014) 443 – 460.

- [10] A.L. Galant, R.C. Kaufman, J.D. Wilson, Glucose: detection and analysis, *Food Chem.* 188 (2015) 149–160.
- [11] S.C.B. Gopinath, T.H. Tang, Y. Chen, M. Citartan, T. Lakshmipriya, Bacterial detection: from microscope to smartphone, *Biosens. Bioelectron.* 60 (2014) 332–342.
- [12] A.P. Das, P.S. Kumar, S. Swain, Recent advances in biosensor-based endotoxin detection, *Biosens. Bioelectron.* 51 (2014) 62–75.
- [13] A. Mortari, L. Lorenzelli, Recent sensing techniques for pathogen detection in milk: a review, *Biosens. Bioelectron.* 60 (2014) 8 – 21.
- [14] K.V. Ragavan, N.K. Rastogi, M.S. Thakur, Sensors and Biosensors for analysis of bisphenol A, *Trends Anal. Chem.* 52 (2013) 248 – 260.
- [15] R. Sharma, K.V. Ragavan, M.S. Thakur, K.S.M.S. Raghavarao, Recent advances in nanoparticle based aptasensors for food contaminants, *Biosens. Bioelectron.* 74 (2015) 612 – 627.
- [16] R. Chauhan, J. Singh, T. Sachdev, T. Basu, B.D. Malhotra, Recent advances in mycotoxins detection, *Biosens. Bioelectron.* 81 (2016) 532 – 545.
- [17] S. Banerjee, C. Kelly, J.F. Kerry, D.B. Papovsky, High throughput non-destructive assessment of quality and safety of packaged food products using phosphorescent oxygen sensors, *Trends Food Sci. Technol.* 50 (2016) 85–102.
- [18] M. Gumustas, S. Kurbanoglu, B. Uslu, S.A. Ozkan, UPLC versus HPLC on drug analysis: Advantageous, applications and their validation parameters, *Chromatographia* 76 (2013) 1365-1427.

- [19] M.E. Swartz, UPLC™: An introduction and review, *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 28 (2005) 1253-1263.
- [20] M.W. Dong, K. Zhang, Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 21–30.
- [21] R. Hayes, A. Ahmeda, T. Edge, H. Zhang, Core–shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 36–52.
- [22] T.H.Walter, R.W. Andrews, Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 14 – 20.
- [23] A.C. Sanchez, G. Friedlander, S. Fekete, J. Anspach, D. Guillarme, M. Chitty, et al., Pushing the performance limits of reversed-phase ultra high performance liquid chromatography with 1.3  $\mu\text{m}$  core-shell particles, *J. Chromatogr. A* 1311 (2013) 90 – 97.
- [24] K. Broeckhoven, G. Desmet, The future of UHPLC: Towards higher pressure and/or smaller particles, *Trends Anal. Chem.* 63 (2014) 65 – 75.
- [25] J.J. van Deemter, F.J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, Longitudinal diffusion and resistance to mass transfer as causes of nonideality in chromatography, *Chem. Eng. Sci.* 5 (1956) 271-289.
- [26] D.V. McCalley, Shell particles and UHPLC technologies for fast analysis of polar compounds in the HILIC mode, in: D. Guillarme, J.L. Veuthey (Editors), *UHPLC in Life Sciences*, No. 16, RSC Chromatography monographs, Cambridge, UK, 2012, pp. 164–185.
- [27] D. Kottoni, A. Ciogli, C. Molinaro, I. D'Acquarica, J. Kocergin, T. Szczerba, et al., Introducing enantioselective Ultrahigh-Pressure Liquid Chromatography

- (eUHPLC): theoretical inspections and ultrafast separations on a new sub-2- $\mu\text{m}$  Whelk-O1 stationary phase, *Anal. Chem.* 84 (2012) 6805–6813.
- [28] M. Janco, J.N. Alexander IV, E.S.P. Bouvier, D. Morrison, Ultra-high performance size-exclusion chromatography of synthetic polymers, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 2718–2727.
- [29] J.C. Rea, Y.J. Wang, T. Zhang, UHPLC for characterization of protein therapeutics, in: Q.A. Xu (Editor), *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2013, pp. 235–252.
- [30] E.S.P. Bouvier, S.M. Koza, Advances in size-exclusion separations of proteins and polymers by UHPLC, *Trends Anal. Chem.* 36 (2014) 85–94.
- [31] U.D. Neue, M. Kele, B. Bunner, A. Kromidas, T. Dourdeville, J.R. Mazzeo, et al., Ultra-Performance liquid chromatography technology and applications, *Adv. Chromatogr.* 48 (2009) 99–104.
- [32] S. Fekete, M.W. Dong, T. Zhang, D. Guillarme, High resolution reversed phase analysis of recombinant monoclonal antibodies by ultra-high pressure liquid chromatography column coupling, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 83 (2013) 273–278.
- [33] J.O. Omamogho, J.P. Hanrahan, J. Tobin, J.D. Glennon, Structural variation of solid core and thickness of porous shell of 1.7  $\mu\text{m}$  core-shell silica particles on chromatographic performance: narrow bore columns, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1942–1953.
- [34] P. Jandera, Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 37–53.

- [35] O. Núñez, H. Gallart-Ayala, C.P.B. Martins, P. Lucci, New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis, *J. Chromatogr. A* 1228 (2012) 298 – 323.
- [36] L. Geis-Asteggiante, S.J. Lehotay, A.R. Lightfield, T. Dutko, C. Ng, L. Bluhm, Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1258 (2012) 43 – 54.
- [37] M. Rodríguez-Aller, R. Gurny, J.L. Veuthey, D. Guillarme, Coupling ultra-high pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible application, *J. Chromatogr. A* 1292 (2013) 2 – 18.
- [38] C.L. Chitescu, E. Oosterink, J. De Jong, A.A.M. Stolker, Ultrasonic or accelerated solvent extraction followed by U-HPLC-high mass accuracy MS for screening of pharmaceuticals and fungicides in soil and plant samples, *Talanta* 88 (2012) 653 – 662.
- [39] M.L. Gómez-Pérez, R. Romero-González, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, Analysis of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to Orbitrap high resolution mass spectrometry, *Talanta* 131 (2015) 1 – 7.
- [40] R. Barcellos-Hoff, G. Rübensam, L. Jank, F. Barreto, M.C. Ruaro-Peralba, T. Mara-Pizzolato, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Analytical quality assurance in veterinary drug residue analysis methods: matrix effects determination and monitoring for sulfonamides analysis, *Talanta* 132 (2015) 443 – 450.
- [41] S. Mompelat, M.P. Fourmond, M. Laurentie, E. Verdon, D. Hurtaud-Pessel, J.P. Abjean, Validation of a liquid chromatography-high resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys



- and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix, *J. Chromatogr. A* 1407 (2015) 119 – 129.
- [42] P. Russo, A. Andreu-Navarro, M.P. Aguilar-Caballo, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Analytical Innovations in the detection of phenolics in wines, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 1858 – 1865.
- [43] A. Andreu-Navarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Luminescent determination of flavonoids in orange juices by LC with post-column derivatization with aluminum and terbium, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 509 – 515.
- [44] S. Apers, T. Naessens, K. Van Den Steen, F. Cuyckens, M. Claeys, L. Pieters, A. Vlietinck, Fast high-performance liquid chromatography method for quality control of soy extracts, *J. Chromatogr. A*, 1038 (2004) 107 – 112.
- [45] M. Rostagno, M. Palma, C.G. Barroso, Fast analysis of soy isoflavones by high-performance liquid chromatography with monolithic columns, *Anal.Chim. Acta* 582 (2007) 243.
- [46] P. Arapitsas, C. Turner, Pressurized solvent extraction and monolithic column-HPLC/DAD analysis of anthocyanins in red cabbage, *Talanta* 74 (2008) 1218 – 1223.
- [47] M. Biesaga, U. Ochnik, K. Pyrzynska, Analysis of phenolic acids in fruits by HPLC with monolithic columns, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2929 – 2934.
- [48] P.D. Tzanavaras, D.G. Themelis, Development and validation of a high-throughput HPLC assay for the determination of caffeine in food samples using a monolithic column, *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) 89 – 94.
- [49] P.D. Tzanavaras, C.K. Zacharis, D.G. Themelis, Rapid determination of methylxanthines in real samples by high performance liquid chromatography

- using the new FastGradient® narrow-bore monolithic column, *Talanta* 81 (2010) 1494 - 1501.
- [50] P. Viñas, N. Campillo, L. Carrasco, M. Hernández-Cordoba, Analysis of nitrofurán residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection, *Chromatographia* 65 (2007) 85 – 89.
- [51] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, Application of ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion extraction to the HPLC confirmatory determination of cephalosporin residues in milk, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 2862 – 2871.
- [52] P. Ramírez-Palomino, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Rapid chromatographic determination of caseins in milk with photometric and fluorimetric detection using a hydrophobic monolithic column, *Food Chem.* 142 (2014) 249 – 254.
- [53] W.S. Khayoon, B. Saad, T. P. Lee, B. Salleh, High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column, *Food Chem.* 133 (2012) 489 – 496.
- [54] G. Pierri, D. Kottoni, P. Simone, C. Villani, G. Pepe, P. Campiglia, P. Dugo, F. Gasparrini, Analysis of bovine milk caseins on organic monolithic columns: An integrated capillary liquid chromatography–high resolution mass spectrometry approach for the study of time-dependent casein degradation, *J. Chromatogr. A* 1313 (2013) 259 – 269.
- [55] Z.A. Al-Othman, A. Aqel, M.K.E. Alharbi, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, A.A. Al-Warthan, Fast chromatographic determination of caffeine in food using a capillary hexyl methacrylate monolithic column, *Food Chemistry* 132 (2012) 2217 – 2223.

- [56] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballo, Long-wavelength fluorophores: new trend in their analytical use. *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 127–136.
- [57] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballo, Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 131–141.
- [58] C. Liu, B. Yan. Photofunctional nanocomposites based on the functionalization of metalorganic frameworks by up/down conversion luminescent nanophosphors, *New J. Chem.* 39 (2015) 1125 – 1131.
- [59] L.H. Cao, F. Shi, W.M. Zhang, S.Q. Zang, T.C.W. Mak, T.C.W. Selective sensing of Fe<sup>3+</sup> and Al<sup>3+</sup> ions and detection of 2,4,6-trinitrophenol by a water stable terbium based metal organic framework. *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 15705 – 15712.
- [60] H.Y. Li, Y.L. Wei, X.Y. Dong, S.Q. Zang, T.C.W. Mak, Novel Tb-MOF embedded with viologen species for multiphotofunctionality: Photochromism, photomodulated fluorescence, and luminescent pH sensing, *Chem. Mater.* 27 (2015) 1327 – 1331.
- [61] M. Montalti, A. Cedi; L. Prodi; M.T. Handbook of Photochemistry 3rd Ed.. CRC press Taylor & Francis Group. (2006) pp. 379–404.
- [62] Y. Zhang, Z. Liu, Y. Zhang, Y. Xu, H. Li, C. Wang, A. Lu, S. Sun, A reversible and selective luminescent probe for Cu<sup>2+</sup> detection based on a ruthenium(II) complex in aqueous solution, *Sensors Actuat. B: Chem.* 211 (2015) 449–455.
- [63] L. Cao, R. Zhang, W. Zhang, Z. Du, C. Liu, Z. Ye, B. Song, J. Yuan, A ruthenium(II) complex-based lysosome-targetable multisignal chemosensor for in vivo detection of hypochlorous acid, *Biomater.* 68 (2015) 21–31.

- [64] E.A. Khudaish, M.M. Al-Hinaai, S.H. Al-Harhi, A solid-state sensor based on tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) / poly-(4-amino diphenylamine) modified electrode: Characterization and applications, *Sensors Actuat. B: Chem.* 185 (2013) 478–487.
- [65] Y. Xiong, J. Tan, C. Wang, Y. Zhu, S. Fang, J. Wu, Q. Wang, M. Duan. A miniaturized oxygen sensor integrated on fiber surface based on evanescent-wave induced fluorescence quenching. *J. Luminesc.* 179 (2016) 581 – 587.
- [66] L. Tang, Z. Qi, M. Hong, N. Li, W. Shen, F. Yang, X. Ji, A. Hu. Comparison study of oxygen quenching of Ru (II) phenanthroline complexes with different functional groups, *Acta Chim. Sinica*, 70 (2012) 1081 – 1087.
- [67] E.M. Conroy, J.J. Li, H. Kim, W.R. Algar. Self-Quenching, Dimerization, and Homo-FRET in Hetero-FRET Assemblies with Quantum Dot Donors and Multiple Dye Acceptors. *J. Phys. Chem. C*, 120 (2016) 17817 -17828.
- [68] J.J. Li, W. Russ Algar. A long-wavelength quantum dot-concentric FRET configuration: Characterization and application in a multiplexed hybridization assay. *Analyst* 141 (2016) 3636 – 3647.
- [69] M. Kamruzzaman, A.M. Alam, S.H. Lee, Y. Suk Suh, Y.H. Kim, G.M. Kim, S.H. Kim, Method for the determination of fluoroquinolones based on the plasmonic interaction between their fluorescent terbium complexes and silver nanoparticles. *Microchim. Acta* 174 (2011) 353-360.
- [70] G. Chen, Y. Du, Screening of Danofloxacin Residue in Bovine Tissue by Terbium-Sensitized Luminescence on C18 Sorbent Strips. *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 1058-1062.
- [71] G. Chen, Q. Li, G. Liu, F. Qin, Y. Du, Lanthanide-sensitized luminescence instrumentation and methods for analysis of tetracyclines and

- fluoroquinolones residues in foods. ACS Symposium Series 1138 (2013) 49 – 63.
- [72] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, F. Martínez Ferreras, Simultaneous Determination of Doxycycline and Chlortetracycline in Real Samples by Europium-Sensitized Luminescence. *Appl. Spectrosc.* 67 (2013) 371-378.
- [73] S. Morandi, C. Focardi, M. Nocentini, M. Puggelli, G. Caminati, Development and Validation of Europium-Sensitized Luminescence (ESL) Method for the Determination of Tetracycline Residues in Milk. *Food Anal. Methods* 2 (2009) 271-281.
- [74] Y. Wang, Y. Li, W. Qi, Y. Song, Luminescent lanthanide graphene for detection of bacterial spores and cysteine. *Chem. Comm.* 51 (2015) 11022 – 11025.
- [75] M.L. Savastano, I. Losito, S. Pati, Rapid and automatable determination of ochratoxin A in wine based on microextraction by packed sorbent followed by HPLC-FLD. *Food Control* 68 (2016) 391 – 398.
- [76] I. Lhotská, D. Satínský, P. Solich, A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE-HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 3319 – 3329.
- [77] V. Simao, J. Merib, A.N. Dias, E. Carasek, Novel analytical procedure using a combination of hollow fiber supported liquid membrane and dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of aflatoxins in soybean juice by high performance liquid chromatography-fluorescence detector. *Food Chem.* 196 (2016) 292 – 300.

- [78] M. Szkop, U. Szkop, P. Keszycka, D. Gajewska. A single and robust protocol for fast RP-HPLC determination of salicylates in foods. *Food Anal. Methods* doi:10.1007/s12161-016-0621-4
- [79] R.B.P. Vidal, G.A. Bañez, G.M. Escandar. A green method for the quantification of plastics-derived endocrine disruptors in beverages by chemometrics-assisted liquid chromatography with simultaneous diode array and fluorescent detection. *Talanta* 159 (2016) 336 – 343.
- [80] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, Liquid chromatography coupled to on-line post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries, *Anal. Chim. Acta* 798 (2013) 1-24.
- [81] I. Molnár-Perl, Advancement in the derivatizations of the amino groups with the *o*-phthaldehyde-thiol and with the 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride reagents, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 1241-1269.
- [82] L. Bennett, S. Sudharmarajan, G. Smithers, A novel method for total protein analysis of protein mixtures using enzyme hydrolysis and derivatisation with *o*-phthaldialdehyde – Application to dairy products, *Int. Dairy J.* 55 (2016) 44-51.
- [83] J. Perucho, R. Gonzalo-Gobernado, E. Bazan, M.J. Casarejos, A. Jiménez-Escrig, M.J. Asensio, A.S. Herranz, Optimal excitation and emission wavelengths to analyze amino acids and optimize neurotransmitters quantification using precolumn OPA-derivatization by HPLC, *Amino Acids*, 47 (2015) 963-973.
- [84] P.G. Rigas. Post-column labelling techniques in amino acid analysis by liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7957 – 7992.

- [85] S. Hernández-Cassou, J. Saurina. Derivatization strategies for the determination of biogenic amines in wines by chromatographic and electrophoretic techniques, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 1270–1281.
- [86] A. Vasánits-Zsigrai, O. Majercsik, G. Tóth, A. Csámpai, C. Haveland-Lukács, D. Pálfi, Z. Szadai, B. Rózsa, I. Molnár-Perl, Quantitation of various indolinyll caged glutamates as their *o*-phthalaldehyde derivatives by high performance liquid chromatography coupled with tandem spectroscopic detections: Derivatization, stoichiometry and stability studies, *J. Chromatogr. A* 1394 (2015) 81-88.
- [87] M. Triki, F. Jimenez-Colmenero, A.M. Herrero, C. Ruiz-Capillas, Optimisation of a chromatographic procedure for determining biogenic amine concentrations in meat and meat products employing a cation-exchange column with a post-column system, *Food Chem.* 130 (2012) 1066–1073.
- [88] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, A. Vlessidis, Determination of rimantadine in human urine by HPLC using a monolithic stationary phase and on-line post-column derivatization, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1720–1725.
- [89] M. Dousa, J. Brichac, J. Svoboda, R. Klvana, Rapid HILIC method with fluorescence detection using derivatization reaction utilizing *o*-phthalaldehyde for determination of degradation product of aliskiren, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66 (2012) 359–364.
- [90] F. Farouk, H.M.E. Azzazy, W.M.A. Niessen, Challenges in the determination of aminoglycoside antibiotics, a review, *Anal. Chim. Acta*, 890 (2015) 21–43.
- [91] D. Ašperger, V. Tišler, M. Zrnčić, D. Mutavdžić Pavlović, S. Babić, A.J.M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, HPLC–DAD–FLD determination of veterinary pharmaceuticals in pharmaceutical industry wastewater with precolumn derivatization using fluorescamine, *Chromatographia* 77 (2014) 1059–1066.

- [92] X. Xu, X. Yuancan, G. Dandan, P. Li, D. Qi, H. Fengzu, Simultaneous determination of 16 sulfonamide residues in beef by high performance liquid chromatography-fluorescence detection with online post-column derivatization, *Chin. J. Chromatogr.* 34 (2016) 422–428.
- [93] S. Pravadali-Cekic, A. Jones, A.A. Kazarian, B. Paull, A. Soliven, H. Ritchie, M. Camenzuli, G.R. Dennis, R.A. Shalliker, Using reaction flow chromatography for the analysis of amino acid: Derivatisation with fluorescamine reagent, *Microchem. J.* 121 (2015) 141–149.
- [94] C.I. Giovanni-Tuberoso, F. Congiu, G. Serreli, S. Mamei, Determination of dansylated amino acids and biogenic amines in Cannonau and Vermentino wines by HPLC-FLD, *Food Chem.* 175 (2015) 39–35.
- [95] X. Meng, T. Tong, L. Wang, H. Liu, W. Chan, Determination of 2-alkylcyclobutanones by combining precolumn derivatization with 1-naphthalenyl hydrazine and ultra-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 3703 – 3714.
- [96] Y. Wang, W. Chan, Automated in-injector derivatization combined with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of semicarbazide in fish and bread samples, *J. Agric. Food Chem.* 64 (2016) 2802 – 2808.
- [97] J. You, H. Wu, G. Li, L. Xiu, M. Zhan, S. Lu, W. Kong, Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method combined with HPLC-fluorescence detection for the determination of glycyrrhetic acid in liquorice and liquorice-derived food products, *J. Iran. Chem. Soc.* 13 (2016) 359 – 367.



- [98] X.F. Wang, J.C. Fan, R. Ren, Q. Jin, J. Wang, Rapid determination of nitrite in foods in acidic conditions by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 2263 – 2269.
- [99] G. Li, S. Liu, Z. Sun, L. Xia, G. Chen, J. You, A simple and sensitive HPLC method based on pre-column fluorescence labelling for multiple classes of plant growth regulator determination in food samples, *Food Chem.* 170 (2015) 123 – 130.
- [100] M.J. Azilawati, D.M. Hashim, B. Jamilah, I. Amin, RP-HPLC method using 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidylcarbamate incorporated with normalization technique in principal component analysis to differentiate the bovine, porcine and fish gelation, *Food Chem.* 172 (2015) 368 – 376.
- [101] F. Macedo, E. Teixeira-Marsico, C.A. Conte-Júnior, M.F. Resende, T. Figueiredo-Brasil, A.D. Pereira-Netto, Development and validation of a method for the determination of low-ppb levels of macrocyclic lactones in butter, using HPLC-fluorescence, *Food Chem.* 179 (2015) 239 – 245.
- [102] T. Nakano, K. Todoroki, Y. Ishii, C. Miyauchi, A. Palee, J.Z. Min, K. Inoue, K. Suzuki, T. Toyo'oka, An easy-to-use excimer fluorescence derivatization reagent, 2-chloro-4-methoxy-6-(4-(pyren-4-yl)butoxy)-1,3,5-triazine for use in the highly sensitive and selective liquid chromatography analysis of histamine in Japanese soy sauces, *Anal. Chim. Acta*, 880 (2015) 145 – 151.
- [103] K. Todoroki, T. Nakano, Y. Ishii, K. Goto, R. Tomita, T. Fujioka, J.Z. Min, K. Inoue, T. Toyo'oka, Automatic analyzer for highly polar carboxylic acids based on fluorescence derivatization-liquid chromatography, *Biomed. Chromatogr.* 29 (2015) 445 – 451.

- [104] M.I. Rodríguez-Cáceres, M. Palomino-Vasco, N. Mora-Díez, M.I. Acedo-Valenzuela, Novel HPLC-fluorescence methodology for the determination of methylglyoxal and glyoxal. Application to the analysis of monovarietal wines "Ribera del Guadiana", *Food Chem.* 187 (2015) 159 – 165.
- [105] M. Dousa, J. Stach, P. Gibala, K. Lemr, Quantification of structurally related aliphatic amino alcohols in l-valinol by hydrophilic interaction liquid chromatography separation combined with post-column derivatization and fluorescence detection, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 851 – 856.
- [106] C. Muller-Bandeira, W. Pinheiro-Evangelista, M.B. Abreo-Gloria, Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn, *Food Chem.* 131 (2012) 1355 – 1359.
- [107] D. Rozinska, J. Lebotay, Influence of temperature on production of biogenic amines in pork, beef, and poultry and their HPLC determination after post-column derivatization, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 37 (2014) 609 – 619.
- [108] P. Kaczyński, B. Lozowicka, Liquid chromatographic determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid residues in rapeseed with MS/MS detection or derivatization/fluorescence detection, *Open Chem.*, 13 (2015) 1011 – 1019.
- [109] M. Muscarella, S. Lo Magro, D. Nardiello, C. Palermo, D. Centonze, Development of a new analytical method for the determination of fumonisins B1 and B2 in food products based on high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization, *J. Chromatogr. A* 1201 (2008) 88 – 93.
- [110] H. Goto, K. Nishikawa, N. Shionoya, M. Taniguchi, T. Igarashi, Determination of sphingoid bases from hydrolysed glucosylceramide in rice and wheat by

- online post-column high-performance liquid chromatography with o-phthalaldehyde derivatization, *J. Oleo Sci.*, 61 (2012) 681 – 688.
- [111] R.C. Rodríguez Díaz, J.M. Fernández Romero, M.P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens, Determination of Fluoroquinolones in Milk Samples by Postcolumn Derivatization Liquid Chromatography with Luminescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9670-9676.
- [112] G.S. Yáñez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens. Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles. *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 126-132.
- [113] B. Ferraz Spisso, A.L. Oliveira e Jesus, M. A. Gonçalves de Araujo, Jr., M. Alves-Monteiro, Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk, *Anal. Chim. Acta*, 581 (2007) 108 – 117.
- [114] A. Andreu-Navarro, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens. Long wavelength fluorescence detection of flavonoids in orange juices by LC, *Chromatographia* 72 (2010) 1115-1120.
- [115] J. Fedorowski, W.R. LaCourse, A review of post-column photochemical reaction systems coupled to electrochemical detection in HPLC, *Anal. Chim. Acta*, 657 (2010) 1 – 8.
- [116] M. Quinto, G. Spadaccino, C. Palermo, C. Centonze, Determination of aflatoxins in cereal flours by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography and post-column photochemical derivatization-fluorescence detection, *J. Chromatogr. A*, 116 (2009) 8636 – 8641.

- [117] I. Durán-Merás, T. Galeano-Díaz, D. Airado-Rodríguez, Post-column on-line photochemical derivatization for the direct isocratic LC-FLD analysis of resveratrol and piceid isomers in wine, *Food Chem.* 109 (2008) 825 – 833.
- [118] J.F. Huertas-Pérez, N. Arroyo-Manzanares, L. Havliková, L. Gámiz-Gracia, P. Solich, A.M. García-Campaña, Method optimization and validation for the determination of eight sulphonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and liquid chromatography with fluorescence detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 124 (2016) 261 – 266.
- [119] H.E. Ok, S.H. Chung, N. Lee, H.S. Chun, Simple high-performance liquid chromatography method for the simultaneous analysis of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in dried and ground red pepper, *J. Food Protection*, 78 (2015) 1226 – 1231.
- [120] F.C. Adams, C. Barbante, Nanoscience, nanotechnology and spectrometry, *Spectrochim. Acta B*, 86 (2013) 3 – 13.
- [121] M. Valcárcel, B.M. Simonet, S. Cárdenas, Analytical nanoscience and nanotechnology today and tomorrow *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1881-1887.
- [122] C. Dhand, N. Dwivedi, X.J. Loh, A.N. Jie Ying, N.K. Verma, R.W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive overview, *RCS Advances*, 127 (2015) 105003-105037.
- [123] Y. Gogotsi (editor), *Nanomaterials Handbook*, Taylor and Francis Group (2006).

- [124] K. Scida, P.W. Stege, G. Haby, G.A. Messina, C.D. García, Recent applications of carbon-based nanomaterials in analytical chemistry: Critical review, *Anal. Chim. Acta*, 691 (2011) 6-17.
- [125] B. Pérez-López, A. Merkoçi, Carbon nanotubes and graphene in analytical sciences, *Microchim. Acta*, 179 (2012) 1-16.
- [126] M. Iranifam, Analytical applications of chemiluminescence systems assisted by carbon nanostructures, *Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 387-415.
- [127] T.S. Bedwell, M.J. Whitcombe, Analytical applications of MIPs in diagnostic assays: future perspectives, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 1735-1751.
- [128] N. Li, D. Liu, H. Cui, Metal-nanoparticle-involved chemiluminescence and its applications in bioassays, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5561-5571.
- [129] Z. Yuan, C.C. Hu, H.T. Chang, C. Lu, Gold nanoparticles as sensitive optical probes, *Analyst*, 141 (2016) 1611-1626.
- [130] M. Fan, G.F.S. Andrade, A.G. Brolo, A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta*, 693 (2011) 7-25.
- [131] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50-58.
- [132] Z. Yue, F. Lisdat, W.J. Parak, S.G. Hickey, L. Tu, N. Sabir, D. Dorfs, N.C. Bigall, Quantum-Dot-based photoelectrochemical sensors for chemical and biological detection, *Appl. Mater. Interfaces*, 5 (2013) 2800-2814.

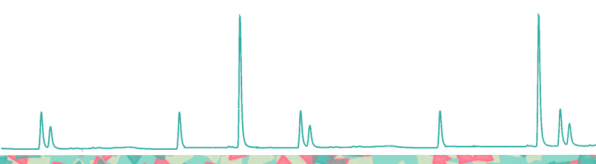
- [133] X. Pei, B. Zhang, J. Tang, B. Liu, W. Lai, D. Tang, Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review, *Anal. Chim. Acta* 758 (2013) 1-18.
- [134] D. Quesada-González, A. Merkoçi, Nanoparticle-based lateral flow biosensors, *Biosens. Bioelectron.* 73 (2015) 47-63.
- [135] D. Knopp, D. Tang, R. Niessner, Review: Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles, *Anal. Chim. Acta* 647 (2009) 14-30.
- [136] A.I. López-Lorente, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Analytical potential of hybrid nanoparticles, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 43-54.
- [137] A.S. de Dios, M.E. Díaz-García, Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects, *Anal. Chim. Acta*, 666 (2010) 1-22.
- [138] A.I. López-Lorente, M. Valcárcel, The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process, *Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 1-9.
- [139] A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, M.P. Aguilar-Caballos, Nanostructures as analytical tools in bioassays, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 394-406.
- [140] A. Gómez-Hens, J.M. Fernández-Romero, M.P. Aguilar-Caballos, High Throughput bioassays using nanoparticles, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 13 (2010) 309-317.
- [141] M. Sierra Rodero, J.M. Fernández-Romero, A. Gómez-Hens, Strategies to improve the analytical features of microfluidic methods using nanomaterials, *Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 23-33.

- [142] Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen, Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 26-41.
- [143] J. Tian, J. Xu, F. Zhu, T. Lu, C. Su, G. Ouyang, Application of nanomaterials in sample preparation, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 2-16.
- [144] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga, New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14-23.
- [145] C. Fenzl, T. Hirsch, A.J. Baeumner, Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications, *Trends Anal. Chem.* 79 (2016) 306–316.
- [146] W.Q. Lim, Z. Gao, Metal oxide nanoparticles in electroanalysis, *Electroanal.* 27 (2015) 2074-2090.
- [147] E. Caballero-Díaz, B.M. Simonet, M. Valcárcel, The social responsibility of Nanoscience and Nanotechnology: an integral approach, *J. Nanopart. Res.* 15 (2013) 1534.
- [148] G.E. Marchant, A. White, An international nanoscience advisory board to improve and harmonize nanotechnology oversight, *J. Nanopart. Res.* 13 (2011) 1489 – 1498.
- [149] S. Ranjan, N. Dasgupta, A.R. Chakraborty, S.M. Samuel, C. Ramalingam, R. Shanker, A. Kumar, Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends, *J. Nanopart. Res.* 16 (2014) 2464.
- [150] B. Cancho Grande, M.S. García Falcón, J. Simal Gándara, El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual, *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3 (2000) 39-47.

- [151] Council Regulation (EEC) No. 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Off. J. L224 (1990) 1-8.
- [152] Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, Off. J. Eur. Union L152 (2009) 11-22.
- [153] Commission Regulation EU No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, Off. J. Eur. Union L15 (2010) 1-72.
- [154] [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/subhomes/seguridad\\_alimentaria/aecosan\\_seguridad\\_alimentaria.shtml](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/subhomes/seguridad_alimentaria/aecosan_seguridad_alimentaria.shtml), último acceso 13 julio, 2016.







# CAPÍTULO I

## HERRAMIENTAS ANALÍTICAS



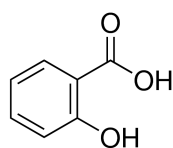


**D**urante el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral se han empleado diferentes herramientas analíticas, entre las que se incluyen estándares, reactivos, disolventes, nanomateriales y muestras. En este Capítulo de la Memoria se describen dichas herramientas, indicando sus características y los aspectos más relevantes de su uso. También se incluye una breve descripción de los instrumentos, aparatos y otros materiales utilizados, así como los métodos de síntesis de nanomateriales y de tratamiento de muestra empleados.

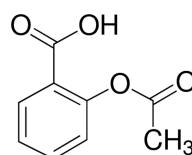
### 1.1 ESTÁNDARES

Para llevar a cabo las investigaciones realizadas se han empleado fármacos de uso veterinario como analitos modelo. A continuación se muestran las estructuras químicas de los compuestos utilizados para preparar los estándares de dichos analitos (Tabla I.1 y I.2), agrupados por familias, así como las casas comerciales que los han suministrado (Tabla I.3). En esta última también se incluyen otros antibióticos de uso veterinario utilizados para realizar el estudio de selectividad de los métodos desarrollados.

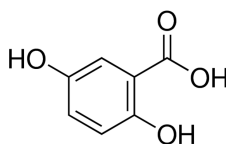
**Tabla I.1.** Estructuras químicas del ácido acetilsalicílico y sus metabolitos



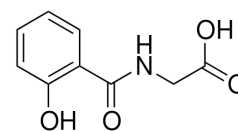
Ácido salicílico



Ácido acetilsalicílico



Ácido gálico



Ácido salicílico

Tabla I.2. Estructuras químicas de los antibióticos utilizados como analitos.

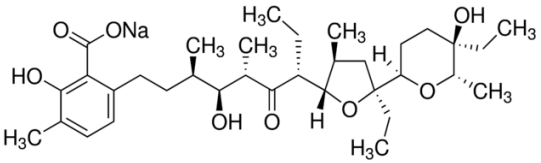
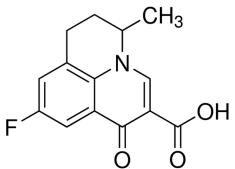
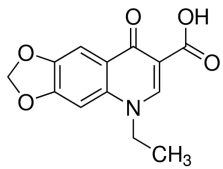
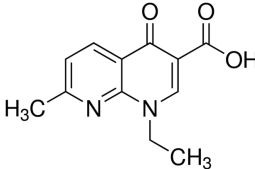
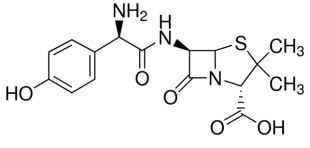
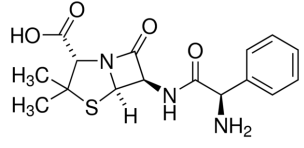
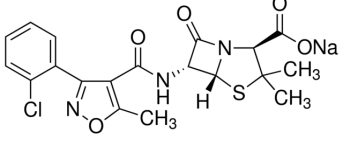
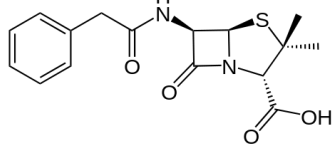
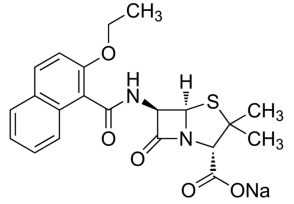
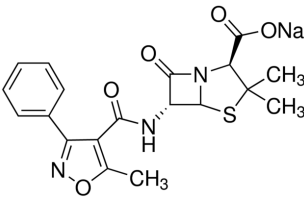
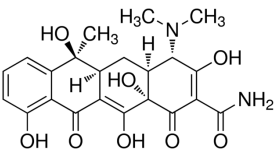
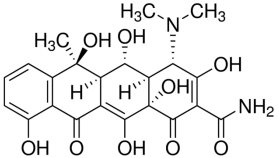
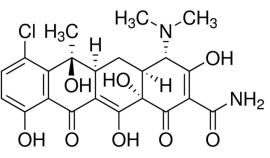
|               |   |
|---------------|---|
| Ionóforos     |  <p style="text-align: center;"><i>Lasalocid</i></p>  |
| Quinolonas    | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><i>Flumequina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Ácido oxolinico</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Ácido nalidixico</i></p> </div> </div>   |
| Penicilinas   | <div style="display: grid; grid-template-columns: 1fr 1fr; gap: 10px;"> <div style="text-align: center;">  <p><i>Amoxicilina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Ampicilina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Cloxacilina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Nafcilina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Penicilina G</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Oxacilina</i></p> </div> </div> |
| Tetraciclinas | <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><i>Tetraciclina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Oxitetraciclina</i></p> </div> <div style="text-align: center;">  <p><i>Clortetraciclina</i></p> </div> </div>   |

Tabla I.3. Compuestos empleados y casas comerciales distribuidoras

| Compuesto              | Distribuidor      | Compuesto       | Distribuidor |
|------------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| Ácido acetilsalicílico | Fluka             | Estreptomina    | Fluka        |
| Ácido gentísico        | Sigma             | Flumequina      | Sigma        |
| Ácido nalidíxico       | Sigma             | Gentamicina     | Fluka        |
| Ácido salicílico       | Aldrich           | Ketoprofeno     | Sigma        |
| Ácido salicílico       | Zerenex molecular | Lasalocid       | Sigma        |
| Ácido oxalínico        | Sigma             | Marbofloxacina  | Fluka        |
| Amikacina              | Sigma             | Minociclina     | Sigma        |
| Amoxicilina            | Sigma             | Monensin        | Sigma        |
| Ampicilina             | Sigma             | Nafcilina       | Sigma        |
| Cefuroxima             | Sigma             | Neomicina       | Sigma        |
| Ciprofloxacina         | Fluka             | Norfloxacina    | Fluka        |
| Clortetraciclina       | Sigma             | Oxacilina       | Sigma        |
| Cloxacilina            | Sigma             | Oxitetraciclina | Sigma        |
| Difloxacina            | Riedel-de Haën    | Penicilina G    | Sigma        |
| Doxiciclina            | Sigma             | Penicilina V    | Sigma        |
| Enrofloxacina          | Sigma             | Sulfadimetoxina | Fluka        |
| Eritromicina           | Fluka             | Tetraciclina    | Sigma        |

Para su correcta conservación, las disoluciones de los estándares se mantuvieron protegidas de la luz y a una temperatura de 4°C, excepto en el caso de las penicilinas, las cuales fueron almacenadas a -20°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante dilución de las anteriores.

## I.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES

Los reactivos empleados se relacionan a continuación:

- \* Reactivos de síntesis: cloruro de hierro (III) hexahidratado (Panreac), cloruro de hierro (II) tetrahidratado y urea (Merck), polietilenglicol 6000 (PEG) (Fluka), nitrato de terbio (III) pentahidratado (Sigma-Aldrich) y nitrato de europio (III) pentahidratado (Aldrich).
- \* Sistemas derivatizantes: cloruro de rutenio(II)-tris-(2,2'-bipiridina) hexahidratado (Sigma-Aldrich) y sulfato de cerio (IV) (Merck).
- \* Tensoactivos: Tritón X-100 y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), (Fluka).
- \* Disolventes orgánicos: acetonitrilo (ACN) (Panreac y Teknokroma), etanol, metanol y 2-propanol (Panreac).
- \* Disoluciones reguladoras: imidazol (Aldrich), hexamina (hexametilentetraamina) y acetato amónico (Merck).
- \* Ácidos y bases: ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido ortofosfórico y ácido acético glacial (Panreac), hidróxido sódico e hidróxido amónico (Sigma-Aldrich).
- \* Otros reactivos: óxido de tri n-octilfosfina (TOPO) (Aldrich), ácido etilendiamintetraacético (AEDT) (Sigma-Aldrich) y nitrato de magnesio hexahidratado (Fluka).

Todos los estándares, reactivos y disolventes empleados a lo largo de la investigación fueron de pureza analítica o superior.

### **1.3 NANOMATERIALES**

A continuación se describen los diferentes tipos de nanomateriales empleados:

#### ***1.3.1 Nanopartículas de óxidos de lantánidos***

Nanopartículas de óxido de terbio ( $Tb_4O_7$ ) con un diámetro  $<100$  nm y nanopartículas de óxido de europio ( $Eu_2O_3$ ) con un diámetro  $<150$  nm fueron obtenidas de Sigma–Aldrich.

#### ***1.3.2 Nanomateriales magnéticos híbridos de terbio y europio***

Se han utilizado nanomateriales magnéticos híbridos recubiertos con iones terbio y europio, cuya síntesis se describe en el apartado 1.9 de este Capítulo. La caracterización del nanomaterial se llevó a cabo mediante difracción de rayos X (DRX) y espectroscopía fotoelectrónica de rayos X (XPS). El diámetro medio del mismo ( $9,6 \pm 0,4$  nm) fue medido mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM).

#### ***1.3.3 Nanopartículas de oro***

Una suspensión de nanopartículas de oro (20 nm) estabilizadas en disolución reguladora citrato (Sigma Aldrich) fue ensayada como potencial sorbente.

### **1.4 MUESTRAS**

Para llevar a cabo el estudio de la aplicabilidad de los distintos métodos analíticos desarrollados se han empleado distintas muestras de interés agroalimentario.

Muestras de agua potable de distintos puntos de la ciudad fueron recolectadas en frascos de vidrio topacio y conservadas a  $4^{\circ}C$  hasta el momento de su análisis.



Muestras de distintos tipos de carne, tales como lomo de cerdo, pechuga de pollo y carne picada, fueron adquiridas en un supermercado local. También se analizaron huevos.

Pre-mezcla para aves, comercializada como Avatec® 150 G, fue analizada para determinar su contenido en lasalocid. Esta muestra es un aditivo coccidiostático que se adiciona al pienso utilizado para la alimentación de animales. Este producto fue amablemente donado por MIPROMA Productos Zoosanitarios S.L. (Sevilla, España).

Muestras de orina de vaca, cedidas por la Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (Córdoba, España). Estas muestras fueron almacenadas en botes de plástico a -20°C en el laboratorio hasta el momento de su análisis.

Preparado farmacéutico HIPRAMOX® P, que contiene amoxicilina para administrarlo a animales por vía oral en agua de bebida.

### **1.5 INSTRUMENTACIÓN**

Se ha utilizado la siguiente instrumentación:

- \* Espectrofotómetro Lambda 35 ES UV/Vis (Perkin Elmer), con una celda de cuarzo de 10 mm de paso óptico y 3500 µL de volumen (Hellma Analytics).
- \* Espectrofluorímetro SLM Aminco 8100 (Urbana), equipado con una lámpara de arco de xenón de 450 W y dos tubos fotomultiplicadores R928.
- \* Cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 Series, compuesto por una bomba cuaternaria, una unidad desgasificadora, un inyector automático, compartimento para dos columnas termostatadas y dos detectores: un fotómetro de diodos en fila (DAD) y un fluorímetro (FLD).

- \* Cromatógrafo de líquidos Shimadzu Nexera LC-30 (UHPLC), compuesto por dos bombas de alta presión, una unidad desgasificadora, una unidad automuestreadora termostatada, un horno cromatográfico y dos detectores: un detector UV/Vis y un detector de fluorescencia.
- \* Microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400, perteneciente al servicio central de apoyo a la investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, así como rejillas de cobre (200C-FC) recubiertas con películas de carbono Formvar® 200 mesh, suministradas por Anamed (Madrid, España).

#### **I.6 APARATOS**

Se han empleado:

- \* Bomba peristáltica Gilson Miniplus-3 (Middleton, Estados Unidos).
- \* Centrífuga controlada por microprocesador MPW-350/R (MPW Med. Instruments).
- \* Centrífuga angular Nahita Mod. 2650, 4000 rpm (Auxilab-material de laboratorio, España).
- \* Baño de ultrasonidos, 50/60 Hz, 360 W (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- \* Baño de agua termostaticado (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- \* Agitador Vortex (Velp Científica, Milán, Italia).
- \* Agitador magnético, 2500 rpm (IKA, Alemania).
- \* Estufa de secado, modelo Conterm (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- \* Placa calefactora con agitación magnética Agimatic-N (J.P. Selecta, Barcelona, España).
- \* pH-metro (Crison, modelo GLP 21).
- \* Balanza analítica de precisión OHAUS Explorer (OHAUS,

Nänikon, Suiza).

- \* Dispersador Ultra- Turrax T25 digital (IKA, Alemania).
- \* Equipo de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

### **I.7 MATERIAL DE LABORATORIO**

- \* Micropipetas automáticas.
- \* Material de vidrio de laboratorio, clase A.
- \* Cartuchos de extracción en fase sólida Supel-select HLB, 60 mg/3 mL (Supelco).
- \* Viales de vidrio de 1,5 mL con septum de PTFE/silicona y de butilo/PTFE (Análisis Vínicos, España).
- \* Jeringas de plástico de 1 y 5 mL (Albus, España).
- \* Filtros de jeringa de celulosa regenerada de tamaño de poro 0,20  $\mu\text{m}$  (Análisis Vínicos, España).
- \* Filtros de membrana de nylon de tamaño de poro de 0,20  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA, EEUU).
- \* Tubos eppendorf de 1,5 y 2 mL.
- \* Tubos de centrifuga de polipropileno.
- \* Tubos de FIA.
- \* Guantes de nitrilo.

### **I.8 PROGRAMAS INFORMÁTICOS**

Para realizar los cálculos estadísticos y elaborar las representaciones gráficas se utilizaron OriginPro 7.0 (ORIGIN LAB), Statgraphics Centurion XVI.I, Microsoft Excel y Sigma Plot 7.0.

Los datos cromatográficos obtenidos se adquirieron y procesaron

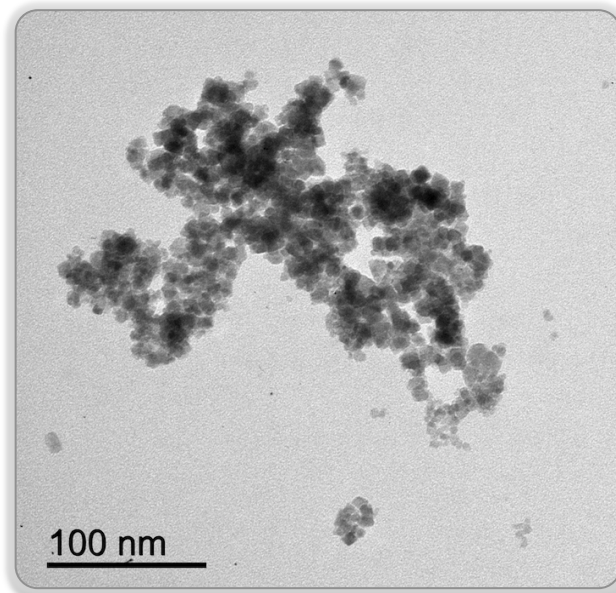
mediante los softwares LabSolutions release 5.42 SP5 (Shimadzu) y ChemStation (Agilent).

### **1.9 SÍNTESIS DE NANOMATERIALES**

La síntesis del nanomaterial magnético híbrido de terbio y europio utilizado para la extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) fue realizada en el laboratorio, mediante modificación de una síntesis descrita previamente en la bibliografía [1]. Esta síntesis consiste en la formación de núcleos magnéticos mediante un método de co-precipitación y el posterior tratamiento con iones Tb (III) y Eu (III) para obtener un recubrimiento de estos lantánidos sobre la superficie del nanomaterial magnético.

Para sintetizar los núcleos magnéticos se disuelven los cloruros de hierro II y III en agua destilada en una relación molar 1:2 bajo una corriente de nitrógeno. A continuación, se añaden 5 mL de PEG para evitar la agregación del nanomaterial y se calienta durante 2 horas a 90°C añadiendo 2 mL de hidróxido amónico gota a gota cada 30 minutos. El precipitado resultante se lava varias veces con agua destilada y etanol, separándolo magnéticamente con ayuda de un imán, y finalmente se deja secar en una estufa a 100°C durante la noche.

En una segunda etapa, los núcleos magnéticos se recubren con iones de terbio y europio, para lo que se prepara una disolución que contiene nitrato de terbio 10 mM, nitrato de europio 10 mM y urea 1,8 M, en la que se dispersan 100 mg de las nanopartículas magnéticas obtenidas en la etapa anterior con ayuda de ultrasonidos durante 20 minutos. Pasado este tiempo, la disolución se calienta a 90°C agitando mecánicamente durante 4 horas. El precipitado resultante se lava varias veces con agua y etanol, separándolo magnéticamente, y se deja secar en estufa durante la noche. Finalmente, el sólido obtenido es calcinado a 700°C durante 2 horas. En la Figura 1.1 se muestra una imagen TEM del nanomaterial obtenido.



*Figura I.1. Imagen obtenida mediante TEM del nanomaterial híbrido sintetizado*

### ***I.10 MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA***

Algunas de las muestras empleadas durante el desarrollo experimental no requirieron ningún tratamiento previo a su análisis. Tal es el caso de las distintas muestras de agua utilizadas, las cuales fueron inyectadas en el sistema cromatográfico, bien de forma directa o bien mediante una simple dilución en agua Milli-Q, previamente filtradas con filtros de 0,20  $\mu\text{m}$ . Al igual que el preparado comercial HIPRAMOX® P, que fue disuelto en agua en una concentración equivalente a la mínima dosis recomendada por el fabricante y posteriormente diluido en agua Milli-Q antes de su análisis. Sin embargo, otras muestras requirieron diversos tratamientos previos, los cuales se describen a continuación. Todas las muestras fueron filtradas con filtros de jeringa de 0,20  $\mu\text{m}$  antes de su inyección en el sistema cromatográfico.

### ***1.10.1 Precipitación de proteínas***

Existen múltiples tratamientos para desnaturalizar y precipitar proteínas de la matriz de la muestra, permitiendo eliminarlas y evitando que interfieran en medidas posteriores. Durante las investigaciones realizadas a lo largo de esta Memoria, se han empleado distintos métodos de precipitación de proteínas según la matriz utilizada.

#### *1.10.1.1 Precipitación de proteínas del huevo*

Para eliminar proteínas del huevo, 0,4 g de la muestra homogeneizada fueron tratados con 1,5 mL de etanol acidificado con HCl y la suspensión se mantuvo durante 20 minutos en un baño de ultrasonidos a 40°C. A continuación, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se recogió el sobrenadante. El procedimiento se repitió una vez y ambos extractos fueron combinados y diluidos a 50 mL con agua destilada.

#### *1.10.1.2 Precipitación de proteínas de la carne*

El método utilizado para la precipitación de las proteínas de las distintas muestras de carne analizadas consistió en agitar una mezcla de 0,3 g de la muestra, previamente homogeneizada usando un dispersador Ultra-Turrax, con 1 mL de ACN durante un minuto en vórtex. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 10000 rpm durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante. Tras repetir la extracción con ACN una vez, los extractos fueron combinados.

### ***1.10.2 Extracción sólido-líquido***

Con el fin de extraer los analitos de la muestra se realizó una extracción convencional sólido-líquido para la pre-mezcla para aves Avatec® 150 G. Esta extracción consiste en la separación de componentes solubles de la matriz de la muestra mediante la utilización de un disolvente adecuado. Para ello 0,5 g de este producto fueron tratados con 25 mL de etanol acidificado con HCl en un baño de ultrasonidos a 40°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, la extracción continuó con agitación mecánica durante una hora a temperatura ambiente. La suspensión

resultante fue filtrada, el filtro fue lavado con etanol y la disolución se enrasó a 100 mL con este disolvente.

### ***1.10.3 Extracción en fase sólida***

La extracción en fase sólida (SPE) es uno de los tratamientos de muestra más ampliamente utilizado para el “*clean-up*” de las muestras. En el desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral se han empleado cartuchos Supel-select HLB para realizar la SPE, que consisten en una fase polimérica de estireno modificada hidrofílicamente, de manera que, aunque el mecanismo de retención es predominantemente el dado en fase reversa, al estar la fase modificada, es también selectiva para compuestos polares. El tratamiento realizado fue diferente dependiendo de la muestra utilizada.

#### *1.10.3.1 Extracción en fase sólida para muestras de huevo*

Para acondicionar los cartuchos de SPE se emplearon 6 mL de metanol y 6 mL de agua acidificada con HCl a pH 1,2. A continuación, la muestra fue pasada por el cartucho HLB, y este se lavó con 5 mL de una disolución acuosa de etanol al 5% para eliminar interferencias. Finalmente, los analitos retenidos en el cartucho fueron eluidos usando 1 mL de una disolución conteniendo etanol (95%) y amoníaco  $10^{-2}$  M (5%).

#### *1.10.3.2 Extracción en fase sólida para muestras de orina*

Las muestras de orina fueron acidificadas a pH 1,3 con HCl 1 M e inmediatamente después fueron aplicadas a los cartuchos HLB, que previamente habían sido acondicionados con 5 mL de metanol y 5 mL de HCl 0,045 M. Los cartuchos fueron lavados con 2 mL de HCl 0,045 M para eliminar interferencias y los analitos retenidos en los cartuchos fueron eluidos con 1 mL de ACN 90%.

#### 1.10.4 Extracción en fase sólida dispersiva magnética

Esta técnica se ha aplicado, utilizando el nanomaterial cuya síntesis se ha descrito en el apartado 1.9 de este Capítulo, para la determinación de quinolonas y tetraciclinas en muestras de carne. El procedimiento descrito ha permitido eliminar la matriz de la muestra y preconcentrar los analitos.

El extracto de muestra, ajustado a pH 8,3, se puso en contacto con 12 mg del nanomaterial y fue agitado en vórtex durante 10 minutos. A continuación, las nanopartículas magnéticas híbridas fueron separadas del sobrenadante utilizando un soporte con imán para tubos eppendorf, lo que permitió el tratamiento simultáneo de varias muestras. El nanomaterial fue lavado dos veces con 500  $\mu\text{L}$  de disolución acetato amónico para eliminar posibles interferentes de la matriz de la muestra. A continuación, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  0,1 M a pH 9,8 y la mezcla fue agitada durante 30 minutos. El eluido fue recogido separando el nanomaterial con ayuda del imán y el procedimiento se repitió añadiendo 500  $\mu\text{L}$  de AEDT 75 mM. Finalmente, ambos eluidos fueron combinados. En la Figura 1.2 se muestra un esquema del procedimiento completo.

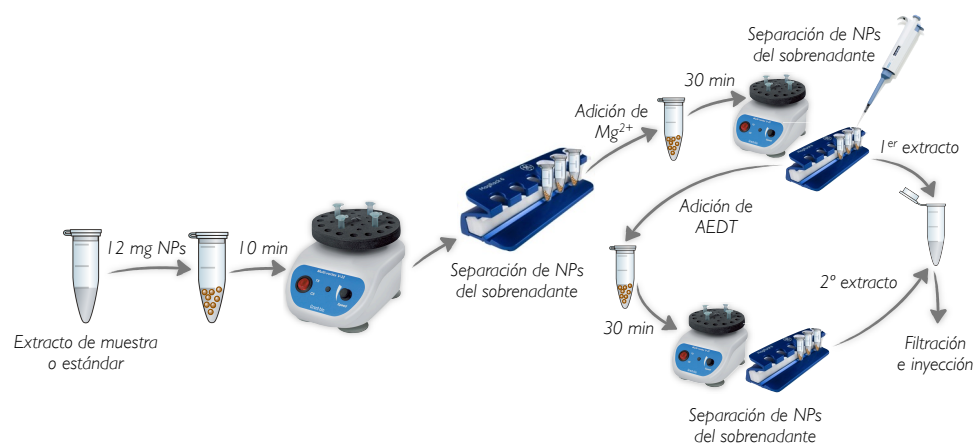


Figura 1.2. Esquema del tratamiento de muestra en la extracción en fase sólida dispersiva

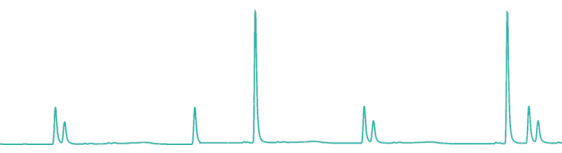


**REFERENCIAS**

- [1] Z.Y. Ma, D. Dosev, M. Nichkova, S.J. Gee, B.D. Hammock, I.M. Kennedy, Synthesis and bio-functionalization of multifunctional magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:Eu nanocomposites, J. Mater. Chem. 19 (2009) 4695 – 4700.







# CAPÍTULO II



NUEVOS NANOMATERIALES  
COMO REACTIVOS  
ANALÍTICOS LUMINISCENTES



**E**l desarrollo de nuevos nanomateriales para utilizarlos como herramientas en el establecimiento de nuevas metodologías y en la mejora o innovación de métodos ya existentes es un aspecto muy actual en Química Analítica. En este Capítulo se recogen las investigaciones realizadas para desarrollar un método luminiscente utilizando un nuevo nanomaterial, las cuales han originado la siguiente publicación científica:

- Application of  $Tb_4O_7$  nanoparticles for lasalocid and salicylate determination in food analysis. M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballeros, A. Gómez-Hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 11741-11747.

Como se indicó en la Introducción de esta Memoria, existe una amplia variedad de nanomateriales empleados con fines analíticos [1-3]. Entre los utilizados como reactivos para la detección luminiscente directa de especies inorgánicas y orgánicas se encuentran los puntos cuánticos o “*quantum-dots*” (QDs) [4-7] y los puntos de carbono o “*carbon-dots*” (CDs) [8-16]. Los QDs, sintetizados a partir de materiales semiconductores, se caracterizan por sus bandas de excitación anchas y picos de emisión estrechos, cuyas longitudes de onda dependen de su tamaño [4-7]. Aunque se han descrito métodos muy sensibles con estos nanomateriales, la principal limitación de su uso es la toxicidad de algunas especies que los componen, como el  $Cd^{2+}$ . En los últimos años se han desarrollado los CDs [8-13], sintetizados a partir de distintas formas de carbono, tales como grafito, nanotubos de carbono, fullerenos y grafeno [8, 11-13]. Los CDs presentan una mayor solubilidad en medio acuoso que los QDs convencionales y su longitud de onda de emisión cambia al modificar la longitud de onda de excitación.

Ambos tipos de nanomateriales se han utilizado para la determinación de especies que contienen oxígeno y nitrógeno [4, 6, 12], de explosivos nitroaromáticos [7, 8], y de iones metálicos, tales como  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$  [5, 11, 12]. Se han determinado también aniones, como el anión superóxido [14], y gases como  $\text{NO}_2$  [15] y  $\text{H}_2\text{S}$  [16] utilizando CDs como reactivos analíticos. En presencia de  $\text{NO}_2$  [15], se produce una inhibición de la fluorescencia del nanomaterial, mientras que con  $\text{H}_2\text{S}$  [16], la reducción del nanomaterial funcionalizado origina un aumento en la señal luminiscente debido a un fenómeno de transferencia de energía. En este proceso, el CD se comporta como dador de energía al ser excitado y la azida de naftoilimida, situada en su superficie, actúa como aceptor de energía al ser reducida por el  $\text{H}_2\text{S}$ . En la mayoría de los métodos descritos para la determinación de trazas de especies inorgánicas y orgánicas en los que se utilizan QDs o CDs se produce inhibición de la fluorescencia debido a la posible precipitación o aglomeración de los nanomateriales tras la adsorción de los analitos en su superficie [8]. En algunos casos se ha descrito un aumento de la fluorescencia atribuido a la pasivación de la superficie del QD o del CD, que conduce a la eliminación de defectos superficiales y de fenómenos de recombinación electrón/hueco no radiantes mediante procesos de transferencia de carga.

Entre otros nanomateriales que pueden emitir fluorescencia se encuentran las nanopartículas de óxido de ytrio dopadas con europio, utilizadas en numerosas aplicaciones industriales, como en dispositivos de iluminación en estado sólido [17, 18], pero han tenido escasa aplicabilidad analítica. Se han sintetizado nanopartículas de óxidos de terbio(III) y europio(III) con diámetros cercanos a 5 nm, lo que les confiere propiedades luminiscentes únicas [19 - 24], las cuales han sido utilizadas para formar marcadores en inmunoensayo [19]. También se ha descrito la formación de complejos de europio(III) encapsulados en polielectrolitos para la determinación de antibióticos fluoroquinolonas [25]. Las nanopartículas de  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  se han utilizado como reactivos analíticos para la cuantificación de antibióticos tetraciclina en muestras de miel y orina animal [26].

En este Capítulo se estudia la capacidad de las nanopartículas de óxido de terbio(III) ( $Tb_4O_7$  NPs) para originar luminiscencia sensibilizada como alternativa a los iones terbio(III) en disolución. Estas nanopartículas, que no presentan luminiscencia intrínseca, han sido empleadas como precursores para la síntesis de nanocristales de lantánidos [27] y materiales superconductores [28], pero sus aplicaciones analíticas han sido bastante limitadas. Con posterioridad al desarrollo del método incluido en esta Memoria se ha propuesto el uso de estas nanopartículas como reactivo derivatizante en cromatografía de líquidos, aplicándolo a la determinación de antibióticos quinolonas en muestras de leche [29]. También se ha descrito el efecto activador de estas nanopartículas sobre la enzima laccasa, lo que ha sido utilizado para la determinación de polifenoles en muestras de vino [30]. Más recientemente, se han usado como reactivo para la obtención de nanopartículas de  $Tb_2O_3$  por la acción del hongo *Fusarium Oxysporum* [31]. Se ha descrito la inocuidad de las  $Tb_4O_7$  NPs en las células de osteoblastos, lo que soporta su uso como reactivo analítico.

El método presentado en esta Memoria utiliza  $Tb_4O_7$  NPs comerciales para la obtención de luminiscencia sensibilizada, proponiendo por primera vez estos nanomateriales como alternativa a otros reactivos analíticos convencionales para la determinación de lasalocid y salicilato en muestras de alimentos. Previamente, se han descrito varios métodos para la determinación de estos compuestos basados en la formación de complejos luminiscentes con iones terbio(III) [32 - 34]. Por ello, en el trabajo desarrollado se ha realizado un estudio sistemático en el que se han comparado los resultados obtenidos utilizando  $Tb_4O_7$  NPs con los proporcionados utilizando iones terbio(III), demostrando la utilidad de estos nanomateriales como nuevos reactivos analíticos luminiscentes.



**REFERENCIAS**

- [1] B. Socas-Rodríguez, A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry, *J. Chromatogr. A*, 1357 (2014) 110-146.
- [2] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50-58.
- [3] C. Dhand, N. Dwivedi, X.J. Loh, A.N. Jie Ying, N.K. Verma, R.W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, S. Ramakrishna, *Methods and Strategies for the Synthesis of Diverse Nanoparticles and their Applications: A Comprehensive Overview*, *RCS Advances*, 127 (2015) 105003-105037.
- [4] O. Adegoke, P.B.C. Forbes, Challenges and advances in quantum dot fluorescent probes to detect oxygen and nitrogen species: A review, *Anal. Chim. Acta* 862 (2015) 1 – 13.
- [5] I. Costas-Mora, V. Romero, I. Lavilla, C. Bendicho, An overview of present advances in the application of quantum dots as luminescent probes to inorganic-trace analysis, *Trends Anal. Chem.* 57 (2014) 64 – 72.
- [6] D. Vilela, M.C. González, A. Escarpa. Nanoparticles as analytical tools for in-vitro antioxidant-capacity assessment and beyond, *Trends Anal. Chem.* 64 (2015) 1 – 16.
- [7] Y. Ma, S. Wang, L. Wang, Nanomaterials for luminescence detection of nitroaromatic explosives, *Trends Anal. Chem.* 65 (2015) 13 – 21.
- [8] L. Lin, M. Rong, F. Luo, D. Chen, Y. Wang, X. Chen, Luminescent graphene quantum dots as new fluorescent materials for environmental and biological applications, *Trends Anal. Chem.* 54 (2014) 83 – 102.

- [9] L. Fan, Y. Hu, X. Wang, L. Zhang, F. Li, D. Han, Z. Li, Q. Zhang, Z. Wang, L. Niu, Fluorescence resonance energy transfer quenching at the surface of graphene quantum dots for ultrasensitive detection of TNT, *Talanta* 101 (2012) 192 – 197.
- [10] Y.Q. Dong, G.I. Li, N.N. Zhou, R.X. Wang, Y.W. Chi, G.N. Chen, Graphene quantum dots as green and facile sensor for free chlorine in drinking water, *Anal. Chem.* 8 (2012) 8378 – 8382.
- [11] Y. Guo, L. Zhang, S. Zang, Y. Yang, X. Chen, M. Zhang, Fluorescent carbon nanoparticles for the fluorescent detection of metal ions. *Biosens. Bioelectron.* 63 (2015) 61 – 71.
- [12] P. Roy, P.C. Chen, A.P. Periasamy, Y.N. Chen, H.T. Chang, Photoluminescent carbon nanodots: synthesis, physicochemical properties and analytical applications, *Mat. Today* 18 (2015) 447 – 458.
- [13] J. Zhang, S.H. Yu, Carbon dots: large-scale synthesis, sensing and bioimaging, *Mat. Today* 19 (2016) 382 – 393.
- [14] X. Gao, C. Ding, A. Zhu, Y. Tian, Carbon-dot-based ratiometric fluorescent probe for imaging and biosensing of superoxide anion in live cells, *Anal. Chem.* 86 (2014) 7071 – 7078.
- [15] Y. Yan, J. Sun, K. Zhang, H. Zhu, H. Yu, M. Sun, D. Huang, S. Wang, Visualizing gaseous nitrous dioxide by ratiometric fluorescence of carbon nanodots-quantum dots hybrid, *Anal. Chem.* 87 (2015) 2087 – 2093.
- [16] C. Yu, X. Li, F. Zeng, S. Wu, Carbon-dot-based ratiometric fluorescent sensor for detecting hydrogen sulfide in aqueous media and inside live cells, *Chem. Comm.* 49 (2013) 403 – 405.

- [17] G. Mialon, M. Poggi, D. Casanova, T.L. Nguyen, S. Türkcan, A. Alexandrou, T. Gacoin, J.P. Boilot, Luminescent oxide nanoparticles with enhanced optical properties, *J. Luminesc.* 129 (2009) 1706 – 1710.
- [18] D. Giaume, V. Buisette, K. Lahlil, T. Gacoin, J.P. Boilot, D. Casanova, E. Beaurepaire, M.P. Sauviat, A. Alexandrou, Emission properties and applications of nanostructured luminescent oxide nanoparticles, *Progress Solid State Chem.* 33 (2005) 99 – 106.
- [19] C. Cháfer-Pericás, A. Maquieira, R. Puchades, Functionalized inorganic nanoparticles used as labels in solid-phase immunoassays, *Trends Anal. Chem.* 144 – 156.
- [20] R. Bazzi, M.A. Flores-Gonzalez, C. Louis, K. Lebbou, C. Dujardin, A. Brenier, W. Zhang, O. Tillement, E. Bernstein, P. Perriat, Synthesis and luminescent properties of sub-5-nm lanthanide oxides nanoparticles, *J. Luminesc.* 102-103 (2003) 445 – 490.
- [21] Y. Sohn, Contour mapping 2D and 3D-photoluminescence of Au-doped one-dimensional Eu(III) and Tb(III) hydroxide and oxide nanostructures, *Ceramics Int.* 39 (2013) 9157 – 9161.
- [22] A.J. Morales-Ramírez, A. Garcia-Murillo, F.J. Carrillo-Romo, A. Garrido-Hernández, M. García-Hernández, Influence of annealing temperature on structural and optical properties of  $\text{Lu}_2\text{O}_3:\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Tb}^{3+}$  transparent films, *Mat. Res. Bull.* 70 (2015) 173 – 178.
- [23] K. Kattel, J.Y. Park, W. Xu, H.G. Kim, E.J. Lee, B.A. Bony, W.C. Heo, Y. Chang, T.J. Kim, J.Y. Do, K.S. Chae, Y.W. Kwak, G.H. Lee, Water-soluble ultrasmall  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  nanoparticles as a fluorescent imaging agent: in vivo and in vivo studies, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 394 (2012) 85 – 91.

- [24] A. Olivera-Salazar, M. García-Hernández, P.Y. López-Camacho, A. López-Marure, A.I. Reyes de la Torre, A.J. Morales-Ramírez, F. Hernández-Santiago, L. Aguilera-Vázquez, Influence of  $\text{Eu}^{3+}$  doping content on antioxidant properties of  $\text{Lu}_2\text{O}_3$  sol-gel derived nanoparticles, *Mat. Sci. Eng. C* 69 (2016) 850 – 855.
- [25] N. Davidov, R. Zirov, A. Mustafina, V. Syakayev, D. Tatarinov, V. Mironov, S. Eremin, A. Konovaly, M. Mustafin, Determination of fluoroquinolone antibiotics through the fluorescent response of  $\text{Eu(III)}$  based nanoparticles fabricated by layer-by-layer technique, *Anal. Chim. Acta* 784 (2013) 65 – 71.
- [26] L. Aguilar-Vázquez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Development of an automatic high-throughput assay for tetracycline determination by using  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  nanoparticles and dry-reagent technology, *Talanta*, 119 (2014) 111 – 115.
- [27] S. Mukherjee, V. Sudarsan, R.K. Valsa, A.K. Tyagi, Luminescence studies on lanthanide ions ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$ ) doped  $\text{YAG:Ce}$  nano-phosphors, *J. Luminescence* 129 (2009) 69 - 72.
- [28] K. Vinod, N. Varghese, U. Syamaprasad, Shipra, A. Sundaresan, Structural and superconducting properties of bulk  $\text{MgB}_2$  with added nano  $\text{Tb}_4\text{O}_7$ . *Supercond. Sci. Technol.* 21 (2008) 025003 doi: 10.1088/0953-2048/21/02/025003.
- [29] G.S. Yáñez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens. Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles. *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 126-132.

- [30] J. Godoy-Navajas, M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens, Automatic determination of polyphenols in wines using laccase and terbium oxide nanoparticles, *Food Chem.* 166 (2015) 29 – 34.
- [31] S. Iram, S. Khan, A.A. Ansary, M. Arshad, S. Siddiqui, E. Ahmad, R.H. Khan, M.S. Khan, Biogenic terbium oxide nanoparticles as the vanguard against osteosarcoma *Spectrochim. Acta A* 168 (2016) 123 – 131.
- [32] M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Determination of lasalocid with sensitized terbium(III) luminescence detection, *Talanta* 48 (1999) 209 - 217.
- [33] E.J. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Fast determination of salicylic acid in pharmaceuticals by using a terbium-sensitized luminescent SIA optosensor, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008), 791 - 797.
- [34] S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Kinetic determination of salicylic acid, diflunisal and their mixture based on lanthanide-sensitized luminescence, *Anal. Chim. Acta* 329 (1996) 135 – 141.

## **Application of $Tb_4O_7$ Nanoparticles for Lasalocid and Salicylate Determination in Food Analysis**

María Luisa Castillo-García, María Paz Aguilar-Caballos and  
Agustina Gómez-Hens

*Department of Analytical Chemistry, Research Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry (IQFN),  
Campus of Rabanales, Marie Curie Building (Annex), University of Cordoba,  
14071-Cordoba, Spain*

The usefulness of  $Tb_4O_7$  nanoparticles (NPs) as analytical reagents using sensitized luminescence as detection system is described for the first time, and the results obtained are compared with those obtained using Tb(III) ions. Two drugs used in veterinary practice, namely, lasalocid (LAS) and salicylate (SAL), have been chosen as model analytes to carry out this study. The experimental conditions for these systems have been optimized, and their analytical features were obtained. The detection limits obtained for LAS and SAL using  $Tb_4O_7$  NPs were 1.0 and 4.0 ng mL<sup>-1</sup>, respectively, which were comparable to those obtained using Tb(III) ions: 1.8 and 1.0 ng mL<sup>-1</sup>, respectively. However, precision data, with relative standard deviation values in the range 2.3 – 3.8 % using the NPs and 3.5 – 6.5 % using Tb(III) ions, were slightly better for LAS with  $Tb_4O_7$  NPs. The practical analytical usefulness of  $Tb_4O_7$  NPs as luminescent reagents has been shown by performing the determination of LAS in tap water, feed premix and egg samples, obtaining recoveries in the range of 80.0 – 105.0%.

**KEYWORDS:**  $Tb_4O_7$  nanoparticles, sensitized luminescence, lasalocid and salicylate, food sample



## **I. INTRODUCTION**

Lanthanide-sensitized luminescence is widely used for analytical purposes [1,2], which can be attributed to the capability of Tb(III) and Eu(III) ions to form highly luminescent chelates with organic compounds by means of intramolecular energy transfer processes from the ligand to the lanthanide ion. Some features of these systems are the high spectral selectivity of the luminescence emission, which happens through the resonance levels of the lanthanide ion, the long decay time, and the large Stokes shift. Also, luminescence emission happens at relatively long wavelength, which avoids the background fluorescence from sample matrices that have shorter lifetimes and usually emit at shorter wavelengths.

The huge impact of nanotechnology in the analytical field has given rise to the development of luminescent lanthanide nanoparticles (NPs) based on the incorporation of a luminescent lanthanide chelate into organic polymer NPs, such as polystyrene NPs, or inorganic NPs, such as silica, zirconia or titania NPs [3]. Composite Tb(III)-acetylacetonate NPs have been used as reagent for the determination of salicylate (SAL) in pharmaceutical formulations and human plasma [4], obtaining a detection limit of 3.5 ng mL<sup>-1</sup>. The method involves an energy transfer process between SAL and the composite NPs, because to the spectral overlap between the fluorescence spectrum of SAL and the excitation spectrum of the NPs. Also, an efficient energy transfer process from benzoic acid to Tb(III) or Eu(III) has been demonstrated in benzoic acid-functionalized lanthanide-doped calcium fluoride NPs [5], but the potential analytical use of these NPs has not been described. Two methods have been reported for the determination of fluoroquinolones [6] and catecholamines [7] in pharmaceutical, urine, and serum samples based on the positive effect of silver NPs on the luminescence emission of the complexes of Tb(III) with these analytes, which is attributed to the interaction of the excited state of the luminescent complexes, and the surface plasmon electrons of silver NPs.



Nanostructures of some terbium oxides, such as  $Tb_2O_3$  [8-10], have found application in laser technology owing to their relatively high luminescence. However, other terbium oxides, such as  $Tb_4O_7$  NPs, do not show luminescence. These NPs, which contain at least some Tb(IV), along with the more stable Tb(III), have been used as precursors for the synthesis of lanthanide nanophosphors [11] and superconductor materials [12], but to the best of our knowledge, they have not been used for analytical purposes up to date. Thus, the study reported here constitutes the first attempt to use  $Tb_4O_7$  NPs as analytical reagents by checking their capability to obtain terbium-sensitized luminescence in the presence of lasalocid (LAS) and SAL. These compounds have been chosen as model analytes because they form luminescent complexes with Tb(III), which have been used for the development of very sensitive analytical methods [13-15]. A systematic study has been performed in order to compare the analytical features of the corresponding methods involving the use of Tb(III) ions and  $Tb_4O_7$  NPs as analytical reagents.

The structures of SAL and LAS, the latter being an antibiotic used for the prevention of coccidiosis, are shown in Figure 1. It can be seen that LAS contains a salicylate moiety and a long chain substituent, which provides it with ionophore activity.

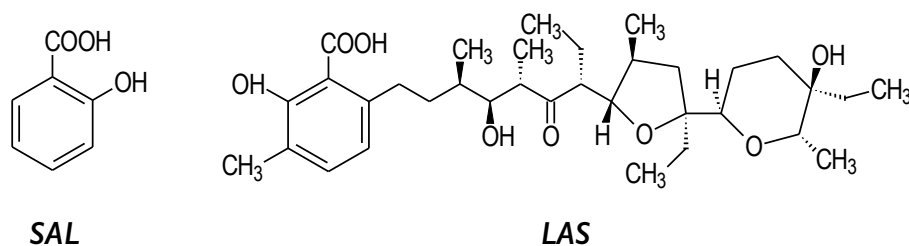


Figure 1. Chemical structures of SAL and LAS

The use of both drugs for veterinary purposes is allowed in Europe, according to the Commission Regulation 37/2010 [16], which defines Maximum

Residue Limit (MRL) for LAS. However, no limit has been defined for the veterinary use of SAL, which is restricted to topical treatments. SAL could also be present as a metabolite of acetylsalicylate, but its use is not allowed in milk-and/or egg-producing animals for human consumption. The determination of LAS in water and feed premix samples using Tb(III) as reagent has been previously described [13], but it has not been applied to the analysis of egg samples. However, the availability of a simple and fast method to detect the presence of LAS in these samples is of great interest because LAS can be present in egg samples even 9 days after treatment [17]. Shorter withdrawal periods would lead to LAS concentrations above its MRL with potential adverse effects on human health. With the aim of showing the analytical usefulness of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs, the method described here, involving the use of these NPs, has been applied for the first time to the determination of LAS in egg samples with satisfactory results.

Several liquid chromatographic methods have been described for LAS determination using fluorimetry [18-19] or mass spectrometry [20-21] as detection systems. These methods are the best option for multiresidue determination in biological matrices, in spite of the expensive instrumentation required. However, the results obtained in this study show the usefulness of a sensitized luminescence method, using a simple spectrofluorimeter, for the control of the poultry treatment with LAS for the prevention of coccidiosis. The high sensitivity and selectivity of the proposed method allow its application to the analysis of premix feed and egg samples after simple extraction and cleanup steps.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1. Apparatus**

An SLM Aminco (Urbana, IL, USA) Model 8100 photon counting spectrofluorometer, equipped with a 450 W xenon arc lamp and two R928 photomultiplier tubes was used to perform luminescence measurements using a

conventional 1 cm path-length quartz cell. The detector high voltage was set at 650 V with gain 100 for all the optimization studies in order to compare the signals obtained in each instance. This voltage value was then changed to obtain suitable instrumental conditions in order to choose the best calibration conditions for each system.

## 2.2. Reagents

All reagents were of analytical grade and used as purchased. Stock solutions of LAS and SAL ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$  each) were prepared by dissolving the standards in the minimum volume of methanol and then, raised up to mark with distilled water.  $\text{Tb}_4\text{O}_7$  nanopowder ( $<100 \text{ nm}$ , 99.5%) and Tb(III) nitrate pentahydrate (99.9%) were obtained from Aldrich (St. Louis, MO). A  $0.019 \text{ M}$  Tb(III) and a  $4.75 \text{ mM}$   $\text{Tb}_4\text{O}_7$  (equivalent to  $19 \text{ mM}$  in terbium) stock solutions were prepared in water and 2-propanol, respectively. A  $1.5 \text{ mM}$  tri n-octylphosphine oxide (TOPO) solution was prepared by dissolving the appropriate amount of TOPO (99%, Aldrich, Gillingham, Dorset, United Kingdom) in ethanol and then adding water dropwise until mark to be finally 80% in ethanol. A  $0.625 \text{ M}$  sodium hydroxide solution was prepared to adjust the pH of the alkaline medium. A  $0.2 \text{ M}$  solution of disodium ethylenediaminetetracetate (EDTA) was prepared by dissolving the appropriate amount of EDTA (Aldrich, Gillingham, Dorset, UK) in  $0.625 \text{ M}$  sodium hydroxide. Stock solutions of the surfactants cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ( $10^{-2} \text{ M}$ ) and Triton X-100 (0.1% w/v) (Fluka, Buchs, Switzerland) were prepared in distilled water. Imidazole (99%, Aldrich, Steinheim, Germany), hexamethylenetetramine (hexamine, Merck, Schuhard, Germany), and ammonium acetate (Aldrich, St. Louis MO, USA) were also used. Imidazole ( $0.1 \text{ M}$ , pH 6-8), hexamine ( $0.1 \text{ M}$ , pH 5.5-7.5), and ammonium acetate ( $0.1 \text{ M}$ , pH 6.0) buffer solutions were prepared by dissolving the appropriate amount of the compound in water and adjusting the pH with either hydrochloric acid or sodium hydroxide. High-performance liquid chromatography (HPLC)-grade 2-propanol and methanol (Panreac, Castellar del Vallès, Spain) were also used. Supel-select HLB SPE tubes ( $60 \text{ mg}/3 \text{ mL}$ ; Supelco, Bellefonte, PA) were

used to perform the cleanup of egg samples. The AVATEC feed premix sample was kindly donated by MIPROMA Productos Zoosanitarios S.L. (Seville, Spain).

### **2.3. Experimental procedures**

#### *2.3.1. Determination of lasalocid (LAS)*

Solutions containing LAS (3 – 4000 ng mL<sup>-1</sup>), Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs (62.5 μM, equivalent to 0.25 mM terbium ions), TOPO (50 μM), Triton X-100 (0.08%), hexamine buffer solution (1 mM, pH 6.2) and 2-propanol (2.5%) were prepared in 5 mL volumetric flasks. The luminescence intensity was measured at λ<sub>ex</sub> 318 nm and λ<sub>em</sub> 545 nm after 5 min, using an 8 nm bandwidth for both excitation and emission slits.

#### *2.3.2. Determination of salicylate (SAL)*

Solutions containing SAL (20 – 1250 ng mL<sup>-1</sup>), Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs (0.11 mM, equivalent to 0.44 mM terbium), TOPO (75 μM), Triton X-100 (0.04%), imidazole buffer solution (3.25 mM, pH 7.2) and 2-propanol (2.5%) were prepared in 5 mL volumetric flasks. The determination of SAL also can be carried out in alkaline medium preparing solutions containing SAL (40 – 2500 ng mL<sup>-1</sup>), Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs (0.19 mM, equivalent to 0.75 mM terbium), EDTA (2.5 mM), CTAB (75 μM) and NaOH (0.055 M) in 5 mL volumetric flasks. The luminescence intensity was measured in both instances under the instrumental conditions above described.

#### *2.3.3. Determination of LAS in poultry-related samples*

*Tap water.* A volume (2.5 mL) of sample was mixed with the reagents using the experimental conditions above-described.

*Feed premix.* An amount (0.5 g) of the AVATEC premix sample was extracted with 25 mL of ethanol acidified with 0.5 mL of concentrated HCl in an ultrasonic bath at 40 °C for 20 min. Then, the extraction was continued for 1 h using mechanical stirring at room temperature. The suspension was filtered, the filter was

washed with ethanol, and the solution was raised up to 100 mL with this solvent. This solution was 100-fold diluted with water to match the dynamic range of the calibration curve, and 0.25 mL of this solution was treated following the above-mentioned procedure for LAS determination using  $Tb_4O_7$  NPs as reagent.

*Egg.* An amount (0.4 g) of homogenized sample spiked with appropriate LAS amounts to be in the final range of 75 – 150  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (0.5 MRL, 0.66 MRL and 1.0 MRL) [16] and allowed to equilibrate for 30 min, was extracted with 1.5 mL of an ethanol solution acidified with HCl (at final concentration of 11%). The suspension was placed in an ultrasonic bath at 40 °C for 20 min and then centrifuged at 537 g for 15 min and the supernatant was kept. This extraction was repeated and both extracts were combined and diluted to 50 mL with distilled water. Afterwards, a cleanup step was performed by a solid-phase extraction (SPE) procedure using polymeric HLB cartridges previously conditioned using 6 mL of methanol and 6 mL of acidified water with HCl (pH 1.2). Once the samples were applied, cartridges were washed using 5 mL of a 5% ethanol aqueous solution. Finally, LAS retained was eluted using 1 mL of a 95% ethanol/5%  $10^{-2}$  M  $NH_3$  solution. A volume (700  $\mu\text{L}$ ) of this solution was treated with 35  $\mu\text{L}$  of 0.1 M HCl in order to adjust the pH and was subjected to the procedure above-described for LAS determination.

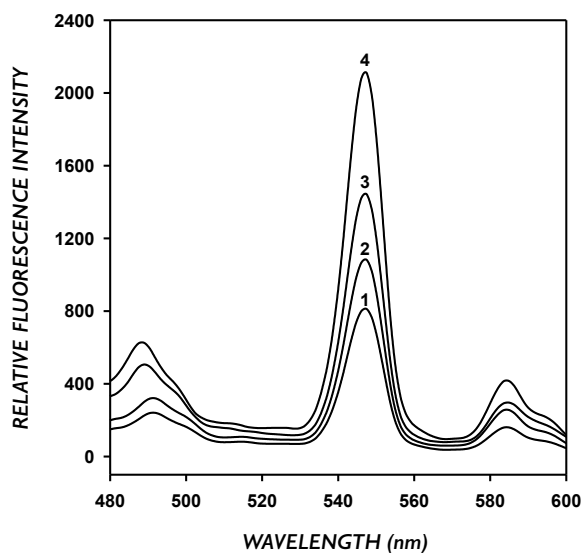
### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### **3.1. Preliminary studies on the luminescent systems**

Several assays were carried out to study the potential usefulness of  $Tb_4O_7$  NPs as analytical reagent for LAS and SAL determination. The results obtained were compared with those obtained in the presence of Tb(III) ions, using the same equivalent terbium concentration in all instances. This consideration has been made from a theoretical point of view, bearing in mind the oxide stoichiometry. It is quite improbable that the analytes can get into the core of  $Tb_4O_7$  NPs, so the available terbium concentration would be lower for  $Tb_4O_7$  NPs than for terbium(III) ions. The insolubility of  $Tb_4O_7$  NPs in water made necessary to study their dispersion in

different solvents, such as 2-propanol, methanol, ethanol, toluene, and polyethylene glycol solutions, finding the best results with 2-propanol, which was also used in the assays using Tb(III).

Although it is known that the luminescence sensitized intensity can be improved in the presence of a synergetic agent and a micellar medium, preliminary assays were carried out in their absence to compare the behavior of the NPs and Tb(III) with the selected analytes. Figure 2 shows the emission spectra obtained for LAS and SAL in the presence of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs and Tb(III) ions ( $\lambda_{\text{ex}}$  318 nm), in which can be seen that all the systems show the typical bands described for terbium-sensitized luminescence with maximum emission at 545 nm. The luminescence intensity obtained for NPs-LAS system was higher than that obtained for Tb(III)-LAS system, but an opposite effect was observed for SAL. The presence of a synergetic agent and a micellar medium increased the luminescence of these systems, as it is described below.



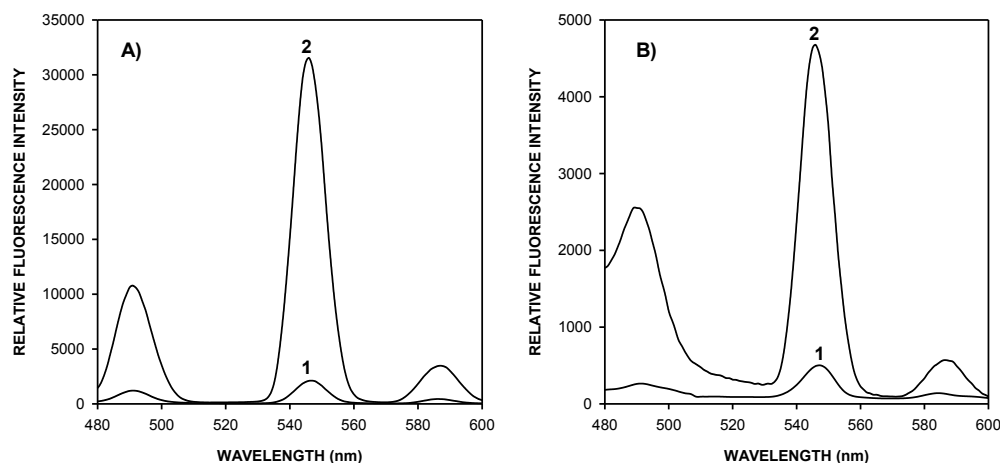
**Figure 2.** Emission spectra obtained for LAS (1 and 3) and SAL (2 and 4) using Tb(III) ions (1 and 4) and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs (2 and 3) as reagents ( $\lambda_{\text{ex}} = 318$  nm). Conditions: [equivalent terbium] = 0.25 mM, pH 6.0, and [2-propanol] = 2.5%. [LAS] = [SAL] = 1000 ng mL<sup>-1</sup>.

### 3.2. Optimization of variables

Variables affecting the systems were optimized using the univariate method. Those values yielding the best luminescence signals with minimum standard deviation for the variables involved were taken as optimal.

The study of the influence of pH in the range of 5.5 – 8.0 showed that this variable has a similar effect in the luminescence intensity obtained for both LAS and SAL using Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs or Tb(III) ions. The optimum pH range was 6.0 - 6.5 for LAS systems and 7.0 - 7.5 for SAL systems. Hexamine, imidazole, and ammonium acetate buffer solutions were assayed to adjust the pH of LAS and SAL systems using Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs or Tb(III) ions. A 1.0 mM hexamine buffer solution (pH 6.2) was chosen for LAS systems, and a 3.25 mM imidazole buffer solution (pH 7.2) was selected for SAL systems.

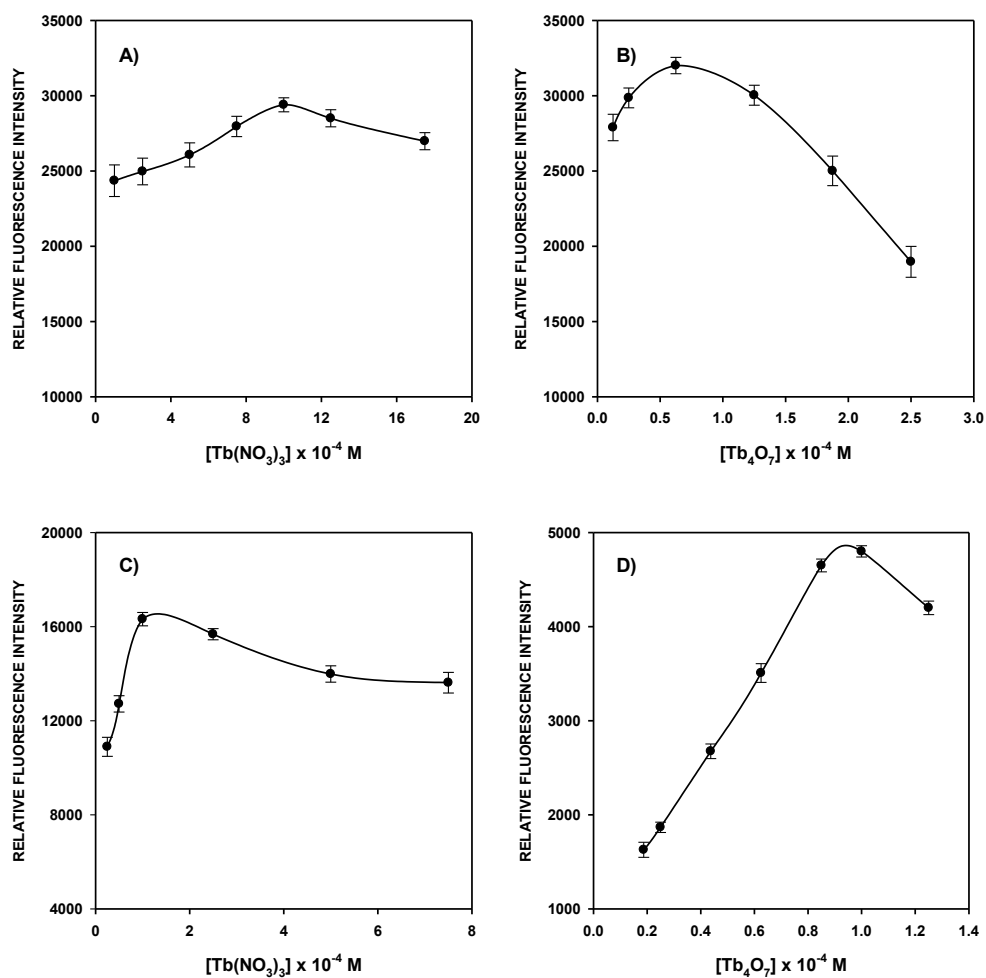
Taking into consideration that the presence of a synergistic reagent such as TOPO and a surfactant such as Triton X-100 notably improve the luminescence of the Tb(III)-LAS system [13], the influence of the concentration of these variables on the LAS and SAL systems was comparatively studied using Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs and Tb(III) ions. The results obtained showed that TOPO, at the concentration range of  $4 \times 10^{-5}$  -  $8 \times 10^{-5}$  M, has a similar positive effect on both LAS and SAL systems using NPs or Tb(III) ions. The study of the effect of Triton X-100 concentration, above its critical micellar concentration, showed that the luminescence intensity of LAS systems was independent of this variable in the range 0.04 – 0.12%, whereas the optimum concentration range for SAL systems was 0.03 - 0.06%. The luminescence intensity of all the systems in the presence of both TOPO and Triton X-100 was about 10 times higher than that obtained in their absence. This positive effect is shown in Figure 3 for both LAS and SAL systems in the presence of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs.



**Figure 3.** Emission spectra obtained for LAS (A) and SAL (B) systems in the absence (1) and the presence (2) of TOPO and Triton X-100. Conditions: In A and B, [2-propanol] = 2.5%. In A, [LAS] = 1000 ng mL<sup>-1</sup>, [Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NP] = 62.5 μM, and [hexamine] = 1 mM, pH 6.2; in A.2, [Triton X-100] = 0.08% and [TOPO] = 50 μM; in B, [SAL] = 1000 ng mL<sup>-1</sup>, [Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NP] = 0.11 mM, and [imidazole] = 3.25 mM, pH 7.2; and in B.2 [Triton X-100] = 0.04%, and [TOPO] = 75 mM.

Figure 4 shows the comparative study of the influence of terbium ions and terbium NPs on both LAS and SAL systems. As can be seen, the luminescence obtained for the Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs–LAS system was higher than that obtained for Tb(III)-LAS, but an opposite behavior was observed for the SAL systems. The optimum Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NP concentration ranges for LAS and SAL systems were  $3 \times 10^{-5} - 10 \times 10^{-5}$  M and  $8 \times 10^{-5} - 12 \times 10^{-5}$  M, respectively, whereas the optimum Tb(III) ions concentration ranges were  $8 \times 10^{-4} - 16 \times 10^{-4}$  M and  $8 \times 10^{-5} - 12 \times 10^{-5}$  M, respectively. These results show that the optimum NPs concentration for LAS system is about 10-times lower than the Tb(III) concentration, whereas this difference is not observed for the SAL system. This behavior could be explained by the fact that the chemical structure of LAS is more planar than that of SAL, which favors a more efficient energy transfer process.





**Figure 4.** Influence of Tb(III) ion (A and C) and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs (B and D) concentrations on LAS (1000 ng mL<sup>-1</sup>) (A and B) and SAL (1000 ng mL<sup>-1</sup>) (C and D) systems. In A and B, [Triton X-100] = 0.08%, and [hexamine] = 1 mM, pH 6.2. In C and D, [Triton X-100] = 0.04%, [imidazole] = 3.25 mM, pH 7.2. In all instances, [TOPO] = 5 × 10<sup>-5</sup> M, and [2-propanol] = 2.5%.

The study of the influence of the 2-propanol percentage on the LAS and SAL systems, in the range of 2.5 – 20%, showed that the maximum signal was obtained for both Tb(III)-LAS and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs-LAS systems in the range of 2.5 - 10%

2-propanol. However, the luminescence intensity of both systems decreased at higher 2-propanol percentages, which could be attributed to the capability of the solvent to destruct the micelles, which shield the chelates and favor the intramolecular energy transfer process [13]. The presence of 2-propanol on the SAL systems, using Tb(III) ions or NPs, caused a more negative effect since the luminescence decreased up to 8 times when the percentage was increased from 2.5 to 10%. This difference could be mainly attributed to the fact that LAS is more hydrophobic than SAL, owing to presence of the relatively long chain substituent group in the LAS molecule.

As the determination of SAL using Tb(III) ions in alkaline medium has been previously described [15], the potential usefulness of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs as reagent in this medium also has been studied. The performance of terbium-sensitized luminescence in alkaline medium requires the addition of a strong chelating agent, such as EDTA, to prevent the precipitation of the lanthanide hydroxide, and the use of a cationic surfactant, such as cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), to improve the luminescence signal. Several assays were carried out to study the capability of the LAS systems, using Tb(III) ions and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs, to obtain sensitized luminescence in alkaline medium, but the results obtained were not satisfactory. Thus, the comparative study using Tb(III) and NPs was only carried out for the SAL systems. Several experimental variables, including pH and EDTA, CTAB, Tb(III) ions, and NPs concentrations were optimized, obtaining that the luminescence intensity using the NPs was about 10 times lower than that obtained using Tb(III) ions. These results show that the analytical usefulness of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs in alkaline medium is limited.

### **3.3. Analytical features**

The features of the analytical methods developed for LAS and SAL determinations under the optimal experimental variables, using Tb(III) ions and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs, are summarized in Table I.

**Table I.** Analytical features of the optimized systems

| system  | Tb(III)-LAS   | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -LAS                             | Tb(III)-SAL  | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|---|---|---|--|-------------------------------------|
| <b>linear range</b><br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | 5 – 300<br>300 – 5000   | 3 – 700<br>700 – 4000   | 3– 250<br>250 – 2500                                       | 20 – 1250                           |
| <b>slope ± SD</b>                             | 144 ± 2<br>6.4 ± 0.2  | 44.0 ± 0.8<br>4.72 ± 0.08                                       | 97 ± 2<br>13.9 ± 0.9                                       | 9.7 ± 0.8                           |
| <b>Y-intercept</b>                            | (1.9 ± 0.2) × 10 <sup>1</sup><br>(-1.0 ± 0.2) × 10 <sup>1</sup> | (1.0 ± 0.3) × 10 <sup>1</sup><br>(-1.3 ± 0.8) × 10 <sup>2</sup> | (2.0 ± 0.9) × 10 <sup>1</sup><br>(9 ± 1) × 10 <sup>2</sup> | (5.0 ± 0.4) × 10 <sup>1</sup>       |
| <b>regression coefficient (r)</b>             | 0.9991<br>0.992   | 0.998<br>0.999  | 0.996<br>0.990   | 0.998                               |
| <b>LOD</b><br>(ng mL <sup>-1</sup> )          | 1.8   | 1.0   | 1.0  | 4.0                                 |
| <b>precision</b><br>(%RSD)                    | 6.5 (10.0) <sup>a</sup><br>4.3 (100.0)                          | 3.8 (5.0)<br>2.3 (100.0)  | 4.4 (5.0)<br>3.5 (100.0)                                   | 3.6 (50.0)<br>2.8 (200.0)           |

<sup>a</sup>Analyte concentration assayed, ng mL<sup>-1</sup> (n = 10)

The wide dynamic ranges of the calibration graphs required the use of two different instrumental sensitivities, except for the NPs-SAL system, obtaining two linear ranges that show different slopes and y-intercepts. The regression coefficients obtained in all instances are indicative of the good calibration linearity. Both the detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were calculated according to IUPAC recommendations [22]. The LOQ values correspond to the lowest analyte concentrations of the dynamic range of the calibration curves. The low values obtained for these parameters show that both Tb(III) ions and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs can be used as reagents for the sensitive determination of LAS and SAL. As can be seen, the LOD for LAS with Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs was about two times lower than that obtained using

Tb(III) ions. Table I also shows the precision data, expressed as the percentage of relative standard deviation (%RSD), for the four systems. The precision values obtained using NPs were slightly lower than those obtained using Tb(III) ions.

The selectivity of the Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs-LAS system was studied by assaying different antibiotics of veterinary use belonging to the ionophore group, such as monensin and salinomycin, or to other antibiotic groups such as aminoglycosides, sulfonamides, tetracyclines, fluoroquinolones, macrolides, and colistin (Table 2).

**Table 2.** Influence of other antimicrobial agents on the 0.1 mg mL<sup>-1</sup> LAS determination by using Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs

| <b>compound</b>   | <b>maximum tolerated<br/>interferent:analyte ratio<sup>a</sup></b> |
|-------------------|--|
| monensin          | 75   |
| gentamycin        | 50   |
| streptomycin      | 40   |
| neomycin          | 40   |
| salinomycin       | 25   |
| sulphamerazine    | 15   |
| spectinomycin     | 10   |
| marbofloxacin     | 5  |
| sulphanilamide    | 5  |
| tylosin           | 5  |
| colistin          | 5  |
| erythromycin      | 4  |
| tetracycline      | 4  |
| chlortetracycline | 4  |
| oxytetracycline   | 4  |

<sup>a</sup>The maximum tolerated ratio assayed was 100-fold of the analyte concentration

The maximum concentration tested for all these compounds was  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , when a  $100 \text{ ng mL}^{-1}$  LAS concentration was assayed. A compound was considered not to interfere at a given concentration when the analytical signal obtained in the presence of this substance was within one standard deviation of the value obtained in its absence. All the compounds assayed were tolerated at higher concentration levels than that of LAS, so that they do not interfere LAS determination at the permitted MRL for these compounds in veterinary samples. Although the interaction of fluoroquinolones with terbium ions has been previously reported [6,23,24], their use is not allowed in animals producing eggs according to 37/2010 regulation. However, marbofloxacin, which was assayed as model compound belonging to this group, was tolerated in a 5-fold excess. The presence of tetracyclines, which can be used in egg-producing animals, caused a decrease of the analytical signal. The use of calcium ions, which have been reported to complex tetracyclines [25] was checked out to avoid this interference, finding that the tolerated ratio increased to 4-fold that of LAS concentration in the presence of  $7.0 \text{ mM}$  calcium ions. A  $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$  tetracycline concentration, which corresponds to the tolerated ratio, is well above its MRL, thus being the selectivity of this method ensured for this purpose.

### 3.4. Applications

The proposed method for LAS determination using  $\text{Tb}_4\text{O}_7$  NPs was applied to the analysis of tap water, feed premix (the commercial brand name AVATEC) and egg samples (Table 3). The feed premix sample is used for the therapeutic control of LAS in poultry and poultry-related food production. The analysis of tap water was directly performed without any sample treatment, whereas an extraction step with acidified ethanol, following previously described methods [13,18], was required for the feed premix sample analysis and an additional SPE cleanup step for the egg analysis. The standard addition method was applied in all instances. LAS was not detected in the water and egg samples, while the content found in the feed premix sample ( $13.9 \pm 0.5\%$ ) was slightly lower than the nominal value reported (15%) in the technical sheet provided by the manufacturer [26]. A recovery study

was carried out by adding three different amounts of LAS to each sample. The results were in the range of 80.0 – 105.0% with a mean value of 96.0%. The mean recovery obtained for the feed premix sample was 99.7%, very similar to that previously reported using Tb(III) [13] (100.9%).

**Table 3.** Determination of LAS in poultry-related food samples

| sample      | LAS concentration <sup>a</sup> |                    |                      |              |
|-------------|--------------------------------|--------------------|----------------------|--------------|
|             | content <sup>a,b</sup>         | added <sup>a</sup> | found <sup>a,b</sup> | recovery (%) |
| tap water   | ---                            | 40                 | 42 ± 3               | 105.0        |
|             |                                | 60                 | 57 ± 4               | 95.0         |
|             |                                | 80                 | 78 ± 4               | 97.5         |
| feed premix | 13.9 ± 0.5                     | 2                  | 2.00 ± 0.09          | 100.0        |
|             |                                | 4                  | 3.9 ± 0.1            | 97.5         |
|             |                                | 6                  | 6.1 ± 0.2            | 101.7        |
| hen egg     | ---                            | 75                 | 60 ± 4               | 80.0         |
|             |                                | 100                | 91 ± 7               | 91.1         |
|             |                                | 150                | 144 ± 5              | 96.0         |

<sup>a</sup>Units: water samples (ng mL<sup>-1</sup>); feed premix (%); egg sample (µg Kg<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup>Mean ± SD (n=3)

The present work has demonstrated for the first time the usefulness of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs to be sensitized by two model analytes, LAS and SAL, which have previously proven its ability to produce sensitized luminescence using Tb(III) ions [13-15]. The similar analytical features of the corresponding methods, using Tb(III) and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs, show that these NPs are suitable alternative reagents for LAS and SAL determination using sensitized luminescence. Also, the analytical applicability of these

NPs has been demonstrated by the results obtained in the analyzed samples, which enables their use for the analytical control of poultry-derived foods during and after therapeutic treatment with LAS.

The commercial availability of these NPs facilitates their use as analytical reagents, as the synthesis step is avoided. Also, the cost of the assay using  $Tb_4O_7$  NPs is lower than using Tb(III) ions as the amount required is 10 times lower and the prices for both reagents are similar.

#### **ACKNOWLEDGMENTS**

We gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN (Grant No. CTQ2009-08621) and from the Junta de Andalucía and the FEDER-FSE Program (Grant No.P09- FQM4933).

#### **ABBREVIATIONS USED**

NPs, nanoparticles; LAS, lasalocid; SAL, salicylate; MRL, maximum residue limits; MS, mass spectrometry; TOPO, tri n-octylphosphine oxide; EDTA, ethylenediaminetetracetate; CTAB, cetyltrimethylammonium bromide; HPLC, high performance liquid chromatography; SPE, solid phase extraction; LOD, limit of detection; RSD, relative standard deviation.

## REFERENCES

- [1] Gómez-Hens, A.; Aguilar-Caballos M.P. Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 131 - 141.
- [2] Hagan, A.K.; Zuchner T. Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2847 - 2864.
- [3] Yuan, J.; Wang, G. Lanthanide-based luminescence probes and time-resolved luminescence bioassays. *Trends. Anal. Chem.* **2006**, *25*, 490 - 500.
- [4] Karim, M. M.; Alam, S. M.; Lee, S.H. Application of a lanthanide composite nanoparticles-sensitized luminescence method for the determination of salicylic acid in pharmaceutical formulations and human plasma. *Luminescence* **2008**, *23*, 417 - 423.
- [5] Wang, J.; Wang, Z.; Li, X.; Wang, S.; Mao, H.; Li, Z. Energy transfer from benzoic acid to lanthanide ions in benzoic acid-functionalized lanthanide-doped CaF<sub>2</sub> nanoparticles. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 7145 – 7149.
- [6] Kamruzzaman, M.; Alam, A.M.; Lee, S.H.; Suk Suh, Y.; Kim, Y.H.; Kim, G.M. ; Kim, S.H. Method for the determination of fluoroquinolones based on the plasmonic interaction between their fluorescent terbium complexes and silver nanoparticles. *Microchim. Acta.* **2011**, *174*, 353 – 360.
- [7] Alam, A.M.; Kamruzzaman, M.; Lee, S.J.; Kim, Y.H.; Kim, S.Y.; Kim, G.M.; Jo, H.J.; Kim, S.H. Determination of catecholamines based on the measurement of the metal nanoparticle-enhanced fluorescence of their terbium complexes. *Microchim. Acta.* **2012**, *176*, 153 – 161.
- [8] Bazzi, R.; Flores-Gonzalez, M.A.; Louis, C.; Lebbou, K.; Dujardin, C.; Brenier, A.; Zhang, W.; Tillement, O.; Bernstein, E.; Perriat, P. Synthesis and



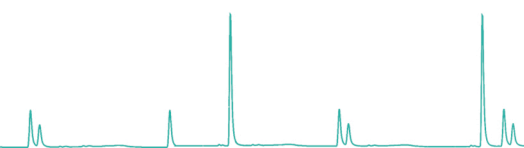
- luminescent properties of sub-5-nm lanthanide oxides nanoparticles. *J. Luminescence*. **2003**, 445 – 450, 102-103.
- [9] Shilov, S.M.; Gavronskaya, K.A.; Levkin, A.N.; Pak ,V.N. Molecular layering method used to sensitize luminescence from terbium(III) oxide nanoparticles in porous glass. *Russian J. Appl. Chem.* **2008**, 81, 1754 - 1757.
- [10] Wakefield, G.; Keron, H.A.; Dobson, P.J.; Hutchinson, J.L. Structural and optical properties of terbium oxide nanoparticles. *J. Phys. Chem. Solids*. **1999**, 60, 503 - 508.
- [11] Mukherjee, S.; Sudarsan, V.; Valsa, R.K.; Tyagi, A.K. Luminescence studies on lanthanide ions ( $\text{Eu}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  and  $\text{Tb}^{3+}$ ) doped YAG:Ce nano-phosphors. *J. Luminescence*. **2009**, 129, 69 - 72.
- [12] Vinod, K.; Varghese, N.; Syamaprasad, U.; Shipra; Sundaresan, A. Structural and superconducting properties of bulk  $\text{MgB}_2$  with added nano  $\text{Tb}_4\text{O}_7$ . *Supercond. Sci. Technol.* **2008**, 21, 025003 doi: 10.1088/0953-2048/21/02/025003.
- [13] Aguilar-Caballeros, M.P.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito D. Determination of lasalocid with sensitized terbium(III) luminescence detection. *Talanta* **1999**, 48, 209 - 217.
- [14] Llorent-Martínez, E.J.; Domínguez-Vidal, A.; Ortega-Barrales, P.; Molina-Díaz, A. Fast determination of salicylic acid in pharmaceuticals by using a terbium-sensitized luminescent SIA optosensor. *J. Pharm. Sci.* **2008**, 97, 791 - 797.
- [15] Panadero, S.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D. Kinetic determination of salicylic acid, diflunisal and their mixture based on lanthanide-sensitized luminescence. *Anal. Chim. Acta* **1996**, 329 135 - 141.

- [16] Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Union*, **2010**, L15, 1 – 72.
- [17] Opinion of the committee for medicinal products for veterinary use: LASALOCID (extension in eggs), *EMEA/CVMP/201708/2007-Final*. May **2007**, 1 - 3.
- [18] Focht, C.; Campbell, H.; Dagleish, J.; DeAtley, A.; Eigen, S.; Farrow, M.; Graham, P.; Gramse, M.; Henry, J.; Kirby, P.; Lanthier, J.; Larson, R.; Lavack, B.; Mace, R.; Marshall, D.; Pleasants, S.; Riter, K.; Schrier, N.; Sensmeier, R.; Singh, D.; Smith, B.; Tripp D.; Wagner, B.; Wetzler, L.; Williams, S. Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed-phase liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC Int.* **2008**, 91, 479 - 488.
- [19] Oruc, H.H.; Cangul, I.T.; Cenguz, M.; Yilmaz, R. Acute lasalocid poisoning in calves associated with off-label use. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* **2010**, 34, 187 - 189.
- [20] Galarini, R.; Fioroni, L.; Moretti, S.; Pettinacci, L.; Dusi, G. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. *Anal. Chim. Acta* **2011**, 700, 167 - 176.
- [21] Gentili, A.; Pret, D.; Marchese, S. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 704 - 733.
- [22] Long, G.; Winefordner, J.D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* **1983**, 55, 712A – 724A.

- [23] Rodríguez-Díaz, R.C.; Fernández-Romero, J.M.; Aguilar-Caballo, M.P.; Gómez-Hens, A. Determination of fluoroquinolones in milk samples by post-column derivatization liquid chromatography with luminescence detection. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9670 – 9676.
- [24] Rodríguez-Díaz, R.C.; Fernández-Romero, J.M.; Aguilar-Caballo, M.P.; Gómez-Hens, A. Chromatographic determination of flumequine in food samples by post-column derivatisation with terbium(III). *Anal. Chim. Acta.* **2006**, *578*, 220 – 226.
- [25] Chen, Y.; Li, H.; Wang, Z.; Tao, T.; Hu, C. Photoproducts of tetracycline and oxytetracycline involving self-sensitized oxidation in aqueous solutions: Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ . *J Environ. Sci.* **2011**, *23*, 1634 – 1639.
- [26] Technical sheet of AVATEC 150 g product. Alpharma, inc., <http://alpharma.com>, March 19, **2004**.







# CAPÍTULO III



NUEVAS ESTRATEGIAS EN  
CROMATOGRFÍA CON EL  
USO DE NANOMATERIALES

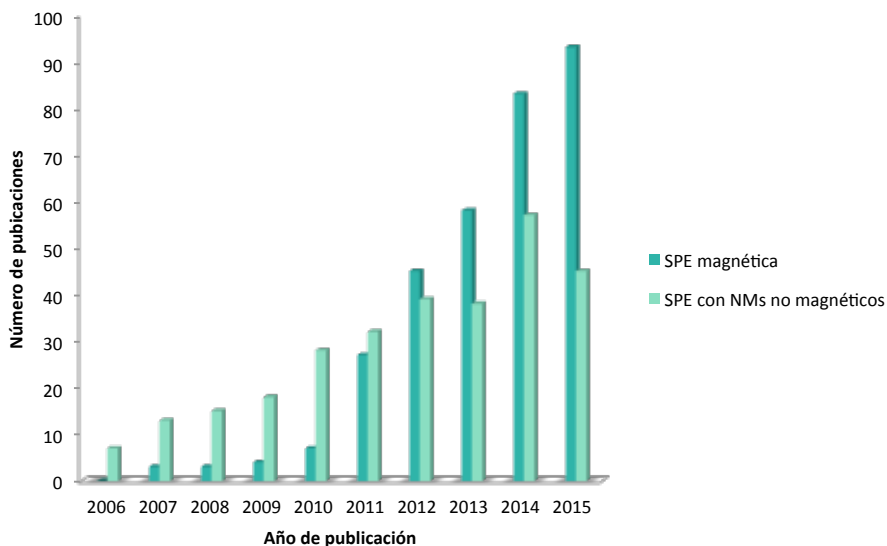


**E**n este Capítulo se presentan las investigaciones realizadas con el objetivo de demostrar y ampliar la aplicabilidad de los nanomateriales para el desarrollo de métodos cromatográficos. Dichas investigaciones han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- Nanomaterials as tools in chromatographic methods. M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens. *Trends in Analytical Chemistry*, 82 (2016) 385–393.
- A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples. M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens. *Journal of Chromatography A*, 1425 (2015) 73-80.

El primer artículo es una revisión bibliográfica sobre la utilidad de los nanomateriales como herramientas analíticas en métodos cromatográficos, considerando las tres etapas básicas del proceso analítico: tratamiento de muestra, separación cromatográfica y derivatización-detección. De ellas, la primera etapa es la que más se ha beneficiado del uso de nanomateriales, utilizándolos básicamente como sorbentes en técnicas de extracción en fase sólida (SPE) [1, 2]. Dentro de estas técnicas, es de destacar la contribución de las nanopartículas magnéticas, lo que ha dado lugar a la SPE magnética. En la Figura III.1 se representa la evolución de la SPE con el uso de nanomateriales magnéticos y no magnéticos en métodos cromatográficos a través del número de artículos publicados en los últimos diez años. Puede observarse que la SPE magnética ha presentado un crecimiento exponencial en los últimos seis años, mientras que la SPE con otros tipos de nanomateriales ha tenido una evolución más moderada.





**Figura III.1.** Evolución de SPE con el uso de nanomateriales, magnéticos y no magnéticos, previa a métodos cromatográficos a lo largo de los últimos 10 años (fuente: Scopus)

La rápida aceptación de la SPE magnética para el tratamiento de muestra es atribuible a las especiales características de los nanomateriales magnéticos, entre las que cabe destacar, además de su elevada relación superficie/volumen, común a los nanomateriales en general, la simplicidad de sus procedimientos de síntesis y su fuerte magnetismo, lo que permite la separación rápida y sencilla de la matriz de la muestra con ayuda de un campo magnético externo. También presentan otras propiedades tales como una adecuada dispersión en agua, baja toxicidad y buena biocompatibilidad. Sin embargo, estos nanomateriales no están exentos de limitaciones, ya que son poco selectivos y tienden a la agregación, las cuales pueden solventarse mediante la modificación de sus superficies (funcionalización), lo que mejora su selectividad, previene la oxidación, evita la agregación y aumenta sus propiedades sorbentes.

El segundo trabajo incluido en este Capítulo ha contribuido a expandir la aplicabilidad analítica de la SPE magnética mediante la síntesis y caracterización de un

nuevo nanomaterial híbrido magnético recubierto con iones terbio(III) y europio(III). Este nanomaterial se ha utilizado como sorbente para el tratamiento de muestra previo a la separación de quinolonas y tetraciclinas mediante UPLC.

Aunque existen algunos antecedentes bibliográficos en los que se utilizan conjuntamente la extracción de estos compuestos y su separación cromatográfica con detección UV [3,4], fluorimétrica [5,6] o de espectrometría de masas [7,8], es la primera vez que se emplea este tipo de nanomateriales para la extracción selectiva de quinolonas y tetraciclinas. Se han utilizado otros materiales magnéticos modificados con nanotubos de carbono [9], polímeros de impresión molecular [10] y hemimicelas de dodecilsulfato sódico [11] para la extracción en fase sólida dispersiva de diversas fluoroquinolonas en muestras biológicas y de aguas [9-11]. Asimismo, se ha descrito el uso de nanomateriales magnéticos híbridos de grafeno y nanotubos de carbono [12] y otros nanomateriales magnéticos recubiertos de sílice funcionalizada con grupos fenilo [13] para la determinación de tetraciclinas en muestras de diferente origen, tales como aguas residuales [12] y leche [13]. Los mecanismos de retención se basan en interacciones de afinidad, hidrofóbicas, electrostáticas, interacciones  $\pi$ - $\pi$  y enlaces de hidrógeno [9,10,12]. En todos los casos se requirió el uso de disolventes orgánicos (1-2 mL), tales como metanol o acetonitrilo, para eluir los analitos de interés del nanomaterial. Sin embargo, en el método presentado en esta Memoria, basado en la formación de quelatos de las quinolonas y tetraciclinas con los iones terbio(III) y europio(III), respectivamente, la elución se realiza mediante disoluciones de sales, evitando el uso de disolventes orgánicos.

## REFERENCIAS

- [1] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 9-25.
- [2] Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen, Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 26-41.
- [3] H.B. He, C. Dong, B. Li, J.P. Dong, T.Y. Bo, T.L. Wang, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, Fabrication of enrofloxacin imprinted organic-inorganic hybrid mesoporous sorbent from nanomagnetic polyhedral oligomeric silsesquioxanes for the selective extraction of fluoroquinolones in milk samples, *J. Chromatogr. A*, 1361 (2014) 23 – 33.
- [4] L. Wang, Q. Yuan, G. Liang, L. Shi, Q. Zhan, Magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the extraction and rapid determination of six fluoroquinolones in environmental water samples, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 996 – 1001.
- [5] I. Jiménez-Díaz, M.P. Hermo, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, D. Barrón, J. Barbosa, A. Navalón, Comparison of three analytical methods for the determination of quinolones in pig muscle samples, *Chromatographia* 76 (2013) 707 – 713.
- [6] J.L. Urraca, M. Castellari, C.A. Barrios, M.C. Moreno-Bondi, Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 1 – 9.
- [7] L. Lucatello, P. Cagnardi, F. Capolongo, C. Ferraresi, F. Bernardi, C. Montesissa, Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for

- the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys, *Food Control* 48 (2015) 2 – 11.
- [8] M. Bourdat-Deschamps, S. Leang, N. Bernet, J.J. Daudin, S. Nélieu, Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by on-line solid-phase extraction-ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction, *J. Chromatogr. A* 1349 (2014) 11 – 23.
- [9] M. Amoli-Diva, K. Pourghazi, S. Hajjarian, Dispersive micro-solid phase extraction using magnetic nanoparticle modified multi-walled carbon nanotubes coupled with surfactant-enhanced spectrofluorimetry for sensitive determination of lomefloxacin and ofloxacin from biological samples, *Mat. Sci. Eng. C* 60 (2016) 30 – 36.
- [10] H.B. Zheng, J.Z. Mo, Y. Zhang, Q. Gao, J. Ding, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, Facile synthesis of magnetic molecularly imprinted polymers and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in milk samples, *J. Chromatogr. A* 1329 (2014) 17 – 23.
- [11] L. Wang, Q. Yuan, G. Liang, L. Shi, Q. Zhan, Magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the extraction and rapid determination of six fluoroquinolones in environmental water samples, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 996 – 1001.
- [12] Y. Sun, J. Tian, L. Wang, H. Yuan, F. Qiao, X. Qiao, One pot synthesis of magnetic graphene/carbon nanotube composites as magnetic dispersive solid-phase extraction adsorbent for rapid determination of oxytetracycline in sewage water, *J. Chromatogr. A* 1422 (2015) 53 – 59.

- [13] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, Trends Anal. Chem. 5 (2014) 50 – 58.



## **Nanomaterials as tools in chromatographic methods**

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

*Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Cordoba, Annex to Marie Curie (C-3) building, Campus of Rabanales, 14071-Córdoba, Spain*

The impact that different nanomaterials have had on improving the features of chromatographic methods is critically discussed and evaluated in this review. Although the use of nanomaterials in the main three steps of chromatographic methods (sample treatment, chromatographic separation and derivatization-detection) has been widely revised, considering individually each of these steps, this review is focused to assess the real benefits that nanotechnology has provided in chromatographic determinations. Several articles have been selected for this purpose, in which the results obtained in the presence and the absence of nanomaterials are critically compared. Also, the advantages and limitations of the nanomaterials used in each step of the chromatographic process are discussed.

**KEYWORDS:** *Nanoparticles, chromatography, sample treatment, columns, derivatization systems*

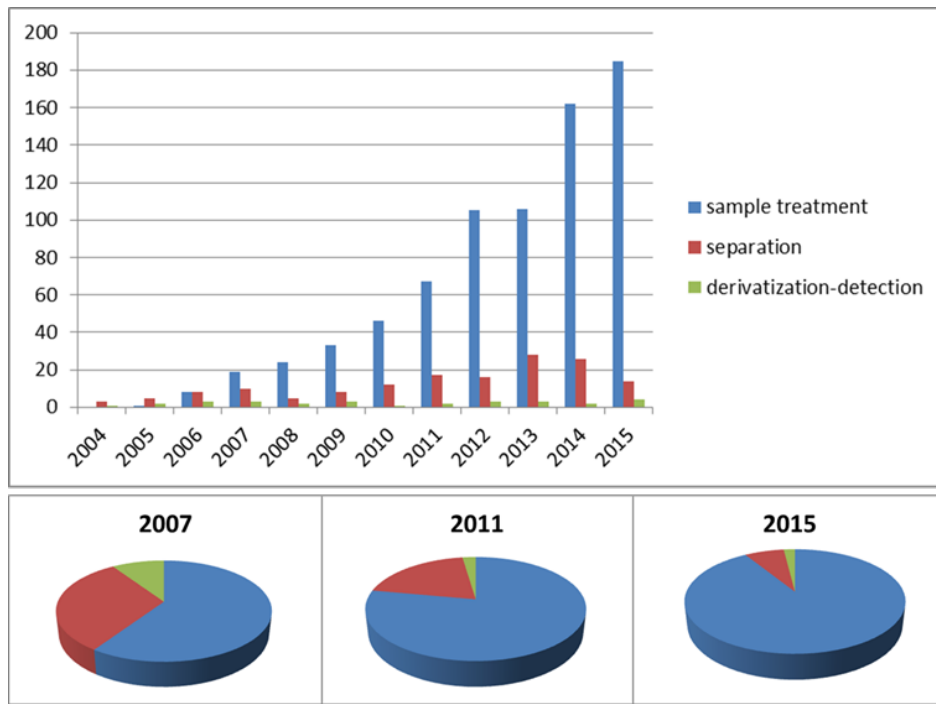


## ***1. INTRODUCTION***

The availability of reproducible methods for the synthesis of different types of nanomaterials (NMs) and suitable techniques for their characterization has allowed their wide application to improve the features of analytical methods, mainly their selectivity and sensitivity. From the high number of articles involving NMs and analytical determinations that can be found in different databases, it can be inferred that about a thirty per cent of these articles are related with the use of chromatographic techniques. This relatively high percentage shows the important role that the integration of nanoscience and nanotechnology is having in these separation techniques.

Figure 1 shows the exponential growth of the number of articles involving NMs and chromatography published in the main analytical journals in the last twelve years. This figure also indicates the number of articles devoted to each basic step of the chromatographic process, namely sample treatment, separation and derivatization-detection. The analysis of the distribution of these articles in three years, 2007, 2011 and 2015, shows a clear trend to increase the use of NMs in the sample treatment step, thus decreasing the percentage of articles devoted to the other two steps. This evolution can be ascribed to the great impact of different NMs, mainly magnetic nanoparticles (MNPs), to improve the separation of the analytes from the sample matrix, giving rise to useful approaches alternative to conventional solid phase extraction (SPE). However, as described below, there are also very interesting examples of the positive contribution of different NMs to provide new stationary phases that enhance the chromatographic resolution and to improve the derivatization-detection step.





**Figure 1.** Evolution of the number of articles about the use of NMs in the three steps (sample treatment, separation and derivatization-detection) of chromatographic methods, published in the main analytical journals in the last twelve years. The percentage of articles devoted to each step, published in the years 2007, 2011 and 2015, is also shown (Source: Scopus 2016, Elsevier B.V.)

The aim of this review is to present a critical overview and a systematic discussion of the outstanding role of NMs in the three steps of chromatographic processes, by choosing articles in which, after comparative studies in the absence and in the presence of NMs, the better results obtained in the latter case justify their use.

## 2. SAMPLE TREATMENT

Sample treatment has been the most benefited step from the use of NMs in the chromatographic process, as it has been indicated above and can be inferred from the numerous reviews devoted to this topic [1-10]. These reviews give a

general overview of the use of different NMs as solid sorbents, including carbon NMs, such as fullerenes, carbon nanotubes (CNTs), graphene and reduced graphene oxide, and metal oxide NMs, such as iron, titanium and zirconium oxides. The applicability of these NMs for sample preparation, previous to the chromatographic separation, is described through extensive tables indicating the main features of the developed methods. However, in most instances, these reviews do not include any comparison of quantitative data that show the usefulness of NMs. Thus, a few selected examples are discussed in this section, giving particular emphasis to the advantages that different NMs offer in the sample treatment step.

### **2.1. Conventional solid phase extraction**

The use of NMs as sorbents in SPE has been widely revised [1-4,8,11], discussing in general their advantages (large specific surface area, easy functionalization, high adsorption capacity and pre-concentration factors, and reusability) and limitations (high pressure in the SPE column, low selectivity, formation of aggregates and potential leakage from the column). For instance, multiwalled-CNTs (MWCNTs) are widely used as sorbent materials in SPE due to their extremely large surface area and strong sorption properties. These properties are ascribed to electrostatic interactions, such as dipole-dipole, hydrogen bonds,  $\pi$ - $\pi$  stacking, dispersion forces, dative bonds and hydrophobic effect. However, a limitation of these NMs is the formation of aggregates that diminishes the surface/area ratio. Also, the small particle size of the CNTs results in compaction of the sorbent when relatively high flow rates are used, which forces to decrease the flow rate, lengthening significantly the preconcentration time when high sample volumes are used. This situation is shown in a method for the determination of several therapeutic drugs in water samples using MWCNTs, with an average external diameter of 6 - 13 nm and a length of 2.5 - 20  $\mu$ m, as the sorbent material in SPE, previous to the determination using LC-MS [12]. The use of the MWCNT cartridge allowed a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>, whereas commercial Oasis columns allow flow rates in the range of 10-15 mL min<sup>-1</sup>.

A possible solution to this problem is the use of a MWCNTs/poly(vinyl alcohol) (PVA) cryogel composite, which has been described for the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from water samples [13]. This approach combines the high adsorption ability of the CNTs with the high porosity of the cryogel, reaching high enrichment factors (100 - 2000) and extraction efficiencies (91 - 99%). Compared with commercial C<sub>18</sub> cartridges, MWCNTs/PVA cartridges allowed the use of a sample flow-rate two-times higher, resulting in a shorter analysis time.

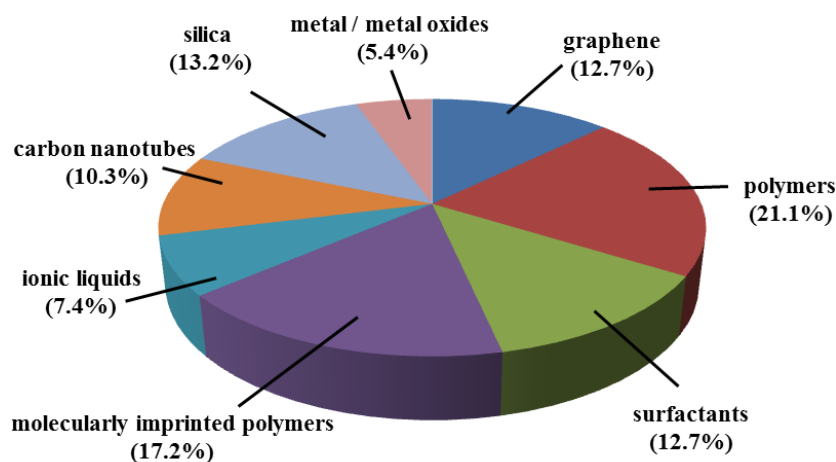
## **2.2. Dispersive solid phase extraction**

A modification of conventional SPE is dispersive solid phase extraction (d-SPE), in which the extraction is carried out in the bulk solution instead of the column. This technique has found a wide development with the use of NMs, which are usually coated with a sorbent and dispersed into the sample solution, interacting with the analytes. After extraction, the sorbent containing the target analytes is isolated by centrifugation or collected by filtration, and the analytes are eluted or desorbed with a suitable desorption solvent. This approach overcomes the limitations of conventional SPE, such as the time-consuming process of loading large-volume of sample and the high pressure and the blockage probability of the SPE cartridge in analysing samples containing particulate matter [2,3].

The availability of magnetic nanoparticles (MNPs) has allowed the development of magnetic solid-phase extraction (MSPE), which is a type of d-SPE that involves the use of a magnetic nanosorbent uniformly dispersed into the sample solution. The analytes are adsorbed onto the nanosorbent under stirring, which is recovered from the solution using an external magnet. After the elution of the analytes from the nanosorbent, the external magnet is used again to separate the nanosorbent from the solution. This approach allows rapid extractions with high efficacies, owing to the large surface area-to-volume ratio of the magnetic nanosorbent, which facilitates mass transfer between the MNPs and sample solution,

shortens the extraction time and avoids the centrifugation or filtration step required in conventional d-SPE.

The increasing use of MSPE has been possible due to the development of new methodologies for the synthesis of suitable MNPs that can selectively interact with the analytes [14]. Magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) and maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) are the most often used MNPs, which are coated with inorganic or organic substances to improve the sorption properties of MNPs by suitable functional groups and to prevent their oxidation. Among inorganic substances, silica [2,6,7,14], metal and metal oxides [1,7], CNTs [1-3,5,14] and graphene [1,2,7,8] have been widely used, whereas polymers [14], molecularly-imprinted polymers (MIPs) [1,14], ionic liquids (ILs) [7] and surfactants [6,10] are examples of organic substances described to prepare modified MNPs. Figure 2 shows the distribution percentages of different types of MNPs used in MSPE methods, previous to the chromatographic separations, in the last five years. Several examples of the analytical usefulness of some of these methods are discussed below.



**Figure 2.** Main types of modified magnetic NMs reported for MSPE prior to chromatographic separation in the period 2011-2015 (Source: Scopus 2016, Elsevier B.V.)

Silica is frequently used for coating the MNPs owing to its high thermal and mechanical stability and the easy modification of its surface by binding inorganic or organic species or NMs [6]. For instance, the determination of PAHs in water samples by MSPE and GC-MS has been described using three types of MNPs coated with silica, which was functionalized with C<sub>18</sub> [15], an IL [16] and divinylbenzene together with sulfonate groups (DVB- SO<sub>3</sub>Na) [17]. Although other types of MNPs have been described for PAH determination using LC and different detectors, these examples have been chosen because the use of GC-MS in the three methods selected allows the differences in their features to be mainly ascribed to the treatment step. Table I shows the average particle size, extraction time, limit of detection (LOD) and recoveries obtained from the analysis of water samples using the three methods. As can be seen, the method involving Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DVB-SO<sub>3</sub>Na shows the lowest LODs, about 1300 - 2400-times and 70 - 500-times lower than those obtained using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-IL, respectively.

**Table I.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using MSPE and GC-MS

| Sorbent  | Average particle size (nm) | Extraction time (min) | Detection limits (pg mL <sup>-1</sup> ) | Recovery (%) (water samples) | Ref. |
|--|----------------------------|-----------------------|---|------------------------------|------|
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -C <sub>18</sub>        | 230                        | 5                     | 800 - 5100                              | 35 - 93                      | 15   |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -IL                     | 12                         | 7                     | 40 - 1050                               | 83 - 102                     | 16   |
| Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -DVB-SO <sub>3</sub> Na | 70                         | 10                    | 0.6 - 2.1                               | 79.9 - 115.3                 | 17   |

An interesting feature of the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-DVB-SO<sub>3</sub>Na NPs is the presence of hydrophobic DVB moieties for the PAH extraction and hydrophilic sulfonate groups for improving the dispersion of the MNPs in aqueous sample solution. In addition to the relatively high LODs obtained using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-C<sub>18</sub> NPs, another limitation of this

method is the poor recoveries obtained for low molecular weight PAHs, which could be in part ascribed to the higher size of the particles (200-260 nm), decreasing the specific area in contact with the analytes.

Magnetic-MWCNTs (m-MWCNTs) have been widely described as sorbents in MSPE [3-5]. For instance, they have been used to extract nerve agents from distilled, tap and muddy water samples, which were then eluted and analyzed by GC-FPD [18]. A comparative study between the sorption capacity of m-MWCNTs and MWCNTs in MSPE and conventional SPE, respectively, showed that the recoveries obtained using SPE (62.1 - 102.6%) were slightly better than those obtained using MSPE (59.7 - 96.3%). This difference was ascribed to the less available surface area of m-MWCNTs because the Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>NPs were spread over the surface of MWCNTs, reducing the interaction with the analytes. The sorption capacity of m-MWCNTs was also compared with that of C<sub>18</sub> sorbent in SPE, obtaining in the latter instance worse recoveries (12.8 - 57.9%). Also, MSPE was found to be advantageous over conventional SPE in terms of operational simplicity, speed, handling of large sample volumes and recoveries.

The extraction of several sulfonamide antibiotics from water samples by d-SPE, using both magnetic and non-magnetic MWCNTs, has been combined with ultra-high performance LC (UHPLC) and diode array detection [19]. Although the use of m-MWCNTs facilitates the extraction step, the recoveries obtained (22 - 77%) were lower than those obtained using pristine MWCNTs (40 - 110%).

Graphene-based magnetic NPs combine the high adsorption capacity of graphene with the easy separation of magnetic materials. In addition to its mechanical, thermal, electronic properties and ultra-high specific area, graphene can form a strong  $\pi$ - $\pi$  stacking interaction with carbon-based ring structures via the large delocalized  $\pi$ -electron system. These NPs have been used in MSPE for the determination of carbamate pesticides in tomatoes coupled with LC and

photometric detection [20]. The extraction efficiency was about 75 - 85%, better than that obtained using reduced graphene oxide (rGO) (55 - 65%), which was ascribed to the potential contribution of the iron-containing MNPs to the adsorption capacity of the nanocomposites. The LODs obtained (0.58 - 2.06 ng g<sup>-1</sup>) were better than those obtained using dispersive liquid-liquid microextraction (1.4 - 2.8 ng g<sup>-1</sup>) [21] and microwave-assisted extraction (9.9 ng g<sup>-1</sup>) [22], using in all instances LC with photometric detection. MNPs attached to rGO have been used as sorbent in MSPE for the determination of anthraquinones in a medicinal plant and biological fluids using UHPLC coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [23]. Compared with the analysis of standard solutions, without MSPE treatment, the LODs achieved using MSPE were 360 - 925-fold lower.

Several core-shell MNPs involving polydopamine [24], poly(divinylbenzene-co-metacrylic acid) [25] and palmitate [26] to coat the MNPs have been used for the extraction of estrogenic compounds from water samples prior to LC-MS [24,25] or GC-MS [26] determination. The best recoveries were obtained for MNPs coated with palmitate (95 - 110%), which provided a preconcentration factor of 100, whereas the recovery values using MNPs coated with polydopamine and poly(divinylbenzene-co-metacrylic acid) were in the ranges of 70 - 119% and 56 - 111%, respectively.

Another type of MNPs are magnetic molecularly imprinted NPs (MMINPs), which are usually prepared through polymerization of thin imprinted shells with specific recognition sites complementary to the shape, size, and functional groups of predetermined analytes on the surface of magnetic supportors. These NPs integrate magnetic susceptibility and merits of MIP into one entity. MMINPs have been used for the extraction of 17-beta-estradiol (E2) from water samples, prior to its determination by LC-UV [27], using gelatin as functional monomer and E2 as template. Gelatin contains abundant active groups including -NH<sub>2</sub>, -COOH and -OH and possesses native hydrophilic and hydrophobic segments in each single

polypeptide chains. This structure allows that gelatin can react with E2 through hydrogen bond and hydrophobic interactions. The extraction efficiency of E2-MMINPs for E2 was in the range of 91.3% - 98.3% in different water samples. The LOD was 0.04 ng mL<sup>-1</sup>, which is lower than those obtained using molecularly imprinted d-SPE (4.6 ng mL<sup>-1</sup>) [28] and hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction (0.66 ng mL<sup>-1</sup>) [29], which were also used previously to the LC-UV determination.

Surfactant-coated MNPs is another option widely applied in MSPE for the preconcentration of analytes, using dual mechanisms of both hydrophobic and electrostatic interactions [10]. For instance, anionic perfluorinated compounds have been extracted from water samples using CTAB-MNPs [30] and hexadecyldimethyl amine-MNPs [31], obtaining recoveries in the range of 84.5 - 106.4% and 81.0 - 103.2%, respectively, which were better than those obtained using liquid-liquid extraction (60 - 70%) [32] or conventional SPE (57 - 103%) [33].

An example of multifunctional MNPs is the use of a europium and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in MSPE for the simultaneous separation of tetracyclines and quinolones from complex matrices [34]. After the magnetic separation, which was based on the ability of these lanthanide ions to form selective chelates with these antibiotics, UHPLC with fluorimetric detection was used for the determination of these analytes.

The selective interaction of boronic acid groups with o-phenolic hydroxyl groups of catecholamines has been applied to the separation and enrichment of these compounds from urine in a MSPE method using aminophenylboronic acid functionalized MNPs followed by LC and electrochemical detection. Enrichment factors of 13 - 17-fold and recoveries in the range of 92 - 108% were obtained [35]. These values were better than those obtained using a crown ether modified resin as



sorbent in conventional SPE previous to LC with electrochemical detection, which were in the range of 79.1 - 94.8% [36].

### **2.3. Solid phase microextraction**

Another technique in which different NMs have shown their usefulness is solid phase microextraction (SPME), which involves the use of a syringe-like device fitted with a needle that contains a fiber or a wire coated with a thin layer of a sorbent [8,9,37]. The extraction is performed by either immersing the fiber in the liquid sample or extracting the analytes from the headspace above the sample (HS-SPME). After the extraction step, the fiber or the wire is withdrawn from the sample and the analytes are thermally desorbed when GC is used, or eluted with a suitable solvent in LC. Chemical, thermal and mechanical stability of the fiber and the reproducibility are critical factors in SPME [8].

A polypropylene hollow fiber containing a sol-gel-derived  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  core-double shell nanocomposite has been described as sorbent in SPME coupled with LC for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human hair [38]. An interesting feature of this method is the high preconcentration factors obtained, defined as the ratio of the analyte concentration in the acceptor phase to its initial concentration in the donor phase, which were in the range 405 - 2450. These high values were ascribed to the enhanced sorption capacity of titania/silica mixed oxides compared to pure titania, due to the high dispersion of titania in the silica support, which improves the adsorption of the analytes.

## **3. CHROMATOGRAPHIC SEPARATION**

A variety of NMs, such as metal oxide, carbon (CNTs, fullerenes, graphene), gold and silver NPs have been assayed to improve the features of GC [4,39-41] and LC columns [4,39-48]. The main goals of using these new stationary phases are to increase the contact surface area with the solutes, and to improve the selectivity,

arising from the unique adsorption properties of the NPs, the separation efficiency and mechanical properties. Some examples are discussed below.

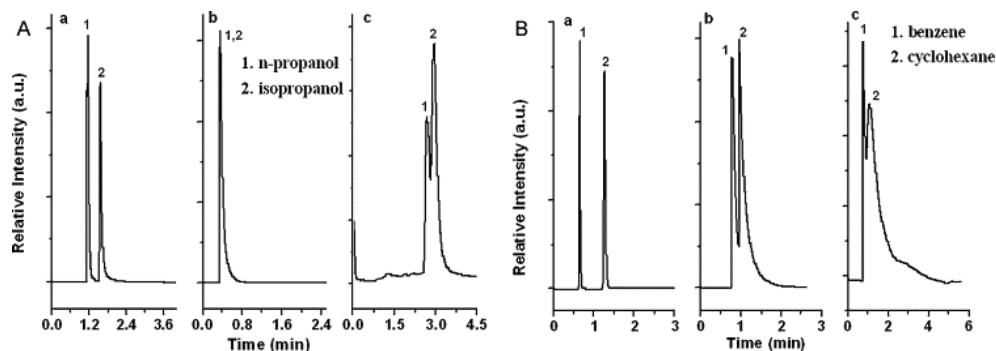
### **3.1. Gas chromatographic separation**

NMs have been used either as supports for stationary phases or as stationary phases by themselves in GC. Among the different NMs, CNTs are suitable candidates for this purpose owing to their excellent thermal and mechanical stability and adsorption properties. For instance, a packed column with MWCNTs has been used in GC for the separation of aromatic hydrocarbons, alkanes, halogenated hydrocarbons, alcohols, ketones, esters, and ethers [49]. The results obtained with this column were compared to those obtained using graphitized carbon black (Carbopack B). The MWCNT column showed stronger retention and more symmetric peaks than the Carbopack column. This behavior was ascribed to the cavities of CNTs, which slow the diffusion of the solutes and reduce the theoretical plate number. Thus, the theoretical plate number for benzene, dichlorobenzene and n-hexane were in the range 1497-1727 and 480-530 using Carbopack B and MWCNT columns, respectively. Regarding the separation of alcohols, the peaks obtained using the Carbopack column were asymmetric and tailing, showing some irreversible interactions between the packing material and alcohols, which was ascribed to the heterogeneous surface and the presence of residual hydrophilic groups. However, a better chromatogram with regard to peak shape and resolution was obtained using the MWCNT column because it has a more homogeneous surface and a small number of hydrophilic groups.

The use of ILs as stationary phases in GC has increased in last years owing to their low volatility, good thermal stability and variable polarities. A limitation of open capillary columns treated with IL is their small loading capacity, but it can be improved by coating the inner capillary wall with CNTs affording a larger surface area followed by modification with the IL. Thus, single-walled CNTs (SWCNTs) have been used to improve enantioseparations on a chiral IL [(R)-N,N,N-trimethyl-2-

aminobutanol-bis(trifluoromethanesulfon)imidate] stationary phase in GC [50]. A comparative study was carried out by assaying twelve racemates in an open column containing the chiral IL alone and in another similar column containing also the SWCNTs. The results obtained showed that the column that did not contain SWCNTs was only able to separate the enantiomers of four racemates, whereas eight chiral compounds were separated using the column with SWCNTs bonded to the inner wall. The resolution enhancement of the SWCNT column was ascribed to the formation of a layer with a skeletal network structure on the inner wall of the capillary tubing, which increases the surface area and the interactions between the chiral stationary phase and the analytes.

An IL-dispersed silica NPs (IL-SN) capillary column for GC has been described, which combines the advantages of IL, mentioned above, and those of silica NPs, such as large surface area and highly dispersed behavior [51]. By dispersing silica NPs in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([Bu-MIm][BF<sub>6</sub>]), a 0.4 - 0.6  $\mu\text{m}$  thick layer of homogeneous, interconnected particulate silica networks was formed in the capillary column. Mixtures of a wide range of organic compounds including alcohols, esters, alkanes, aromatic compounds, as well as isomers and non-polar compounds, were separated using the IL-SN capillary column. The results obtained were compared to those obtained with capillary columns containing only silica NPs or the IL. Better results were obtained in all instances with the IL-SN column, which allows the separation of both polar and non-polar compounds. For instance, the chromatograms obtained for a mixture of the isomers n-propanol-isopropanol and for a mixture of the non-polar compounds benzene and cyclohexane, which have very similar boiling points, 80.1°C and 80.7°C, respectively, using the three columns are shown in Figure 3. As can be seen, only the IL-SN column allowed the separation of both types of compounds. A comparative study of the column efficiency for n-butanol using IL-SN, silica and IL columns showed that the values obtained were 3030, 588 and 666 plates/m, respectively, which demonstrates the usefulness of the IL-SN column.



**Figure 3.** Chromatograms of *n*-propanol and isopropanol (A) and benzene and cyclohexane (B) mixtures using IL-SNs (a), SNs (b) and IL (c) capillary columns. Column temperature was 50 °C. [Reproduced from [51]]

### 3.2. Liquid chromatographic separation

Different NMs have been also used to improve the separation in LC. For instance, the separation of peptides has been studied by incorporating SWCNTs in a silica LC column [52]. The efficiency of this column, given by the height equivalent to a theoretical plate (HETP) was 7.10  $\mu\text{m}$ , whereas a similar size  $\text{C}_{18}$  column in the same experimental chromatographic conditions afforded a HETP value of 11.5  $\mu\text{m}$ . The presence of SWCNTs in the column allowed the separation of twelve peptides in about 8 min, which was not possible using the  $\text{C}_{18}$  column.

MWCNTs grafted by  $\gamma$ -radiation onto silica microspheres, in the presence of polybutadiene (PB), have been used as a LC stationary phase for the separation of several aromatic compounds [53]. PB acts as a linking agent and as a coating layer of the silica microspheres, to which CNTs are anchored through stable chemical bonds formed via radical chain reaction with the polymer. The retention factors of benzene, toluene and *p*-xylene on the CNT column were in the range 2 - 5, whereas they were in the range 6 - 20 on a commercial  $\text{C}_{18}$  column. The retention times for the same solutes on the CNT and  $\text{C}_{18}$  columns were in the range 6 - 13 min and 13 - 40

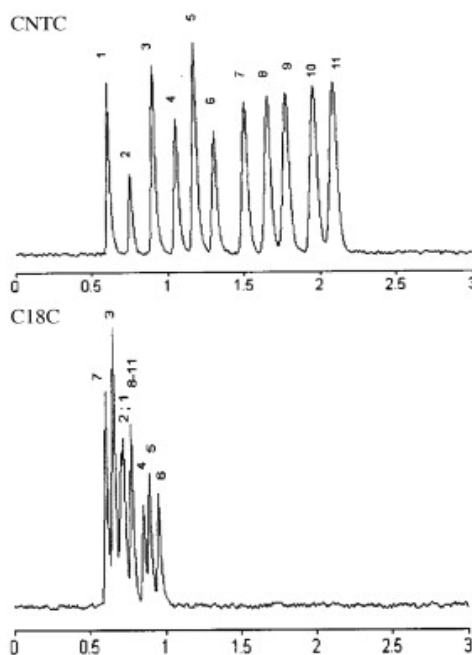
min, respectively, which demonstrates that the CNT column allows shorter analysis times.

The suitability of mercaptopropylsilica (Si-RSH) as a stationary phase for reversed-phase LC has been compared to that of Si-RSH coated with AgNPs (Si-RSH-AgNP), by studying the separation of more than 40 compounds, including pyridines, phenols, anilines and benzoic acids, among others [54]. The majority of the analytes were retained stronger on Si-RSH-AgNP, which was associated with the increase in surface area of original Si-RSH after coating with AgNPs. Moderate hydrophobic and hydrogen bonding interactions were identified for both of chromatographic phases, while much stronger retention of aromatic bases (pyridines, anilines) was observed on the Si-RSH-AgNP column because of electron donor-acceptor interactions. For instance, the retention time for pyridine was about 10-times longer using the AgNPs modified stationary phase, whereas that for 4-benzylpyridine was about 50-times longer. However similar retention times were obtained for benzoic acids and phenols using both stationary phases.

The modification of both silica [41,44] and polymer based [41,43,44,47] monolithic columns with NMs has give rise to new materials with high porosity, diverse surface chemistry and large specific surface area, which have a great potential as new stationary phases for chromatographic separations. However, the research in this field began only a few years ago and it may require further efforts to reach its maturity [44]. Two examples of the applicability of these columns are given below.

A stationary phase based on SWCNTs adsorbed on a monolithic silica column has been used for the separation of eleven small aromatic compounds such as phenol and naphthalene derivatives [55]. The separation only required about 2.5 min and the minimum HETP was around 3.6  $\mu\text{m}$ , whereas the value obtained using an equivalent  $\text{C}_{18}$  monolithic column was around 10  $\mu\text{m}$ . Figure 4 shows the different behavior of the solutes assayed in both chromatographic columns, under similar

experimental conditions. As can be seen, the presence of SWCNTs allows the separation of the eleven solutes assayed, obtaining sharp and symmetric peaks, which was not possible using the C<sub>18</sub> monolithic column.



**Figure 4.** Chromatograms for the separation of phenol (1), aniline (2), cathecol (3), 4-methoxy-phenol (4) 4-ethoxy-phenol (5), 4-propioxy-phenol (6), 3-nitro-phenol (7), 2,3-dihydroxynaphthalene (8) 1,3-dihydroxynaphthalene (9), 2,3-dinitronaphtalene (10) and 1,3-dinitronaphthalene (11) on the CNT modified column (CNTC) and the commercial C<sub>18</sub> column (C18C). [Reproduced from [55]]

MWCNTs have been incorporated into a benzyl methacrylate monolithic column to study its applicability as stationary phase in capillary LC for the separation of mixtures of ketones and phenols [56]. Six capillary columns with increasing amounts of MWCNTs, from 0 to 4 mg mL<sup>-1</sup>, were evaluated, finding that they were mechanically stable while their porosity and permeability increased with the MWCNT content. Compared with the monolithic material in the absence of CNTs,

the incorporation of MWCNTs slightly affected the retention but it increased the column efficiency by a factor of up to 9, improving the resolution and allowing the full separation of the solutes.

#### **4. POST-COLUMN DERIVATIZATION AND DETECTION**

The use of NMs in this step of the chromatographic process has been more limited than in the treatment and separation steps, although there are several interesting examples involving most of them the use of metal NPs. These NPs have been used either as post-column derivatization reagents or as electrode modifiers to improve the electrochemical detection.

##### **4.1. Derivatization systems**

Metal NPs have been widely described as post-column derivatizing reagents using: 1) their aggregation induced by the analytes and measuring absorbance or resonance light scattering [57,58], and 2) their catalytic effect in different chemiluminescent systems, which is modified in the presence of the analytes [59,60].

The aggregation of AuNPs by thiol-containing analytes is a relatively slow process but it can be accelerated by using suitable capping ligands for AuNPs [57,58]. Among other biothiols, cysteine has been quantified, after chromatographic separation, using Brij35-capped AuNPs and photometric measurements [61], and fluorosurfactant-capped AuNPs and resonance light scattering measurements [62]. A limitation of these methods is the narrow dynamic range of the calibration graphs, which was narrower using absorbance (3.0 - 10  $\mu\text{M}$ ) than resonance light scattering (5.0 - 50  $\mu\text{M}$ ) measurements.

The chemiluminescent luminol-hydrogen peroxide-AuNPs system has shown its usefulness for post-column derivatization of thiol and phenolic compounds, which is based on the inhibition caused by these compounds on the catalytic effect of AuNPs [59,60]. The chromatograms obtained show negative peaks with a very high

background signal, which affects the sensitivity of the methods. An alternative approach has been described for phenolic compounds determination, where these compounds promoted the on-line formation of the AuNPs, using  $\text{HAuCl}_4$  as derivatizing reagent [63]. The *in situ* formed NPs catalyze the luminol-hydrogen peroxide chemiluminescent reaction, showing the chromatograms positive peaks with very low background signals, obtaining better LOD values. Thus, the LODs reported for phenolic compound determination using AuNPs were in the range of 20.6 - 57.0  $\text{ng mL}^{-1}$ , whereas those obtained using  $\text{HAuCl}_4$  were in the range of 0.53 - 0.97  $\text{ng mL}^{-1}$ .

Terbium oxide ( $\text{Tb}_4\text{O}_7$ ) NPs have been used as a post-column derivatizing reagent for the luminescent quantification of seven quinolones after their separation by LC [64]. The derivatization reaction is based on the terbium-sensitized luminescence process, which involves the formation of chelates of these antibiotics with the NPs, giving rise to an energy transfer from the excited quinolones to terbium that is excited to its corresponding resonance levels and emits luminescence. The LODs obtained were similar to those obtained using terbium(III) in solution, except for flumequine, which was 16-times lower using the NPs. An interesting feature of this method is that the NPs concentration in the derivatizing solution is about 150-times lower than that required using terbium(III) ion, which reduces the cost of the assay since lanthanide salts are quite expensive.

#### 4.2. Detection systems

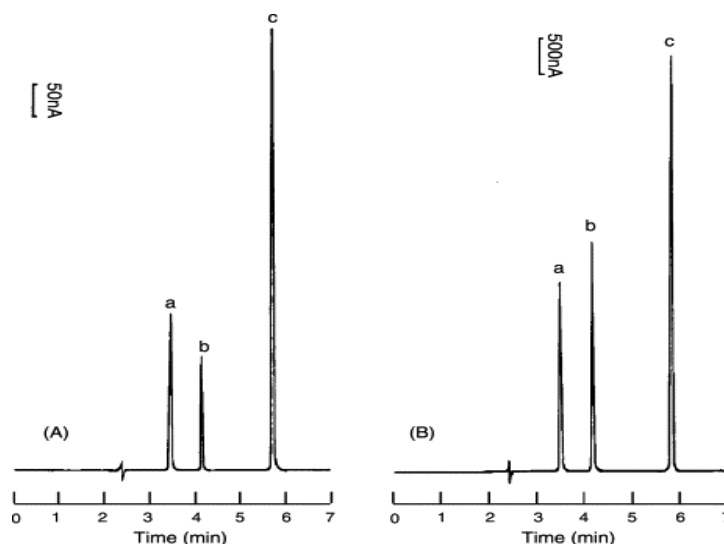
The use of NMs to modify the electrode surface has notably improved the sensitivity of LC methods with electrochemical detection because NMs favour electrocatalysis processes and increase the effective surface area of the electrode. For instance, MWCNTs and graphene modified screen-printed carbon electrodes (SPCE) have been used for the determination of phytochelatins, which are small cysteine-rich peptides, in plants using LC with amperometric detection [65]. The results obtained were compared to those obtained using a traditional glassy carbon



electrode (GCE) and a bare SPCE. The lowest LODs were obtained with the GCE (0.14 - 0.44  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), but the SPCE modified with CNTs (1.38 - 4.38  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) or graphene (0.37 - 2.98  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) reached lower LODs than those obtained using the bare SPCE (4.15 - 17.70  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

AuNPs-modified electrodes have been extensively used for the determination of thiol-containing compounds because, in addition to the electrochemical properties of these NPs and the increase in the effective surface area of the electrode, they show a strong selective interaction with this type of analytes. An AuNPs modified SPCE has been described in UHPLC coupled with electrochemical detection for the determination of the dithiocarbamate fungicides thiram, disulfiram and their derivatives in food (apple, grape and lettuce) [66]. The LODs obtained (0.022 - 0.165  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were lower than that obtained for thiram using a cylindrical carbon fiber microelectrode (0.10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) [67], but higher than that obtained for ziram using a mercury electrode (0.007  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) [68]. However, as it is known, the use of this latter electrode is not recommended owing to the mercury toxicity.

A platinum/poly(methyl violet) modified GCE has been described as working electrode for the electrochemical detection of homocysteine, cysteine and methionine in plasma after their separation by LC [69]. After the deposition of a poly(methyl violet) film onto the electrode surface, cyclic voltammometry was used for the electrodeposition of PtNPs onto the film, using a  $\text{K}_2\text{PtCl}_6$  solution. The diameter of the PtNPs was in the range 60-80 nm. The conducting polymer acts as an electron mediator for the electrocatalysis of the analytes. Figure 5 shows the chromatograms obtained using the bare and the modified GCEs, where it can be seen that the current responses obtained with the latter electrode are about 10-times higher.



**Figure 5.** Chromatograms of a mixed standard solution of cysteine (a), homocysteine (b) and methionine (c) at the GC electrode (A), and at the platinum/poly(methyl violet) modified GC electrode (B). [Reproduced from [69]]

Acetylene black NPs are a special type of carbon black, formed by the exothermic decomposition of acetylene. These NPs have been used for the fabrication of modified electrodes to increase the sensitivity of analytical determinations owing to their porous structure, excellent electric conductivity, large specific surface area and strong adsorptive ability. An acetylene black NPs modified GCE has been described for the detection of the monoamine neurotransmitters dopamine, epinephrine, norepinephrine and 5-hydroxytryptamine and their metabolites homovanillic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and 5-hydroxyindole-3-acetic acid, after their separation by LC [70]. The current responses obtained were about 4-times higher than those obtained using a bare GCE.

## **5. CONCLUDING REMARKS**

This review has tried to justify the wide use of NMs to improve the different steps of the chromatographic process. Although the number of articles devoted to this topic is very high, it is relatively infrequent to find a quantitative comparison of the results obtained in the presence and in the absence of NMs. However, the examples selected in this review, which include comparative studies carried out in sample treatment, chromatographic separation and derivatization-detection steps, clearly demonstrate the usefulness of different NMs in chromatographic methods. It can be inferred from these examples that the common ground of the positive effect of NMs on the different steps of chromatographic methods, as well as on other analytical applications, is their large specific surface area, which facilitates the mass transfer or the interaction between the analytes and the NMs. In addition, other features of NMs, such as adsorptive, magnetic, mechanical, electrical, thermal, optical and catalytic properties and facility to modify their surface, have contributed to increase the presence of different NMs in chromatographic methods.

Finally, it is worth mentioning that, although the positive role of nanotechnology in analytical chromatographic methods has been widely proven, there is a clear trend to develop new approaches involving NMs that improve enrichment capability, selectivity, separation efficiency, and the availability of suitable derivatization and detection systems. As a result, the design and implementation of new chemical methods for the synthesis of novel functionalized NMs containing selective and appropriate chemical moieties will continue to be a hot topic in chromatographic method research.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN (Grant No. CTQ2012-32941) and the FEDER Program.

**REFERENCES**

- [1] Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen, Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 26-41.
- [2] J. Tian, J. Xu, F. Zhu, T. Lu, C. Su, G. Ouyang, Application of nanomaterials in sample preparation, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 2-16.
- [3] B. Socas-Rodríguez, A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 110-146.
- [4] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena, Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34-43.
- [5] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Crecente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta*, 892 (2015) 10-26.
- [6] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50-58.
- [7] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 9-25.
- [8] R. Sitko, B. Zawisza, E. Malicka, Graphene as a new sorbent in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 33-43.

- [9] A. Spietelun, L. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1321 (2013) 1-13.
- [10] M. Moradi, Y. Yamini, Surfactant roles in modern simple preparation techniques: A review, *J. Sep. Sci.* 35 (2012), 2319-2340.
- [11] R. Lucena, B.M. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Potential of nanoparticles in sample preparation, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 620-637.
- [12] S. Dahane, M.D. Gil García, M.J. Martínez Bueno, A. Uclés Moreno, M. Martínez Galera, A. Derdour, Determination of drugs in river and wastewaters using solid-phase extraction by packed multi-walled carbon nanotubes and liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 17-28.
- [13] P. Kueseng, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, Multiwalled carbon nanotubes/cryogel composite, a new sorbent for determination of trace polycyclic aromatic hydrocarbons, *Microchem. J.* 96 (2010) 317-323.
- [14] X.S. Li, G.T. Zhu, Y.B. Luo, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 233-247.
- [15] Y. Liu, H. Li, J.M. Lin, Magnetic solid-phase extraction based on octadecyl functionalization of monodisperse magnetic ferrite microspheres for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples coupled with gas chromatography–mass spectrometry, *Talanta*, 77 (2009) 1037-1042.
- [16] F. Galán-Cano, M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Ionic liquid coated magnetic nanoparticles for the gas chromatography/mass

- spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in waters, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 134-140.
- [17] S.W. Xue, M.Q. Tang, L. Xu, Z.G. Shi, Magnetic nanoparticles with hydrophobicity and hydrophilicity for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *J. Chromatogr. A* 1411 (2015) 9-16.
- [18] D. Pardasani, P.K. Kanaujia, A.K. Purohit, A.R. Shrivastava, D.K. Dubey, Magnetic multi-walled carbon nanotubes assisted dispersive solid phase extraction of nerve agents and their markers from muddy water, *Talanta* 86 (2011) 248-255.
- [19] A.V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M.M. Afonso, J.A. Palazuela, M.A. Rodríguez-Delgado, Comparison between magnetic and non magnetic multi-walled carbon nanotubes-dispersive solid-phase extraction combined with ultra-high performance liquid chromatography for the determination of sulfonamide antibiotics in water samples, *Talanta* 116 (2013) 695-703.
- [20] N. Li, J. Chen, Y.P. Shi, Magnetic graphene solid-phase extraction for the determination of carbamate pesticides in tomatoes coupled with high performance liquid chromatography, *Talanta* 141 (2015) 212-219.
- [21] X. Lin, X. Chen, X. Huo, Z. Yu, K. Bi, Q. Li, Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-diode array detection for the determination of *N*-methyl carbamate pesticides in vegetables, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 202-209.
- [22] P. Paíga, S. Morais, M. Correia, A. Alves, C. Delerue-Matos, Screening of carbamates and ureas in fresh and processed tomato samples using microwave-assisted extraction and liquid chromatography, *Anal. Lett.* 42 (2009) 265-283.

- [23] W. Cao, L. Yi, L.H. Ye, J. Cao, S.S. Hu, J.J. Xu, L.Q., Peng, Q.Y. Zhu, Q.Y. Zhang, Application of a highly sensitive magnetic solid phase extraction for phytochemical compounds in medicinal plant and biological fluids by ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry, *Electrophoresis* 36 (2015) 2404-2412.
- [24] B. Socas-Rodríguez, J. Hernández-Borges, P. Salazar, M. Martín, M.A. Rodríguez-Delgado, Core-shell polydopamine magnetic nanoparticles as sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction for the determination of estrogenic compounds in water samples prior to high-performance liquid chromatography-mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. A* 1397 (2015) 1-10.
- [25] Q. Li, M.H.W. Lam, R.S.S. Wu, B. Jiang, Rapid magnetic-mediated solid-phase extraction and pre-concentration of selected endocrine disrupting chemicals in natural waters by poly(divinylbenzene-co-methacrylic acid) coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core-shell magnetite microspheres for their liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 1219-1226.
- [26] R.A. Pérez, B. Albero, J.L. Tadeo, E. Molero, C. Sánchez-Brunete, Analysis of steroid hormones in water using palmitate-coated magnetite nanoparticles solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia* 77 (2014) 837-843.
- [27] Y. Hao, R. Gao, L. Shi, D. Liu, Y. Tang, Z. Guo, Water-compatible magnetic imprinted nanoparticles served as solid-phase extraction sorbents for selective determination of trace 17beta-estradiol in environmental water samples by liquid chromatography, *J Chromatogr. A* 1396 (2015) 7-16.

- [28] X. Wang, Q. Kang, D. Shen, Z. Zhang, J. Li, L. Chen, Novel monodisperse molecularly imprinted shell for estradiol based on surface imprinted hollow vinyl-SiO<sub>2</sub> particles, *Talanta* 124 (2014) 7–13.
- [29] B. Chen, Y. Huang, M. He, B. Hu, Hollow fiber liquid-liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-ultraviolet detection for the determination of various environmental estrogens in environmental and biological samples, *J. Chromatogr. A* 1305 (2013) 17–26.
- [30] X. Zhao, Y. Cai, F. Wu, Y. Pan, H. Liao, B. Xu, Determination of perfluorinated compounds in environmental water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry using surfactant-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles as adsorbents, *Microchem. J.* 98 (2011) 207-214.
- [31] X. Liang, Y. Zou, S. Liu, C. Chen, J. Wang, H. Hu, S. Yao, Facile and robust dual interaction modification of hexadecyldimethyl amine magnetic nanoparticles for the ultrasensitive analysis of perfluorinated compounds in environmental water, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 1394-1401.
- [32] V.A. Bailey, D. Clarke, A. Routledge, Extraction of perfluorinated compounds from food matrices using fluorous solvent partitioning, *J. Fluorine Chem.*, 131 (2010) 691-697.
- [33] X. Zhao, J. Li, Y. Shi, Y. Cai, S. Mou, G. Jiang, Determination of perfluorinated compounds in wastewater and river water samples by mixed hemimicelle-based solid-phase extraction before liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1154 (2007) 52-59.
- [34] M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens, A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid



- phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples. *J. Chromatogr. A* 1425 (2015) 73-80.
- [35] L. Jiang, Y. Chen, Y. Luo, Y. Tan, M. Ma, B. Chen, Q. Xie, X. Luo, Determination of catecholamines in urine using aminophenylboronic acid functionalized magnetic nanoparticles extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrochemical detection, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 460-467.
- [36] M. Lee, S.Y. Oh, T.S. Pathak, I.R. Paeng, B.Y. Cho, K. J. Paeng, Selective solid-phase extraction of catecholamines by the chemically modified polymeric adsorbents with crown ether, *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 340-344.
- [37] J. Li, Y.B. Wang, K.Y. Li, Y.Q. Cao, S. Wu, L. Wu, Advances in different configurations of solid-phase microextraction and their applications in food and environmental analysis, *Trends Anal. Chem.* 72 (2015) 141-152.
- [38] Z. Es'haghi, E. Esmaeili-Shahri, Sol-gel-derived magnetic  $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$  nanocomposite reinforced hollow fiber-solid phase microextraction for enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human hair prior to high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 973 (2014) 142-151.
- [39] A.H. Duan, S.M. Xie, L.M. Yuan, Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 484-491.
- [40] E. Guihen, Nanoparticles in modern separation science, *Trends Anal. Chem.* 46 (2013) 1-14.

- [41] J. Krenkova, F. Foret, F. Svec, Less common applications of monoliths: V. Monolithic scaffolds modified with nanostructures for chromatographic separations and tissue engineering. *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1266-1283.
- [42] E.P. Nesterenko, P.N. Nesterenko, D. Connolly, X. He, P. Floris, E. Duffy, B. Paull, Nano-particle modified stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Analyst* 138 (2013) 4229-4254.
- [43] S. Tong, S. Liu, H. Wang, Q. Jia, Recent advances of polymer monolithic columns functionalized with micro/nanomaterials: synthesis and application, *Chromatographia* 77 (2014) 5–14.
- [44] S. Tang, Y. Guo, C. Xiong, S. Liu, X. Liua, S. Jiang, Nanoparticle-based monoliths for chromatographic separations, *Analyst* 139 (2014) 4103-4117.
- [45] W.J. Cheong, F. Ali, J.H. Choi, J.O. Lee, K.Y. Sung, Recent applications of molecular imprinted polymers for enantio-selective recognition, *Talanta* 106 (2013) 45-59.
- [46] X. Dong, R. Wu, J. Dong, M. Wu, Y. Zhu, H. Zou, Recent progress of polar stationary phases in CEC and capillary liquid chromatography, *Electrophoresis* 30 (2009) 141-154.
- [47] D. Connolly, S. Currivan, B. Paull, Polymeric monolithic materials modified with nanoparticles for separation and detection of biomolecules: A review, *Proteomics* 12 (2012) 2904-2917.
- [48] M. Zhang, H. Qiu, Progress in stationary phases modified with carbonaceous nanomaterials for high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 65 (2015) 107-121
- [49] Q. Li, D. Yuan, Evaluation of multi-walled carbon nanotubes as gas chromatographic column packing, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 203-209.

- [50] L. Zhao, P. Ai, A.H. Duan, L.M. Yuan, Single-walled carbon nanotubes for improved enantioseparations on a chiral ionic liquid stationary phase in GC, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 143-147.
- [51] N. Na, X. Cui, T. De Beer, T. Liu, T. Tang, M. Sajid, J. Ouyang, The use of silica nanoparticles for gas chromatographic separation, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4552-4558.
- [52] C. Andre, R. Aljhani, T. Gharbi, Y.C. Guillaume, Incorporation of carbon nanotubes in a silica HPLC column to enhance the chromatographic separation of peptides: Theoretical and practical aspects, *J. Sep. Sci* 34 (2011) 1221-1227.
- [53] A. Speltini, D. Merli, D. Dondi, C. Milanese, P. Galinetto, C. Bozzetti, A. Profumo, Radiation-induced grafting of carbon nanotubes on HPLC silica microspheres: theoretical and practical aspects, *Analyst* 138 (2013) 3778-3785.
- [54] S. Sandron, B. Paull, P.N. Nesterenko, Investigation on selectivity of mercaptopropylsilica and silver nanoparticles-functionalised mercaptopropylsilica, *Curr. Chromatogr.* 2 (2015) 122-135.
- [55] C. André, G. Lenancker, Y.C. Guillaume, Non-covalent functionalisation of monolithic silica for the development of carbon nanotube HPLC stationary phases, *Talanta* 99 (2012) 580-585.
- [56] A. Aqel, K. Yusuf, Z.A. Al-Othman, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, A.A. Alwarthan, Effect of multi-walled carbon nanotubes incorporation into benzyl methacrylate monolithic columns in capillary liquid chromatography, *Analyst* 137 (2012) 4309-4317.

- [57] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, Liquid chromatography coupled to on-line post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries, *Anal. Chim. Acta* 798 (2013) 1-24.
- [58] Y. Zu, Molecular and nanoparticle postcolumn reagents for assay of low-molecular-mass biothiols using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3358-3365.
- [59] N. Li, D. Liu, H. Cui, Metal-nanoparticle-involved chemiluminescence and its applications in bioassays, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5561-5571
- [60] J.F. Huertas-Pérez, D. Moreno-González, D. Airado-Rodríguez, F.J. Lara, A.M. García-Campaña, Advances in the application of chemiluminescence detection in liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 35-48.
- [61] C. Lu, Y. Zu, V.W.W. Yam, Nonionic surfactant-capped gold nanoparticles as postcolumn reagents for high-performance liquid chromatography assay of low-molecular-mass biothiols, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 328-332.
- [62] Q. Xiao, H. Gao, Q. Yuan, C. Lua, J.M. Lin, High-performance liquid chromatography assay of cysteine and homocysteine using fluorosurfactant-functionalized gold nanoparticles as postcolumn resonance light scattering reagents, *J. Chromatogr. A* 1274 (2013) 145-150.
- [63] Q.L. Zhang, L. Wu, C. Lv, X.Y. Zhang, A novel on-line gold nanoparticle-catalyzed luminol chemiluminescence detector for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1242 (2012) 84-91.
- [64] G.S. Yáñez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-

- column derivatization with terbium oxide nanoparticles, *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 126-132.
- [65] A. Dago, J. Navarro, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Carbon nanotubes and graphene modified screen-printed carbon electrodes as sensitive sensors for the determination of phytochelatins in plants using liquid chromatography with amperometric detection, *J. Chromatogr. A* 1409 (2015) 210-217.
- [66] K. Charoenkitamorn, O. Chailapakul, W. Siangproh, Development of gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode for the analysis of thiram, disulfiram and their derivative in food using ultra-high performance liquid chromatography, *Talanta* 132 (2015) 416-423.
- [67] M.A. Hernández-Olmos, L. Agüí, P. Yáñez-Sedeño, J.M. Pingarrón, Analytical voltammetry in low-permittivity organic solvents using disk and cylindrical microelectrodes. Determination of thiram in ethyl acetate, *Electrochim. Acta* 46 (2000) 289–296.
- [68] P. Qiu, Y.N. Ni, Determination of ziram in vegetable samples by square wave voltammetry, *Chin. Chem. Lett.* 19 (2008) 1337–1340.
- [69] H. Xu, W. Zhang, W. Zhu, D. Wang, J. Ye, K. Yamamoto, L. Jin, Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine and methionine in hypothyroid patients' plasma by liquid chromatography using platinum/poly(methyl violet) modified electrode, *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 182-188.
- [70] L. Lin, J. Yang, R. Lin, L. Yu, H. Gao, S. Yang, X. Li, In vivo study on the monoamine neurotransmitters and their metabolites change in the striatum of Parkinsonian rats by liquid chromatography with an acetylene black nanoparticles modified electrode, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 72 (2013) 74-79.



***A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples***

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

*Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Cordoba, Annex to Marie Curie (C-3) Building, Campus of Rabanales, 14071 Córdoba, Spain*

A new magnetic dispersive solid-phase extraction approach based on Eu- and Tb-coated magnetic nanocomposites, combined with ultra-high performance liquid chromatography with fluorometric detection, is reported for the extraction and simultaneous determination of veterinary antibiotics. The method is aimed at monitoring of potential residues of three tetracyclines, namely oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and three acidic quinolones, such as oxolinic acid, nalidixic acid and flumequine, chosen as model analytes, in animal muscle samples. The nanocomposites were obtained by synthesizing magnetic nanoparticles by a co-precipitation method and their coating with terbium and europium ions. The limits of detection obtained using standard solutions were: 1.0, 1.5, 3.8, 0.25, 0.7 and 1.2 ng mL<sup>-1</sup>, which corresponds to 3.3, 5.0, 12.7, 0.8, 2.3 and 4.0 µg kg<sup>-1</sup> for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, oxolinic acid, nalidixic acid and flumequine, respectively, in meat samples. The precision values obtained in the presence of the sample matrix, were in the ranges 0.12 – 2.0% and 2.6 – 15.4% for retention times and areas, respectively. The selectivity of the method was checked by assaying different veterinary drugs, finding that most of them did not interfere at the same concentration levels as that of analytes. A recovery study was performed in the presence of chicken and pork muscle samples, which provided values in the range of 61.5 – 102.6 %.

**KEYWORDS:** *quinolones, tetracyclines, Eu- and Tb-coated magnetic nanoparticles, ultra-performance liquid chromatography, fluorometric detection, meat samples.*



## **I. INTRODUCTION**

The determination of antibiotic residues in food samples is often a difficult task because of the relatively low maximum residue limit (MRL) defined by the legislation and the complexity of the food matrices composition. Thus, the use of effective pre-concentration methods and sensitive detection techniques are desirable tools extensively used for antibiotic determination in food samples [1]. Tetracyclines (TCs) and quinolones (Qs) are two groups of antibiotics widely used in veterinary practice because of their broad antimicrobial action against gram-positive and gram-negative bacteria. The prevalence of resistant bacterial strains has given rise to the definition by the EU Commission of lists of pharmacologically active ingredients that can be used for veterinary purposes [2], where the MRLs for each compound in different foods of animal origin have been defined. Both TCs and Qs are usually determined by liquid chromatography (LC) with UV [3 - 5], fluorometric [6 - 16] and MS [10, 11, 17 - 21] detection systems. The fluorometric methods described are based on the native fluorescence of these compounds [6 - 11], or in the fluorescence of the chelates formed by their post-column derivatization with different metal ions, such as Mg(II) [12], Tb(III) [13, 14] and Eu(III) [15]. Also, the use of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs has been recently reported as post-column derivatization reagents for the luminescent determination of Qs [16]. Ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) has started to be often used to determine these compounds, since it provides shorter separations, giving rise to an increase in the sample throughput [7, 19 - 21].

The extraction of TCs and Qs from complex matrices has been extensively studied, thus being solid-phase extraction [3, 4, 6, 9 - 11, 20], and more recently, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) methodology [17, 18, 20] the extraction procedures mostly used. Greener sample extraction techniques are one of the most recent trends in sample preparation in order to minimize damages to the environment. For this purpose, there has been a growing trend in the use of micro-extraction techniques, which generally involve a decrease in the



amount of sample required for the analysis and in the volumes of organic solvents [8, 19]. The development of nanotechnology has enabled the introduction of nanomaterials as sorbents, especially for their use in micro-extraction processes [8, 22 - 24]. The relatively large surface-to-volume ratio of nanomaterials allows the use of small amounts and the miniaturization of extraction techniques. Magnetic nanomaterials have found a really widespread application for separation purposes because the use of a simple magnet in some steps of the extraction procedure enables the easy separation of the analytes [22]. Also, their synthesis procedures allow large amounts of nanomaterial to be produced, so their availability is not a limiting aspect. The use of hybrid magnetic mesoporous materials for the determination of fluoroquinolones in milk samples has been recently described [8]. Some recent examples of the application of the use of hybrid nanomaterials for sample preparation have shown their usefulness for the extraction of organic [23], and organometallic/inorganic [24] species. For instance, an imprinted magnetic nanomaterial was obtained using  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NPs that were grafted with an acrylamide polymer for the solid-phase extraction of  $17\beta$ -estradiol in milk with recoveries in the range of 88.8 – 92.1% [23]. Core-shell magnetic NPs coated with silica were prepared by immobilizing  $\gamma$ -mercaptopropyltrimethoxysilane onto  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles and used for mercury speciation in environmental and hair samples by the simultaneous retention of methylmercury and inorganic mercury [24].

The present method relies on the use of a new Eu- and Tb-coated magnetic hybrid nanomaterial as sorbent for the extraction and clean-up of pork and chicken muscle samples and their further quantification using UHPLC with fluorometric detection. The veterinary antibiotics used as model analytes are TCs, such as tetracycline (TET), oxytetracycline (OTC) and chlortetracycline (CTC), and acidic Qs, such as oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU). The quinolone nalidixic acid (NAL), which is not approved in the EU for its use in food producing animals [2], has been included owing to its similar chemical properties to OXO and FLU, and as a means to demonstrate the selectivity of the method for the analysis of this group of

acidic Qs. The capacity for metal chelation of these compounds, which has been a drawback for their extraction from complex sample matrices [25], is used now to develop a new extraction procedure. The basis for the retention of these antibiotics with the new sorbent relies on the formation of chelates with the europium and terbium present in the magnetic nanomaterial. Nanomaterials based on europium and terbium oxides have been previously described as reagents for the fluorometric determination of TCs [26] and lasalocid and salicylate [27], but these lanthanides have not been previously used as sorbents for separation purposes. The separation of the supernatants and the hybrid magnetic nanomaterials is done using a rack with multiple magnets, which enhances the extraction throughput. The method has been applied to the clean-up of extracts from animal muscle samples. Although a first extraction step using acetonitrile is required to recover the analytes from the solid matrix and to remove proteins, the subsequent extraction steps involving the nanomaterial did not require the use of organic solvents, which makes the method to be more environment-friendly.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1 Instrumentation**

The UHPLC system used consisted of a high pressure pump unit (LC-30AD), a degasser (DGU-20A5), an autosampler (SIL-30AC) equipped with a sample cooler set to 8°C, a column oven (CTO-10AS vp) and a fluorescence detector (RF-20AXS) (Shimadzu, Kyoto, Japan). A Synchronis C18 analytical column (100 mm × 2.1 mm I.D., particle size 1.7 µm; Thermoscientific, Inc., Waltham, MA) in combination with a guard cartridge of the same type (SecurityGuard ULTRA Cartridge UHPLC C18; Phenomenex) was used as stationary phase for the separation.

## 2.2 Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade. TET hydrochloride, OTC hydrochloride, CTC hydrochloride, FLU, NAL and OXO were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Stock solutions ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) of TCs were prepared in ultrapure water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for a week. Stock solutions ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ) of Qs were prepared in  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  sodium hydroxide and stored at  $4^{\circ}\text{C}$  for a month. Working solutions were daily prepared by diluting stock solution in doubly deionized water. Acetonitrile (ACN) HPLC-gradient grade was purchased from Teknokroma (Sant Cugat del Vallès, Spain). Glacial acetic acid (HPLC) and ammonium hydroxide (as 25%  $\text{NH}_3$ ) were supplied by Panreac (Castellar del Vallès, Spain). The ammonium acetate solution used as aqueous mobile phase was prepared with  $0.075 \text{ mol L}^{-1}$  acetic acid buffered to pH 6.9 with ammonia, containing also  $0.2 \text{ mol L}^{-1}$  magnesium nitrate hexahydrate (Fluka, Germany). All components of the mobile phase were filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  nylon membrane filter (Millipore, Bedford, USA). A  $75 \text{ mmol L}^{-1}$  disodium EDTA solution was prepared by dissolving the appropriate amount of ethylenediaminetetraacetic disodium salt dihydrate (Fluka, Buchs, Switzerland) in deionized water. Iron (II) chloride tetrahydrate (Merck, Darmstadt, Germany) and iron (III) chloride hexahydrate (Panreac) were also used.

Poly(ethylene glycol) 6000 (PEG) (Fluka, Buchs, Switzerland) was used to prepare a  $0.067 \text{ mol L}^{-1}$  solution in deionized water. Urea (Merck), europium(III) nitrate pentahydrate (Aldrich, Gillingham, UK) and terbium(III) nitrate pentahydrate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) were dissolved in water for the synthesis of the nanocomposites.  $\text{Tb}_4\text{O}_7$  (diameter  $< 100 \text{ nm}$ ) and  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  ( $< 150 \text{ nm}$ ) (Aldrich, St. Louis, USA) nanopowders were used as supplied. A 1/100 dilution of gold nanoparticles (20 nm, OD 1, stabilized suspension in citrate buffer (Sigma Aldrich) from the commercial product were also assayed as potential sorbents.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1 Synthesis of Eu- and Tb-coated magnetic nanocomposites

The synthesis used is a modification of a previously described two-step synthesis, where yttrium was replaced by terbium [28]. Firstly, the synthesis of PEG-coated magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles was carried out as follows: 4.5 mmol of FeCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O and 9 mmol of FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O were dissolved in 40 mL of deionized water under a N<sub>2</sub> stream. A volume (5 mL) of the PEG aqueous solution was added in order to avoid magnetic nanoparticles aggregation. Finally, a volume (2 mL) of the ammonium hydroxide solution was added dropwise and the mixture was kept at 90°C for 2 h, adding ammonium hydroxide every 30 min. The precipitate obtained was separated by using a magnet, washed with water and ethanol for several times, and further dried at 100 °C overnight.

In order to synthesize Eu- and Tb-coated magnetic nanoparticles, an amount (100 mg) of PEG-coated magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles were dispersed in 50 mL of a solution containing 1.8 mol L<sup>-1</sup> urea, 10 mmol L<sup>-1</sup> europium nitrate and 10 mmol L<sup>-1</sup> terbium nitrate. The mixture was sonicated for 20 min and kept at 90°C for 4 h under mechanical stirring. The precipitate was magnetically separated, washed with doubly distilled water and ethanol several times, and dried at 100 °C overnight. Finally, the solid was calcinated at 700 °C for 2 h to achieve the complete conversion to the oxide.

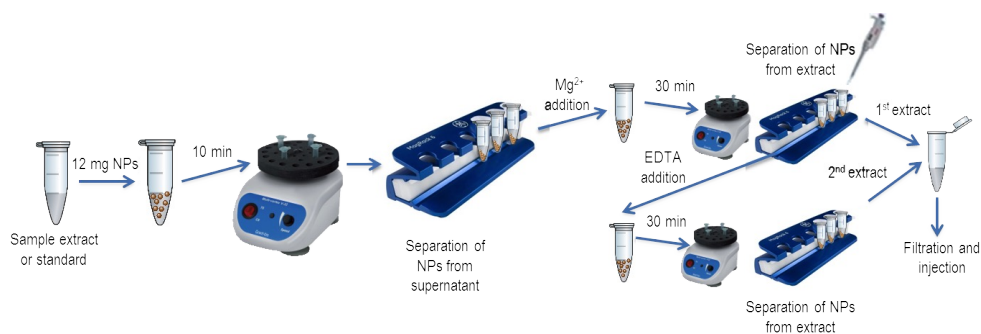
#### 2.3.2. Determination of TCs and Qs by UHPLC

A volume (15 µL) of a standard or sample extract, containing the analytes at concentrations within their corresponding dynamic ranges, was injected onto the chromatographic system. The analytical separation was performed by reversed phase chromatography at a flow-rate of 0.5 mL min<sup>-1</sup> under gradient elution, combining an organic phase A (ACN) and an aqueous phase B (ammonium acetate solution) as follows: an isocratic step (12% A) in the range of 0 – 2.5 min, then, the % A was increased up to 60% in the range of 2.5 – 6.5 min; then, % A was decreased up to

12% in the range of 6.5 – 7.5 min, and this percentage was kept constant up to 12.5 min for column re-equilibration. The temperature was kept at 32°C in the column oven. Chromatograms were recorded at  $\lambda_{\text{ex}}$  390 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  512 nm for TCs, and at  $\lambda_{\text{ex}}$  255 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  360 nm for Qs. Each standard or sample extract was assayed in triplicate. Data were processed using LabSolutions LC/GC software (release 5.42 SP5).

### 2.3.3. Dispersive solid-phase extraction of meat extracts using Eu- and Tb-coated magnetic nanocomposites

Muscle samples were homogenized using a T25 digital UltraTurrax (IKA, Germany). Homogenized muscle samples (0.3 g) were placed in Eppendorf® tubes and were spiked at the levels of 0.5, 1 and 2 times the MRL defined for each analyte [2] and  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  was chosen as limit value for NAL, since it is not used in food producing animals. The spiked samples were stored in the dark at 4 °C for 1 h to achieve the equilibration of standards with the sample matrix. To start the extraction, a volume (1 mL) of ACN was added into the tubes and vortexed for 1 min. The samples were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm and the supernatants were carefully collected. The pellets were re-extracted with ACN as described, and the supernatants combined. The pH of these ACN extracts was adjusted to 8.3 prior to the extraction with 12 mg of the sorbent. Afterwards, the mixture was vortexed for 10 min and, with the aid of a magnet, the nanocomposites were collected and the supernatant was discarded (Figure 1). Nanocomposites were washed twice using 500  $\mu\text{L}$  of ammonium acetate buffer solution to remove sample matrix components. A volume (500  $\mu\text{L}$ ) of  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$  ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 9.8) was added and the mixture was stirred for 30 min. Eluates were collected separating the nanocomposites magnetically. A volume (500  $\mu\text{L}$ ) of 75 mmol  $\text{L}^{-1}$  disodium EDTA was added and the mixture was again stirred for 30 min. All eluates were combined, neutralized and filtered using 0.22  $\mu\text{m}$  regenerated cellulose membrane filters. A volume (15  $\mu\text{L}$ ) of this extract was treated as indicated in Section 2.3.2.



**Figure 1.** Scheme of the dispersive extraction step for Qs and TCs using a multiple magnet device.

#### 2.3.4 Assessment of precision

The precision of the method was evaluated at two different concentration levels of each analyte using aqueous standards and in the presence of the minced pork sample, which were 10 and 1000 ng mL<sup>-1</sup> for Qs, and 10 and 4000 ng mL<sup>-1</sup> for TCs, respectively (except for CTC, which were 50 and 500 ng mL<sup>-1</sup>) and 75 and 200 µg kg<sup>-1</sup> of each antibiotic in presence of minced pork sample. The intra-day precision was evaluated by assaying six solutions during the same day, which were injected in triplicate. The inter-day precision was determined by analyzing three replicates of standard solutions for five different days, which were also injected in triplicate. The percentage of relative standard deviation (%RSD) was calculated for retention times and areas in each case.

#### 2.3.5 Estimation of limits of detection

The estimation of the limits of detection (LODs) was done following IUPAC recommendations [29], which involve the use of a signal-to noise ratio of 3. The signal considered as the blank signal was the y-intercept of the calibration curve made using 15 mixtures of aqueous standards of the compounds determined.

### 2.3.6 Decision limit and detection capability

The decision limit ( $CC\alpha$ ) can be calculated, according to Commission Decision 2002/657/EC [30] by analysing at least 20 blank samples of chicken/pork ground mix fortified with the analyte(s) at the permitted limit using the following equation:  $CC\alpha = MRL + 1.64s_{MRL}$ , being  $s_{MRL}$  the standard deviation obtained at MRL. The detection capability ( $CC\beta$ ) [30] can be calculated by analysing at least 20 blank samples of chicken/pork ground mix fortified with the analyte(s) at  $CC\alpha$ , using the equation:  $CC\beta = CC\alpha + 1.64s_{CC\alpha}$ . For convenience, it is admitted that  $s_{MRL}$  and  $s_{CC\alpha}$  take the same value.

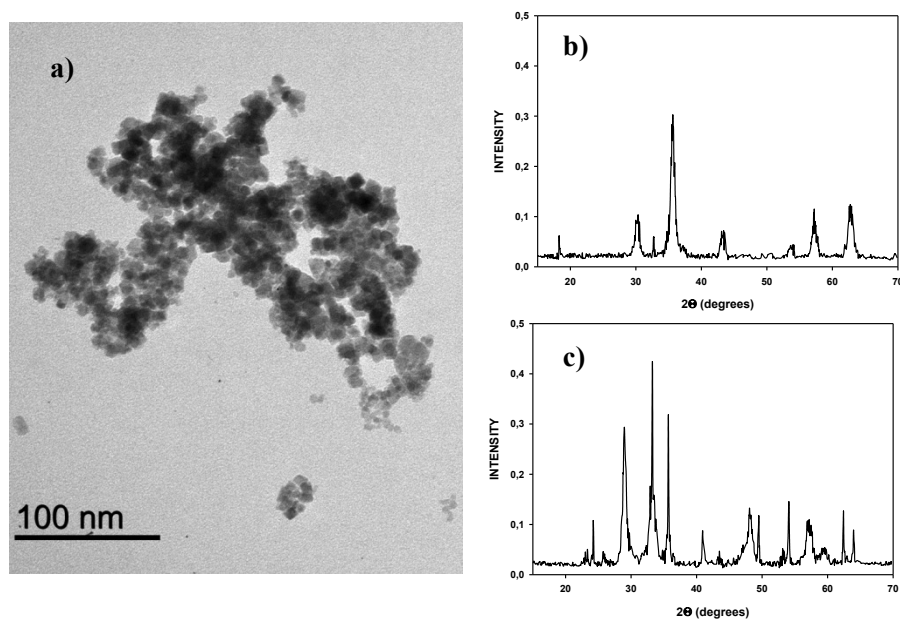
## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Sorbent selection and optimization of the dispersive solid-phase extraction procedure

Different types of nanoparticles were studied as potential sorbents for the dispersive solid-phase extraction of the analytes. Several types of commercial NPs, such as Au,  $Tb_4O_7$  and  $Eu_2O_3$  NPs were assayed for this purpose, finding that only  $Tb_4O_7$  and  $Eu_2O_3$  NPs interact with Qs and TCs, as it has been recently described [26, 27]. When commercial  $Tb_4O_7$  and  $Eu_2O_3$  NPs were used, it was not possible to fully remove them by centrifugation and/or filtration, so that nanoparticles could come into the chromatographic system, provoking blockages. To avoid this problem, magnetic nanoparticles coated with terbium and europium ions were synthesized, as described in Section 2.3.1, which can be easily removed with the aid of a magnet.

The synthesis of the nanocomposite was based on a previously reported method [28], where terbium(III) ions were added instead of yttrium(III). Figure 2.a shows a TEM image of the NPs obtained, which had a diameter of  $9.6 \pm 0.4$  nm. It can be also seen that there is a single type of NPs, which reinforces that Eu(III) and Tb(III) ions were successfully incorporated to the initially synthesized magnetite nanomaterial. X-ray diffraction (XRD) analysis was also used in order to elucidate the

crystallinity of the material obtained and it was found that magnetite was obtained after the first step of the synthesis (Figure 2.b), where a blackish precipitate was obtained. The addition of Eu(III) and Tb(III) ions seems to oxidize partially the magnetite obtained, according to the XRD diffraction pattern obtained in Figure 2.c, where peaks corresponding to hematite appear (according to the library used), as well as terbium oxide. This could be explained owing to the high annealing temperature used, which was 700 °C. It has been recently described that there is a phase transition from magnetite to hematite when annealing temperatures in the range 650 – 850 °C are used [31]. The presence of europium could not be definitely determined from the XRD pattern, so that X-photoelectron spectroscopy (XPS) was used and it revealed that the nanocomposite also contained europium. The nanocomposite obtained had a brownish colour and showed magnetic behaviour, so it was used for magnetic separations.



**Figure 2.** TEM images (2.a) of the synthesized magnetic nanocomposite and XRD patterns of the magnetic nanomaterial obtained in the first step of the synthesis (2.b) and that of the final product (2.c).



The study of the variables affecting the dispersive solid-phase extraction process was performed using the univariate method. The results are summarized in Table I, where the variables studied, the assayed ranges and the values chosen as optimum are shown. The pH of the solution for the sorption of the analytes on the nanocomposite was a critical variable as TCs require a basic medium, because their pKa values are close to 8, whereas Qs are better retained at lower pH values because their pKa values are about 6 [32]. Thus, a pH 8.3 was chosen as a compromised solution.

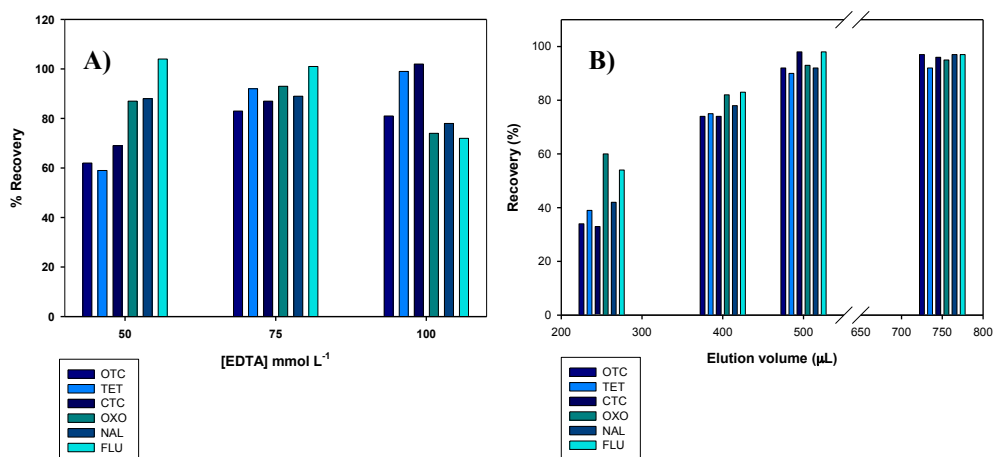
**Table I.** Study of variables affecting the method

| Type                   | Variable  | Range studied | Optimum value |
|------------------------|---|---------------|---------------|
| <b>Dispersive SPE</b>  |   |               |               |
|                        | amount of sorbent, mg                                       | 5 – 20        | 12            |
|                        | pH for sample application                                   | 7 – 9         | 8.3           |
|                        | time for analyte retention, min                             | 5 – 30        | 10            |
|                        | [Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ], mmol L <sup>-1</sup>  | 50 – 500      | 100           |
|                        | pH of Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> solution            | 7 – 12        | 9.8           |
|                        | [Na <sub>2</sub> EDTA], mmol L <sup>-1</sup>                | 5 – 100       | 75            |
|                        | pH of EDTA solution   | 4.5 – 10      | 4.8           |
|                        | eluent volume, μL   | 250 – 2000    | 500           |
|                        | elution time, min   | 5 – 60        | 30            |
| <b>UHPLC variables</b> |   |               |               |
|                        | [NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> COO], mmol L <sup>-1</sup> | 50 – 125      | 75            |
|                        | [Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ], mmol L <sup>-1</sup>  | 25 – 200      | 200           |
|                        | pH  | 2.6 – 7.6     | 6.9           |
|                        | initial %ACN  | 10 – 20       | 12            |
|                        | flow-rate, mL min <sup>-1</sup>                             | 0.4 – 0.55    | 0.5           |
|                        | temperature, °C   | 22 – 42       | 32            |
|                        | injection volume, μL  | 10 – 18       | 15            |

A washing step of nanocomposites was introduced to elute potential interferences from the sample matrix. Dilute sodium hydroxide, ammonium hydroxide and ammonium acetate solutions were assayed, finding that analyte losses were minimized when a 75 mmol L<sup>-1</sup> ammonium acetate aqueous solution at pH 8.3 was used as washing solution.

The study of the elution step revealed that a pH change and the use of displacing reactions were needed in order to increase the extraction recoveries. The use of magnesium salts and EDTA has been described to enhance the Qs and TCs extraction process [7, 20], although the mechanism has not been fully elucidated yet. The assays carried out showed that it was not possible the joint use of both magnesium (II) and EDTA in a single elution step because of the different physico-chemical properties of the analytes. Thus, the conditions for elution of Qs and TCs were studied separately and two sequential elution steps were used, as Figure 1 shows. The Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> concentration was studied in the range of 50 – 500 mmol L<sup>-1</sup>, showing that 100 mmol L<sup>-1</sup> was enough for Qs elution. This process required a basic pH for the formation of the magnesium-Qs complexes, choosing a value of 9.8. The formation of magnesium hydroxide was not observed at this pH value.

Figure 3.A shows the study of the influence of EDTA concentration on the elution of TCs, which was carried out at pH 4.8. As can be seen, the recoveries for all TCs improved in the presence of a 75 mmol L<sup>-1</sup> EDTA concentration. The optimization of the elution volume (Figure 3.B) showed that a 500 µL volume was suitable for this step. The time of elution was studied in the range of 5 – 60 min, showing that 30 min were required to achieve adequate extraction recoveries.



**Figure 3.** Influence of EDTA salt concentration (A) and elution volume (B) on the recovery percentages obtained for TCs using the two-step elution method. The analyte concentrations in all instances were 150 ng mL<sup>-1</sup>.

### 3.2. Optimization of the chromatographic separation

The hydrodynamic and chemical variables involved in the system were also optimized applying the univariate methodology (Table I). Values chosen were those yielding the best resolution and maximum fluorescence signals with a minimum standard deviation.

The selection of the aqueous phase composition was initially made according to described previously for the separation of Qs and TCs in the literature using LC [3 – 21]. The separation of TCs required a mobile phase containing divalent cations such as magnesium or calcium to improve the chromatographic peaks [12]. Several salts (MgCl<sub>2</sub>, Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) were assayed and the results indicated that magnesium ions were more effective than calcium ions and that there were not differences when using chloride or nitrate. Magnesium nitrate was chosen because of its higher solubility in water. A relatively high magnesium concentration was required,

200 mmol L<sup>-1</sup>, to improve the shape and fluorescent signal of TC peaks, but it did not affect the Qs peaks.

The influence of the pH was evaluated using different solutions such as acetic acid, sodium acetate and ammonium acetate, finding that narrow and well-defined peaks were obtained in a range of 6.0 – 7.6. A pH of 6.9 was chosen to perform the separation since OTC started to show peak broadening at higher pH values. A 75 mmol L<sup>-1</sup> aqueous solution of ammonium acetate was selected to fix the pH.

The study of the composition of organic mobile phase revealed that it was necessary to use a gradient program with ACN as organic phase solvent. The initial percentage of ACN was studied in the range of 10 - 20%, choosing 12% as optimum value since higher percentages resulted in shorter retention times but with a poorer analyte separation. It was necessary to increase %ACN up to 88% in order to elute CTC in relatively short retention times.

The study of the flow-rate showed that 0.5 mL min<sup>-1</sup> provided short retention times and appropriate peak resolution without exceeding the limit of column pressure indicated by the manufacturer. A column temperature of 32 °C was chosen since it was found that higher temperatures affected negatively to peak resolution.

The retention times obtained (< 5 min) under the optimum separation conditions were shorter compared to some previously reported separations using LC for similar TC and Q mixtures [3 - 6, 8 - 10]. In some instances, the separation of 2 -3 analytes required at least 20 min [3, 9].

### 3.3 Figures of merit

Calibration curves were obtained using the optimum experimental conditions and an external calibration method, owing to the absence of sample matrix effects. Table 2 shows the retention time for each compound, the calibration parameters and the LODs obtained, which were calculated according to IUPAC recommendations [29]. These LODs would correspond to 3.3, 5.0, 12.7, 0.8, 2.3 and 4.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , for OTC, TET and CTC, OXO, NAL and FLU, respectively, in the animal muscle samples. These values are much lower than the MRLs defined for most of the analytes [2] and lower than or similar to those provided by other previously reported methods [3, 5-7, 10]. The regression coefficients obtained in all instances revealed a good fit of experimental data to the calibration curve.

The study on the precision of the system revealed that very low precision values were obtained for the retention times, 0.07 - 0.21% for intra-day and 0.5 - 1.8% for inter-day precision data, which could be partly ascribed to the use of an autosampler. The %RSD values obtained for peak areas were relatively high, 2.6 - 9.1% for intra-day and 4.2 - 14.4% for inter-day precision data. For samples, the %RSD for retention times were in the ranges of 0.12 - 0.3% and 0.4 - 2.0% for intra- and inter-day precision. The values of areas were in the ranges of 2.6 - 11.4% and from 3.8 to 15.4% for intra- and inter-day data, respectively. In any instance, the results obtained for TCs were higher than those obtained for Qs, which may be attributed to the higher instability of TCs, especially CTC. However, the precision values can be considered as acceptable bearing in mind EU guidelines [30].

The decision limit ( $CC\alpha$ ) for the pork/chicken ground mix samples were obtained for each analyte and the values obtained were 104.7, 105.2, 106.1, 108.0, 108.9 and 206.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for OTC, TET, CTC, OXO, NAL and FLU, respectively. Thus, the values for the detection capability ( $CC\beta$ ) in the analysed sample were 109.4, 110.4, 112.2, 116.0, 117.8 and 213.0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. NAL was assayed at

Table 2. Calibration parameters and LODs of the method

| Compound | Retention time (min) | Linear range (ng mL <sup>-1</sup> ) | Slope ± SD | y-intercept ± SD              | Regression coefficient (r) | LOD (ng mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| OTC      | 1.56                 | 2 - 7500                            | 478 ± 1    | (7.4 ± 1.5) × 10 <sup>2</sup> | 0.999991                   | 1.0                        |
| TET      | 2.32                 | 3 - 7500                            | 609 ± 1    | (1.7 ± 0.3) × 10 <sup>3</sup> | 0.999997                   | 1.5                        |
| CTC      | 4.97                 | 10 - 1000                           | 397 ± 2    | (1.7 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup> | 0.999824                   | 3.8                        |
| OXO      | 1.87                 | 0.5 - 2000                          | 10940 ± 30 | (6.4 ± 0.9) × 10 <sup>3</sup> | 0.999991                   | 0.25                       |
| NAL      | 3.39                 | 1.5 - 2000                          | 3826 ± 2   | (1.8 ± 0.9) × 10 <sup>3</sup> | 0.999998                   | 0.7                        |
| FLU      | 4.13                 | 2.5 - 2000                          | 2310 ± 2   | (2.3 ± 0.9) × 10 <sup>3</sup> | 0.999994                   | 1.2                        |

the lowest MRL defined for the other antibiotics, since it has not been approved for its use in food producing animals, although some other authors have used the quantification limit for the forbidden antibiotics [11]. Bearing this in mind, these values were assayed at the lowest concentration assayed for the recovery study, 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , finding that the values for  $\text{CC}\alpha$  and  $\text{CC}\beta$  were 54.5 and 59  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively.

A selectivity study was performed by assaying different antibiotics of veterinary use belonging to the TCs and Qs groups, such as doxycycline, minocycline, ciprofloxacin, difloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin and norfloxacin, or to other antibiotic groups such as penicillins (amoxicillin), cephalosporins (cefuroxime), aminoglycosides (amikacin), macrolides (erythromycin), ionophores (lasalocid), and sulfonamides (sulfasalazine). A compound was considered not to interfere when the signal obtained in the presence of the interfering compound was within one standard deviation of that of the analyte in its absence and there were no co-eluting compounds with the analytes of interest. The maximum potential interferent/analyte concentration ratio assayed was 100. Most of the antibiotics assayed were tolerated at higher concentrations than those of analytes. The tolerated ratio for ciprofloxacin, difloxacin, norfloxacin and marbofloxacin was 50, while that for doxycycline was 10. Only minocycline and enrofloxacin showed a tolerated ratio of 1, interfering at higher ratios in the determination of CTC and NAL, respectively. However, minocycline is not used for veterinary practice, so the probability of finding it in veterinary samples is scarce. Regarding enrofloxacin, the levels defined by the legislation are lower than those of the other acidic Qs determined in this work [2].

### 3.3. Applications

The new SPE-UHPLC method was applied to the analysis of several animal muscle samples (Table 3), which were purchased from a local market. Samples were spiked to 0.5-, 1- and 2-fold the MRL defined by the EU Commission [2] for the TCs and Qs determined, which are 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for OTC, TET, CTC and OXO in porcine

Table 3. Recovery study for the analysis of muscle samples

| Sample             | Added <sup>a</sup> | OTC                  |              | TET        |              | CTC        |              | OXO        |              | NAL        |              | FLU   |              |      |
|--------------------|--------------------|----------------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|-------|--------------|------|
|                    |                    | Found <sup>a,b</sup> | Recovery (%) | Found      | Recovery (%) | Found      | Recovery (%) | Found      | Recovery (%) | Found      | Recovery (%) | Found | Recovery (%) |      |
| Pork muscle        | 50                 | 47.7 ± 2.3           | 95.4         | 51.3 ± 1.9 | 102.6        | 39.7 ± 1.1 | 79.4         | 35.3 ± 0.7 | 70.6         | 38.4 ± 1.7 | 76.8         | 100   | 95.1 ± 4.6   | 95.1 |
|                    | 100                | 87.7 ± 4.9           | 87.7         | 89.3 ± 5.7 | 89.3         | 72.9 ± 7.3 | 72.9         | 77.1 ± 8.8 | 77.1         | 86.6 ± 9.9 | 86.6         | 200   | 189 ± 9      | 94.5 |
|                    | 200                | 184 ± 14             | 92.0         | 170 ± 13   | 85.0         | 157 ± 17   | 78.5         | 165 ± 11   | 82.5         | 174 ± 9    | 87.0         | 400   | 334 ± 14     | 83.5 |
| Minced pork        | 50                 | 51 ± 1               | 102          | 47.3 ± 0.7 | 94.6         | 48 ± 4     | 96.0         | 34.3 ± 1.3 | 68.6         | 30.6 ± 1.7 | 61.2         | 100   | 77 ± 9       | 77.0 |
|                    | 100                | 90.3 ± 2.3           | 90.3         | 86 ± 2     | 86.0         | 88.7 ± 1.7 | 88.7         | 92 ± 2     | 92.0         | 87.3 ± 2.3 | 87.2         | 200   | 169 ± 13     | 84.5 |
|                    | 200                | 176 ± 12             | 88.0         | 166 ± 11   | 83.0         | 173 ± 11   | 86.5         | 159 ± 14   | 79.5         | 155 ± 17   | 77.5         | 400   | 337 ± 20     | 84.3 |
| Chicken/ground mix | 50                 | 49.3 ± 3.3           | 98.6         | 49.7 ± 3.9 | 99.3         | 35.2 ± 2.9 | 70.4         | 32.1 ± 5.9 | 64.2         | 32.3 ± 4.6 | 64.6         | 100   | 72.7 ± 5     | 72.8 |
|                    | 100                | 100 ± 4              | 100          | 98.3 ± 2.9 | 98.3         | 65.3 ± 5.6 | 65.3         | 82 ± 6     | 82.0         | 87.3 ± 5.3 | 87.3         | 200   | 169 ± 9      | 89.5 |
|                    | 200                | 173 ± 14             | 86.5         | 174 ± 17   | 87.0         | 141 ± 19   | 70.5         | 135 ± 16   | 67.5         | 129 ± 11   | 64.7         | 400   | 269 ± 20     | 67.3 |
| Chicken muscle     | 50                 | 49 ± 1               | 98.0         | 50.7 ± 1.3 | 101.4        | 45.1 ± 0.5 | 90.2         | 36.7 ± 3.3 | 73.3         | 35.8 ± 5.1 | 71.6         | 200   | 123 ± 3      | 61.5 |
|                    | 100                | 90.1 ± 3.7           | 90.1         | 88.6 ± 0.9 | 88.6         | 88 ± 2     | 88.0         | 93.7 ± 6.3 | 93.7         | 94.8 ± 7.2 | 94.8         | 400   | 246 ± 4      | 61.5 |
|                    | 200                | 146 ± 5              | 73.0         | 130 ± 7    | 65.0         | 136 ± 7    | 68.0         | 197 ± 9    | 98.5         | 192 ± 7    | 96.0         | 800   | 692 ± 13     | 86.5 |

<sup>a</sup>Units: µg Kg<sup>-1</sup>

<sup>b</sup>Mean ± SD (n=3)

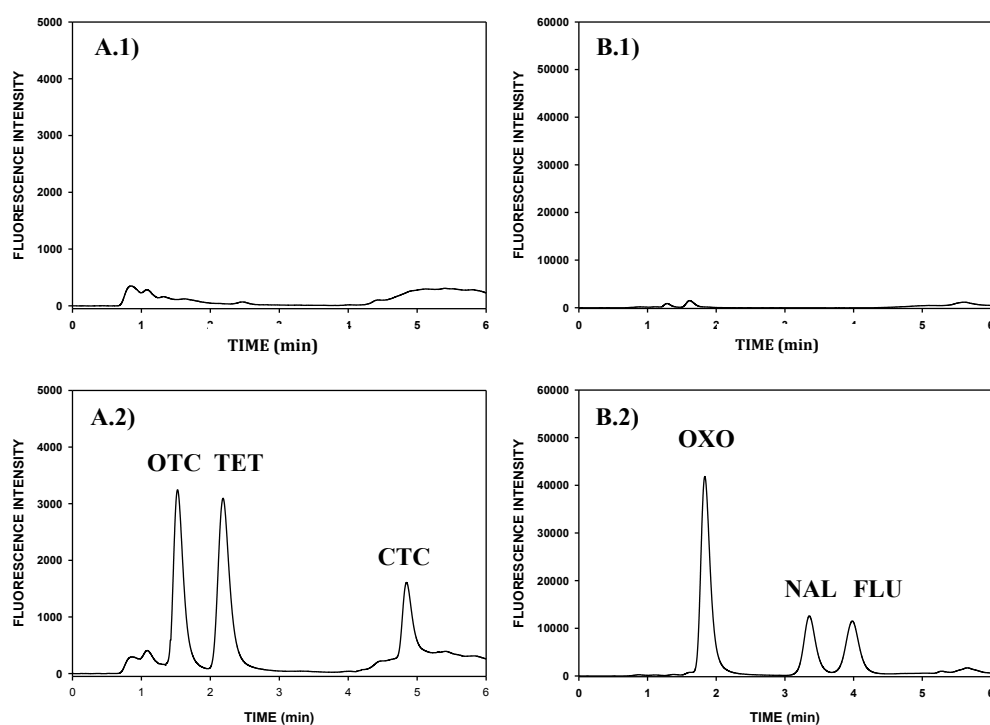


or poultry muscle, and 200 and 400  $\mu\text{g kg}^{-1}$  for FLU in porcine and poultry muscle, respectively. Although the use of NAL is not approved for food producing animals, it was added to the samples at the same concentrations as OXO. A previous solvent extraction step using ACN was used to separate the analytes from meat samples [21]. The extract was cleaned-up using dispersive solid-phase extraction with Eu- and Tb-coated magnetic nanocomposites, which retained the analytes and, after a washing step, the sample matrix components were removed. The analytes were sequentially eluted using magnesium nitrate solution at pH 9.8 for Qs and 75 mmol  $\text{L}^{-1}$  EDTA solution for TCs. None of the TCs or Qs assayed was detected in the analysed samples, as Figure 4 shows. This Figure also shows that the signals from sample did not overlap the analyte peaks, what also proves the good selectivity of the method for the determination of these antibiotics in meat samples. A recovery study was carried out by adding different amounts of each analyte to the original samples. Table 3 shows the results obtained, with mean recovery values for OTC, TET, CTC, OXO, NAL and FLU of 91.8%, 90.0%, 79.5%, 79.1%, 79.6 and 79.8%, respectively. Although some values were relatively low, they are comparable to those obtained using other extraction procedures [3, 6, 7, 10, 17]. Also, the use of the current nanomaterials avoids the use of organic solvents and the evaporation steps that are sometimes needed in order to make compatible the extraction step with the further chromatographic separation.

#### 4. CONCLUSIONS

A new Eu- and Tb-coated magnetic nanocomposite has been synthesized and used for the first time as sorbent for dispersive solid-phase extraction of two different groups of antibiotics for veterinary use, such as TCs and Qs, used as model analytes. The interaction of the sorbent with the analytes is based on the formation of the corresponding chelates. The sequential elution of the analytes is made in absence of organic solvents by a combination of pH changes and displacement reactions. This hybrid nanomaterial can find application for the extraction of different

organic compounds that have been reported to chelate europium and lanthanide ions.



**Figure 4.** Chromatograms of a blank sample of mix pork and chicken ground meat, (A.1) and (B.1), and of the same sample, (A.2) and (B.2), spiked with  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  of TET, OTC, CTC, NAL and OXO, and  $400 \mu\text{g kg}^{-1}$  of FLU. Chromatograms were obtained at  $\lambda_{\text{ex}}$  390 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  512 nm for TCs (A), and at  $\lambda_{\text{ex}}$  255 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  360 nm for Qs (B).

The magnetic core of these nanocomposites allows the use of multiple magnet devices for the separation of the supernatant and the nanomaterial, so that several samples can be simultaneously processed. The usefulness of this extraction step has been checked by its application to a new UHPLC separation method for the determination of six TCs and Qs antibiotics, which takes about 5 min.

The analytical usefulness of the method in food quality control has been demonstrated by its application to the analysis of different muscle samples at concentrations below their MRL.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN (Grant No. CTQ2012-32941), the Junta de Andalucía (Grant No.P09- FQM4933) and the FEDER Program. Authors also wish to acknowledge the support of Dr. Carlos Pérez-Vicente for his help with XRD measurements and to the Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) for the availability of TEM and XPS techniques.

## REFERENCES

- [1] A.A.M. Stolker, U.A.Th. Brinkmann, Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 15 – 53.
- [2] Commission Regulation EU No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. of the Eur. Union*, L15 (2010) 1-72.
- [3] H.B. He, C. Dong, B. Li, J.P. Dong, T.Y. Bo, T.L. Wang, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, Fabrication of enrofloxacin imprinted organic-inorganic hybrid mesoporous sorbent from nanomagnetic polyhedral oligomeric silsesquioxanes for the selective extraction of fluoroquinolones in milk samples, *J. Chromatogr. A*, 1361 (2014) 23 – 33.
- [4] L. Wang, Q. Yuan, G. Liang, L. Shi, Q. Zhan, Magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the extraction and rapid determination of six fluoroquinolones in environmental water samples, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 996 – 1001.
- [5] L. Norambuena, N. Gras, S. Contreras, Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments, *Marine Pollut. Bull.* 73 (2013) 154 – 160.
- [6] H. Zang, S. Chen, Y. Lu, Z. Dai, Simultaneous determination of quinolones in fish by liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Comparison of sub-2  $\mu\text{m}$  particles and conventional C18 columns, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 1959 – 1967.

- [7] N. Arroyo-Manzanares, J.F. Huertas-Pérez, M. Lombardo-Agüí, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, A high-throughput method for the determination of quinolones in different matrices by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Methods* 7 (2015) 253 – 259.
- [8] M. Gao, H. Wang, M. Ma, Y. Zhang, X. Yin, R.A. Dahlgren, D. Du, X. Wang, Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid-liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food, *Food Chem.* 175 (2015) 181 – 188.
- [9] J. Blesa, L.J.G. Silva, C.M. Lino, G. Font, A. Pena, Comparison of three solid-phase extraction processes in quantification of ciprofloxacin and enrofloxacin in pork meat. *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 832 – 838.
- [10] I. Jiménez-Díaz, M.P. Hermo, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, D. Barrón, J. Barbosa, A. Navalón, Comparison of three analytical methods for the determination of quinolones in pig muscle samples, *Chromatographia* 76 (2013) 707 – 713.
- [11] J.L. Urraca, M. Castellari, C.A. Barrios, M.C. Moreno-Bondi, Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1343 (2014) 1 – 9.
- [12] A.L. Pena, C.M. Lino, M.I.N. Silveira, Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 5 (2003) 925 – 929.
- [13] R.C. Rodríguez Díaz, J.M. Fernández Romero, M.P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens, Determination of Fluoroquinolones in Milk Samples by Postcolumn Derivatization

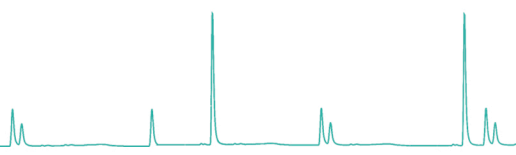
- Liquid Chromatography with Luminescence Detection, *J. Agric. Food Chem.*, 54 (2006) 9670-9676.
- [14] R.C. Rodríguez Díaz, J.M. Fernández Romero, M.P. Aguilar Caballos, A. Gómez Hens, Chromatographic determination of flumequine in food samples by post-column derivatisation with terbium(III), *Anal. Chim. Acta* 578 (2006) 220-226.
- [15] J. Georges, Lanthanide-sensitized luminescence and applications to the determination of organic analytes, *Analyst* 118 (1993) 1481.
- [16] G.S. Yanez-Jácome, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Luminescent determination of quinolones in milk samples by liquid chromatography/post-column derivatization with terbium oxide nanoparticles, *J. Chromatogr. A* 1405 (2015) 126 – 132.
- [17] D.G. Rocha, F.A. Santos, J.C. da Silva, R. Augusti, A.F. Faria, Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1379 (2015) 83 – 91.
- [18] L. Lucatello, P. Cagnardi, F. Capolongo, C. Ferraresi, F. Bernardi, C. Montesissa, Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys, *Food Control* 48 (2015) 2 – 11.
- [19] A. Junza, N. Dorival-García, A. Zafra-Gómez, D. Barrón, O. Ballesteros, J. Barbosa, A. Navalón, Multiclass method for the determination of quinolones and b-lactams, in raw cow milk using dispersive liquid-liquid microextraction

- and ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1356 (2014) 10 – 22.
- [20] M. Bourdat-Deschamps, S. Leang, N. Bernet, J.J. Daudin, S. Nélieu, Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by on-line solid-phase extraction-ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction, *J. Chromatogr. A* 1349 (2014) 11 – 23.
- [21] A. Freitas, J. Barbosa, F. Ramos, Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Meat Sci.* 98 (2014) 58 – 64.
- [22] J. He, M. Huang, D. Wang, Z. Zhang, G. Li, Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 101 (2014) 84 – 101.
- [23] R. Gao, X. Cui, Y. Hao, L. Zhang, D. Liu, Y. Tang, A highly-efficient imprinted magnetic nanoparticle for selective separation and detection of 17 $\beta$ -estradiol in milk, *Food Chem.* 194 (2016) 1040 – 1047.
- [24] S. Ma, M. He, B. Chen, W. Deng, Q. Zheng, B. Hu, Magnetic solid phase extraction coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of mercury in environmental water and human hair samples, *Talanta* 146 (2016) 93 – 99.
- [25] C.R. Anderson, H. S. Rupp, W.H Wu, Complexities in tetracycline analysis – chemistry, matrix extraction, clean up, and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 23 – 32.

- [26] L. Aguilar-Vázquez, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, Development of an automatic high-throughput assay for tetracycline determination by using  $\text{Eu}_2\text{O}_3$  nanoparticles and dry-reagent technology, *Talanta*, 119 (2014) 111-115.
- [27] M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez Hens, Application of  $\text{Tb}_4\text{O}_7$  nanoparticles for lasalocid and salicylate determination in food analysis, *J. Agric. Food Chem.*, 60 (2012) 11741 – 11747.
- [28] Z.Y. Ma, D. Dosev, M. Nichkova, S.J. Gee, B.D. Hammock, I.M. Kennedy, Synthesis and bio-functionalization of multifunctional magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Y_2\text{O}_3:\text{Eu}$  nanocomposites, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 4695 – 4700.
- [29] G. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A – 724A.
- [30] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Union*, L125 (2002) 10 – 32.
- [31] A. Jafari, S.F. Shayested, M. Salouti, K. Boustani, Effect of annealing temperature on magnetic phase transition in  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles, *J. Magnetism Magnetic Mat.* 379 (2015) 305 – 312.
- [32] S. Babic, A.J.M. Horvat, D.M. Pavlovic, M. Kastelan-Macan, Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 1043 – 1061.







# CAPÍTULO IV



NUEVOS DESARROLLOS  
EN CROMATOGRAFÍA DE  
LÍQUIDOS RÁPIDA CON  
DETECCIÓN LUMINISCENTE



**E**n este Capítulo se incluyen las investigaciones realizadas con el fin de establecer nuevas metodologías analíticas rápidas con detección luminiscente en análisis agroalimentario. Estas investigaciones han originado las siguientes publicaciones científicas:

- ❑ Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography. M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens. *Journal of Chromatography B*, 985 (2015) 85-90.
- ❑ Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast liquid chromatography and luminescence detection. M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, enviado, septiembre 2016.

El objetivo de estas investigaciones ha sido ampliar la disponibilidad de métodos fiables y rápidos que también permitan mejorar las propiedades analíticas de otras metodologías previamente descritas aplicadas al análisis agroalimentario. Se ha intentado aumentar la velocidad de muestreo en cromatografía de líquidos y, como resultado, agilizar los procedimientos en los laboratorios de control de calidad en el sector agroalimentario. Los dos métodos desarrollados utilizan detección luminiscente, midiendo la fluorescencia intrínseca de los analitos en el primero y utilizando una reacción de derivatización post-columna en el segundo.

El método desarrollado para la determinación de ácido acetilsalicílico y sus tres principales metabolitos (ácido salicílico, ácido gentísico y ácido salicilúrico), mediante cromatografía de líquidos ultra-rápida (UHPLC), permite la separación y cuantificación de estos compuestos en menos de dos minutos. Se consigue la determinación de un número mayor de analitos con tiempos de retención menores y mejores límites de detección que en otros métodos previamente descritos con el mismo fin [1-4].

En el método propuesto para la determinación de penicilinas de uso veterinario se han utilizado columnas “*fused-core*” empaquetadas con partículas cuyo diámetro es de 2,7  $\mu\text{m}$ , cuya estructura consiste en un núcleo no poroso recubierto por una capa de nanopartículas esféricas de sílice funcionalizada. Este tipo de columnas permite obtener separaciones rápidas utilizando un cromatógrafo convencional, similares a las obtenidas en UHPLC, pero evita trabajar con presiones elevadas. Para la cuantificación de los analitos se ha utilizado derivatización post-columna mediante el sistema cloruro de rutenio(II)-tris-(2,2'-bipiridina)-cerio(IV), proponiendo por primera vez la detección luminiscente de penicilinas como alternativa a la espectrometría de masas [5-8] o a la fotometría UV [8-11].

Las metodologías desarrolladas permiten la determinación de especies químicas de interés en el control de la calidad y seguridad agroalimentaria, ya que los analitos son analgésicos y antibióticos de uso veterinario. El control de los residuos de estos compuestos es básico en la seguridad agroalimentaria debido, fundamentalmente, a la repercusión negativa que pueden presentar en la salud del consumidor. Por ello, su presencia en alimentos está estrictamente regulada por la Unión Europea, mediante el reglamento n° 37/2010, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación de acuerdo a los límites máximos de residuo en alimentos de origen animal [12].

## REFERENCIAS

- [1] S.K. Bae, K.A. Seo, E.J. Jung, H.S. Kim, C.W. Yeo, J.H. Shon, K.M. Park, K.H. Liu, J.G. Shin, Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix® in Korean healthy volunteers, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 590 – 595.
- [2] X. Xu, L. Koetzner, J. Boulet, H. Maselli, J. Beyenhof, G. Grover, Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 973 – 979.
- [3] C. Gosh, A. Upadhayay, A. Singh, S. Bahadur, P. Jain, B.S. Chakraborty, Simultaneous determination of aspirin and its metabolite from human plasma by UPLC-UV detection: Application to pharmacokinetic study, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 34 (2011) 2326 – 2338.
- [4] P. Rubak, T.F. Hardlei, M. Würtz, S.D. Kristensen, A.M. Hvas, Low-dose acetylsalicylic acid therapy monitored with ultra high performance liquid chromatography, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 988 – 992.
- [5] R. Cazorla-Reyes, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, M.A. Rodríguez-Maresca, J.L. Martínez-Vidal, Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 203 – 212.
- [6] O.J. Pozo, C. Guerrero, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 83 – 93.

- [7] C.P. Rezende, M.P. Almeida, R.B. Brito, C.K. Nonaka, M.O. Leite, Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle, *Food Addit. Cont. A* 29 (2012) 541 – 549.
- [8] F.J. Lara, M. del Olmo-Iruela, C. Cruces-Blanco, C. Quesada-Molina, A.M. García-Campaña, Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 38 (2012) 52 – 66.
- [9] V.F. Samanidou, E.G. Karageorgou, On the use of Kinetex<sup>TM</sup>-C18 core shell 2.6  $\mu$ m stationary phase to the multiclass determination of antibiotics, *Drug Test. Analysis* 3 (2011) 234 – 244.
- [10] M. Cámara, A. Gallego-Picó, R.M. Garcimuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, P.J. Sánchez, An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine  $\beta$ -lactam antibiotics in ewe milk, *Food Chem.* 141 (2013) 829 – 834.
- [11] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of  $\beta$ -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2599 – 2607.
- [12] Commission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. Eur. Union*, L15 (2010) 1 – 72.



### **Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography**

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

*Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Campus of Rabanales, Annex to Marie Curie Building, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain*

A new method based on ultra high performance liquid chromatography (UPLC) with photometric and fluorometric detection for the determination of acetylsalicylic acid and its main metabolites, namely gentisic, salicylic and salicyluric acids, in bovine urine samples is reported. Photometric detection was used for acetylsalicylic acid determination, whereas the native fluorescence of the metabolites was monitored using fluorometric detection. The separation was performed under isocratic conditions, using acetonitrile – phosphate solution (3.5 mM, pH 3.5) (26:74, v/v) as the mobile phase. The retention times of the four compounds were lower than 2 min, which are shorter than those achieved using conventional HPLC. Under the optimum separation conditions, the dynamic ranges and detection limits ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) were: 0.2 – 2500, 0.09 for gentisic acid; 0.2–2500, 0.08 for salicylic acid and 2.5 – 15000, 1.1 for salicyluric acid, using fluorescence detection, and 10 – 25000, 2.2 for acetylsalicylic acid, using UV detection. Intra-day and inter-day precision data were assessed at two levels of concentration of each analyte using both detection systems. The selectivity of the method was checked by assaying different drugs of veterinary use showing that most of them did not interfere the determination of the analytes. The method has been applied to the analysis of bovine urine samples, which only required a simple clean up step of the samples prior to injection in the UPLC system. A recovery study was performed, which provided values in the range of 80 – 100%. This fact proves the practical usefulness of this method as an ultrafast analytical tool for the therapeutic control of acetylsalicylic acid administration in bovine animals intended for food production.

**KEYWORDS:** *acetylsalicylic acid, major metabolites, ultraperformance liquid chromatography, photometric and fluorometric detection, bovine urine samples*





## **I. INTRODUCTION**

Acetylsalicylic acid (ASA) is a non-steroidal anti-inflammatory drug, which therapeutic action happens both at locally and peripheral inflammatory sites by inhibiting cyclooxygenase enzymes [1]. ASA has a really widespread use because it also has other beneficial therapeutic properties, such as analgesic and anti-pyretic action. ASA is rapidly hydrolyzed to salicylic acid (SAL), which is the active metabolite and has a half-life of 2.5-4 h in the body. It can be further conjugated to glycine to give rise to salicyluric acid (SAU) or to glucuronic acid to form glucuronide conjugates or being excreted as unchanged SAL [2]. Another SAL metabolite is gentisic acid (GEN), which is obtained after SAL oxidation. These metabolites are eliminated from the body by urinary excretion, their ratio and concentration being dependent on urinary pH. The renal elimination of SAL in ASA overdose cases is favored by increasing the pH to alkaline values. Owing to this behavior, although excretion of ASA metabolites follows zero-order kinetics, there is not always a clear correlation between their serum and urine concentrations. However, urine is a specimen easy to obtain that can provide an initial estimation of ASA intake, being ferric chloride used as reagent when overdose is suspected [3]. If positive, these results can be later confirmed by analyzing serum samples.

ASA and SAL are used for veterinary purposes, the extent of their use depending on the region of the world considered. For instance, the European Union allows their use for veterinary purposes in all food producing species except fin fish and animals intended for egg or milk production [4]. The US Food and Drug Administration totally disapproves their use in cattles and calves because the lack of evidence about their therapeutic action in these animals [5]. The occurrence and fate of SAL in calf urine samples has been previously studied [6], finding that the prevalence of the different metabolites depends on the administration route. The intravenous injection leads to high SAL concentration in urine samples, whereas oral administration enhances SAU concentration in this biological fluid. It has been reported that the concentration of glucuronide conjugates in bovine urine samples is

almost negligible, which simplifies the assay and eliminates the need of using glucuronidase enzyme for the determination of total ASA metabolites in this species.

Although some sensors have been developed for the determination of ASA [7] and SAL in urine samples [8], the determination of ASA and its metabolites is usually carried out using a separation technique, such as capillary electrophoresis (CE) [9-11], HPLC [2, 12-19] and ultra high performance liquid chromatography (UPLC) [20-22]. CE methods mainly involve laser-induced fluorescence detection to overcome the sensitivity problems associated to injecting only some nL of each sample. Numerous HPLC methods have been described using photometric [2, 12-14], MS [2, 16, 17] and, in less extension, fluorometric [18,19] and amperometric [15] detection. These chromatographic methods have been applied to the analysis of human biological fluids, such as serum [12, 15, 19], plasma [13, 14, 17, 18] and urine [13, 14] and most of them only determine ASA and SAL [12, 17, 18, 19]. An HPLC method with fluorometric detection has involved a post-column hydrolysis reaction to achieve the determination of ASA, which needs the use of a second pump and all lines and connectors associated that complicate the experimental set-up [19].

UPLC with UV detection has been used to determine ASA and SAL in human plasma samples in less than 3 min under isocratic conditions [20, 21], which was applied to perform pharmacokinetic studies. Another UPLC method has been reported for the determination of ASA and other anti-inflammatory drugs (ketoprofen, diclofenac, naproxen and ibuprofen) in human urine samples, using microextraction by packed sorbent, to perform the sample preparation [22]. Also, UPLC with tandem MS has been applied to the determination of drug residues, including SA, in milk and dairy products [23] and infant formula samples [24]. However, the use of UPLC for the fast determination of ASA and its metabolites SAL, SAU and GEN in bovine urine samples has not been reported up to date.

The method presented here describes the separation of these compounds in less than 2 min under isocratic conditions. Photometric and fluorometric (FL) detectors have been used to perform the determination, which provide complementary information. A solid phase extraction (SPE) with polymeric cartridges has been included to clean up the samples prior their introduction into the chromatographic system. Afterwards, a simple dilution step was performed in order to match the dynamic range of the calibration curves, which were obtained by using external calibration with aqueous standards. The low detection limits obtained enable a reliable detection of ASA and its metabolites in bovine urine samples, which can be used as part of the process of monitoring and surveillance of animal origin products.

## **2. EXPERIMENTAL**

### **2.1 Instrumentation and chromatography conditions**

The UPLC system used consisted of the high pressure pump unit (LC-30AD), a degasser (DGU-20A5), an autosampler (SIL-30AC) equipped with a sample cooler set to 15°C, a column oven (CTO-10AS vp), an UV/VIS detector (SPD-20A) and a fluorescence detector (RF-20AXS) (Shimadzu, Kyoto, Japan). A Synchronis C18 column (100 mm x 2.1 mm I.D., particle size 1.7 µm; Thermoscientific, Inc., Waltham, MA) was used as stationary phase for the separation. A 24-port VisiPrep vacuum device and HLB cartridges (60 mg/3mL) from Supelco (Bellefonte, PA) were used to perform SPE experiments.

### **2.2 Reagents and solutions**

All reagents were of analytical grade. Gentisic acid was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), salicylic acid from Aldrich (Milwaukee, USA), salicyluric acid from Zerenex molecular (Greater Manchester, UK) and acetylsalicylic acid from Fluka (Buchs, Switzerland). Stock solutions of these compounds (1000 mg L<sup>-1</sup> each) were prepared in acetonitrile (ACN) and stored at 4 °C. Working solutions were

prepared by dilution of the stock solutions in doubly deionized water. ACN, methanol (both of HPLC-gradient grade) and 85% ortho-phosphoric acid were supplied by Panreac (Castellar del Vallès, Spain). The pH of the phosphate solution (3.5 mM) was adjusted to 3.5 by adding sodium hydroxide and the solution was filtered using a 0.22  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter (Millipore, Bedford, USA). Bovine urine samples were kindly donated by Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (Córdoba, Spain).

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Determination of acetylsalicylic acid and its metabolites by UPLC

A volume (8  $\mu\text{L}$ ) of a standard mixture of analytes or diluted sample extract, in the ranges of 0.2 – 2500  $\text{ng mL}^{-1}$  for GEN and SAL, 2.5 – 15000  $\text{ng mL}^{-1}$  for SAU, and 10 – 25000  $\text{ng mL}^{-1}$  for ASA, was injected onto the chromatographic system. The analytes were isocratically separated using a mobile phase composition of (26:74, v/v) ACN – 3.5 mM phosphate solution (pH 3.5) at a flow-rate of 0.63  $\text{mL min}^{-1}$ . The temperature was kept at 40°C in the column oven. Chromatograms were obtained using photometric and fluorometric detectors. UV chromatograms were recorded at 240 nm using a response time of 1 s and the temperature of the detector was set at 40 °C. Fluorescence detection was performed using a wavelength program, as follows:  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm  $\lambda_{\text{em}}$  444 nm from 0 to 1.14 min and  $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm  $\lambda_{\text{em}}$  410 nm from 1.15 to 3 min, with a spectral bandwidth of 20 nm and a time response of 1 s in each case, and the measurements were obtained at 40 °C. Each standard or sample extract was assayed in triplicate. Chromatograms were processed by using LabSolutions LC/GC software (release 5.42 SP5).

#### 2.3.2. Assessment of precision

The precision of the method using photometric and fluorometric detection was evaluated at two different concentration levels, 100 and 500  $\text{ng mL}^{-1}$  and 15 and 200  $\text{ng mL}^{-1}$ , respectively. Precision values were obtained by injecting six solutions on the same day, which were analyzed in triplicate (intra-day data), and one solution,

which was analyzed in triplicate for 15 different days (inter-day data). The percentage of relative standard deviation (%RSD) was calculated for retention times and areas in each case.

#### *2.3.3. Estimation of limits of detection*

The estimation of the limits of detection (LODs) was done following IUPAC recommendations [25], which involve the use of a signal-to noise ratio of 3. The signal considered as the blank signal was the y-intercept of the calibration curve made using 15 mixtures of aqueous standards of the compounds determined.

#### *2.3.4. Analysis of bovine urine samples*

A volume (1.0 mL) of urine sample was acidified to pH 1.3 with 1 M HCl and immediately applied to HLB cartridges previously conditioned using 5 mL methanol and 5 mL of 0.045 M HCl (pH 1.3). Cartridges were washed with 2 mL of 0.045 M HCl (pH 1.3) to remove interferences and the analytes were eluted with 1 mL of 90% ACN. Afterwards, extracts were diluted in ratios (1:500 – 1:2000) to match the dynamic range of the calibration curves. A volume of the diluted extract was treated as indicated in Section 2.3.1. The recovery study was carried out using urine samples spiked with different amounts of the analytes, which were treated in a similar way and diluted 2000-fold.

### **3. RESULTS AND DISCUSSION**

#### ***3.1. Study of the chromatographic system using photometric and fluorometric detection***

Absorbance spectra of the analytes were recorded in the range of 200–400 nm in order to select the wavelengths of the UPLC method with photometric detection. The wavelength chosen was 240 nm, which is the same as that described previously for this determination [2, 12, 22]. The suitability of this wavelength was further confirmed by assaying mixtures of these compounds into the chromatographic system.

Excitation and emission spectra of the assayed compounds were recorded to choose the optimum wavelengths for the fluorometric detection, which are  $\lambda_{\text{ex}}$  320 nm and  $\lambda_{\text{em}}$  444 nm for GEN, and  $\lambda_{\text{ex}}$  295 nm,  $\lambda_{\text{em}}$  410 nm for SAU and SAL. ASA did not exhibit fluorescent properties. A wavelength program was optimized in order to obtain the best signal for each compound. The adequate selection of time intervals for each wavelength is essential to avoid baseline changes and peak distortions, which was achieved by selecting 1.14 min as the time to change from the first pair of excitation and emission wavelengths to the second one.

Photometric detection was used to determine the potential presence of residual ASA in the samples analyzed. The metabolites were quantified using fluorometric detection, which improves the detection limits and the selectivity of their determination, as it will be discussed below.

### **3.2. Optimization of variables**

The hydrodynamic and chemical variables involved in the system, using photometric and fluorometric data, were optimized by applying the univariate methodology. Values chosen were those yielding the maximum absorbance and fluorescence signals with a minimum standard deviation.

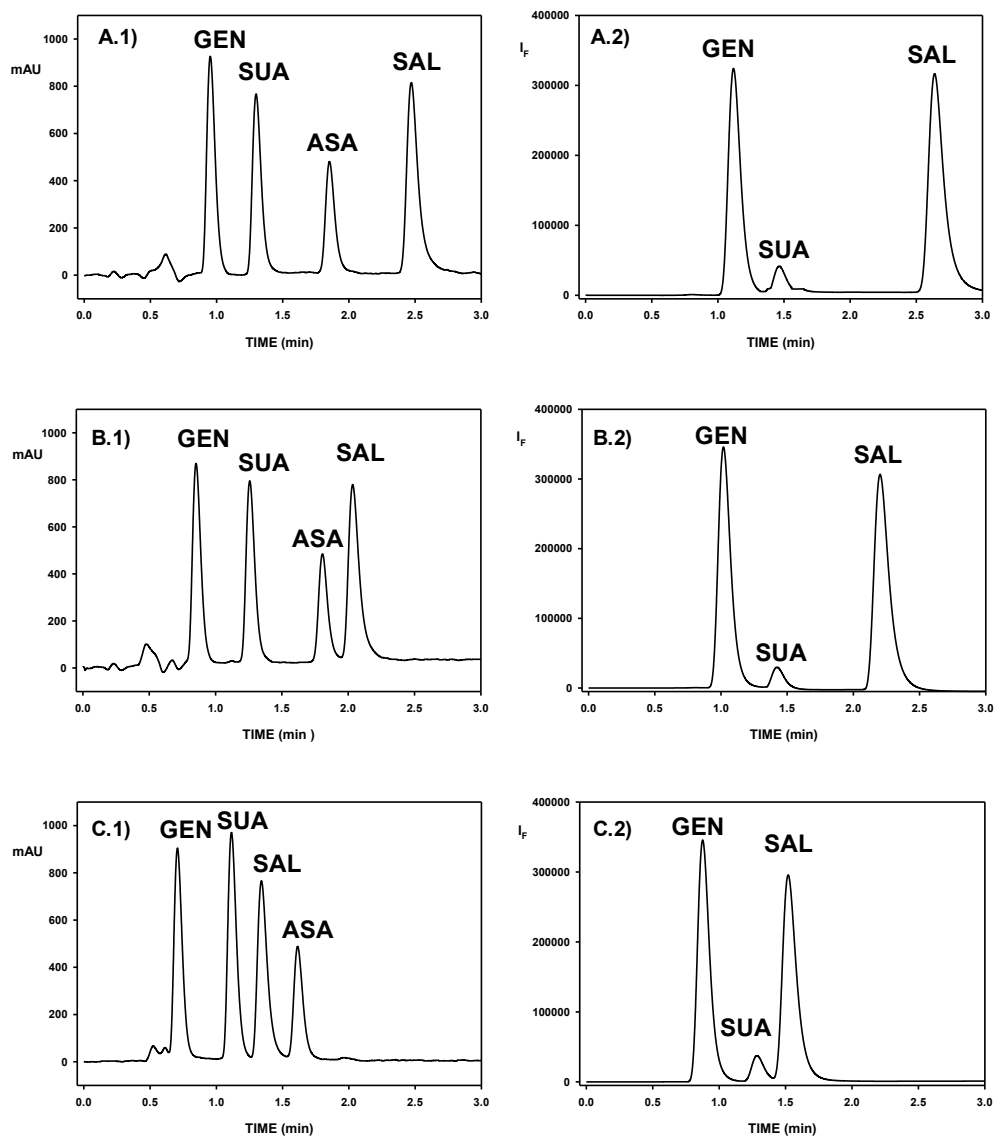
The study of the composition of mobile phase was performed in the isocratic mode by assaying methanol and ACN. The high pressure values obtained in the presence of methanol only allowed the use of 0.35 mL min<sup>-1</sup> as the flow rate, leading to retention times of about 4.5 min. The pressure values using ACN were much lower than those obtained using methanol and the fluorescence signals obtained with both solvents were very similar, so ACN was used to develop the chromatographic separation. The percentage of organic solvent was studied in the range of 25 - 37%, finding that high percentages of ACN resulted in lower retention times, but peaks from GEN, SAU and SAL were not resolved at the baseline level.

The use of 26% ACN resulted in retention times shorter than 2 min, which were resolved to the baseline, so this percentage was chosen.

The flow-rate was optimized by using the optimum mobile phase composition, in the range of 0.35 – 0.63 mL min<sup>-1</sup>. The upper limit of the interval was chosen as the optimum value because lower flow-rate values assayed provided longer retention times. The pressure obtained using 0.63 mL min<sup>-1</sup> as the flow rate was about 900 bars. Higher flow rate values were not assayed to avoid damage in the column because the limit of column pressure indicated by the manufacturer is 1000 bars.

Figure 1 shows the influence of the pH, which was studied in the interval 2.5 – 4, on the chromatograms obtained using photometric and fluorometric detection. As can be seen, the retention times decrease as the pH increases, but the absorbance and fluorescence intensity values obtained for the analytes were practically similar in the pH range assayed. According to these results, a pH of 3.5 was chosen. Phosphate and acetate buffer solutions were assayed, in the concentration ranges of 1-5 mM and 10-25 mM, respectively, to provide this pH value, finding that the performance of the chromatographic systems was similar. Phosphate buffer solution was chosen because it is less volatile than acetate, so solutions are more stable. Also, it has been described [19] that ASA hydrolysis is lower at this pH when phosphoric acid is in the medium, which contributes to minimize the errors in the determination of ASA and SAL. The chromatographic peaks obtained in the presence of a low phosphate buffer concentration (1 mM) were slightly wider and the retention times longer than those obtained using more concentrated phosphate solutions. However, SAU and SAL peaks were partially overlapped when the phosphate concentration was 5 mM. Thus, a 3.5 mM phosphate concentration was chosen, since it provided short retention times with the best resolution for SAU and SAL.





**Figure 1.** Influence of pH on the separation of GEN, SUA, SAL and ASA ( $200 \text{ ng mL}^{-1}$  of each analyte) using photometric (1) and fluorometric (2) detection. The pH values are: A) 2.6, B) 3.0, C) 3.5. Flow-rate:  $0.63 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $[\text{phosphate}] = 3.5 \text{ mM}$ , mobile phase composition, ACN:phosphate (26:74).

The temperature for the separation was studied, since the viscosity of organic solvents usually decreases when the temperature is increased, so lower pressures are observed. A temperature interval of 30 – 40 °C was assayed, finding the best results at 40 °C. Higher temperatures were not assayed because the detectors can operate at 45°C as the maximum temperature according to specifications. The study of the volume injected, in the interval 2-10 mL, showed that peak areas increased proportionally with the increase of this variable. A volume of 8 mL was chosen since it provided high peak areas with relatively low peak broadening.

With the aim of shortening retention times, some gradient programs were assayed, but none of them improved the separation. Bearing in mind that re-equilibration times are not needed when the isocratic mode is used, the use of gradient modes was discarded.

### **3.3 Analytical features**

Calibration graphs were run under the optimum experimental conditions by using an external calibration method. Table I shows the retention time for each compound, the calibration parameters, and the LODs obtained using both photometric and fluorometric detectors, which were calculated according IUPAC recommendations [25]. These LODs are lower than or comparable to those of other methods previously reported [10-15, 18-20, 22]. As it can be seen from the table, the LODs obtained for GEN, SAU and SAL using fluorometric detection are about 100, 12 and 150 times lower, respectively, than those obtained using photometric detection. These results justify the use of the combination of both detection systems for the sensitive determination of ASA and its major metabolites. The good regression coefficient values indicate a good fit of experimental data to the calibration curve.

Table I. Calibration parameters and LODs of the method

| Compound | Retention time (min) | Linear range (ng mL <sup>-1</sup> ) | Slope ± SD   | y-intercept ± SD              | Regression coefficient (r) | LOD (ng mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------|-------------------------------------|--------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| GEN      | 0.71                 | 25 - 2500                           | 31.7 ± 0.1   | (1.9 ± 0.9) × 10 <sup>2</sup> | 0.99997                    | 9                          |
|          | 0.88                 | 0.2 - 2500                          | 17498 ± 8    | (5.5 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup> | 0.99995                    | 0.09                       |
| SAU      | 1.12                 | 30 - 20000                          | 39.2 ± 0.1   | (2 ± 1) × 10 <sup>2</sup>     | 0.9995                     | 13                         |
|          | 1.29                 | 2.5 - 15000                         | 2252 ± 2     | (2.3 ± 0.9) × 10 <sup>3</sup> | 0.99960                    | 1.1                        |
| SAL      | 1.34                 | 25 - 2000                           | 36.7 ± 0.3   | (2 ± 1) × 10 <sup>2</sup>     | 0.99979                    | 12                         |
|          | 1.52                 | 0.2 - 2500                          | 18673 ± 9    | (4.9 ± 0.5) × 10 <sup>3</sup> | 0.99996                    | 0.08                       |
| ASA      | 1.61                 | 10 - 25000                          | 20.30 ± 0.03 | 35.7 ± 15.1                   | 0.99972                    | 2.2                        |

*Italics indicate fluorometric method*

Intra-day and inter-day precision data, expressed as %RSD, for both retention time and peak area, were obtained at two different concentration levels of each analyte, using photometric (100 and 500 ng mL<sup>-1</sup>) and fluorometric (15 and 200 ng mL<sup>-1</sup>) detection. Table 2 summarizes the results obtained, where it can be seen that the precision values of the retention times, using both detection systems, are very low: 0.06 - 0.15% for intra-day data and 0.2 - 1.4% for inter-day precision data. These low values can be partly ascribed to the use of an autosampler. Intra-day and inter-day precision values obtained for the peak areas were equal to or lower than 6.3% and 9.2%, respectively, obtaining slightly better results when fluorometric detection was used.

**Table 2.** Intra-day and inter-day precision values (%RSD)

| Compound |                  | Photometric detection |                |                |                | Fluorometric detection |                |                |                |
|----------|------------------|-----------------------|----------------|----------------|----------------|------------------------|----------------|----------------|----------------|
|          |                  | Retention time        |                | Area           |                | Retention time         |                | Area           |                |
|          |                  | A <sup>b</sup>        | B <sup>b</sup> | A <sup>b</sup> | B <sup>b</sup> | A <sup>b</sup>         | B <sup>b</sup> | A <sup>b</sup> | B <sup>b</sup> |
| GEN      | ( <sup>1</sup> ) | 0.09                  | 0.3            | 5.0            | 7.0            | 0.1                    | 0.6            | 3.3            | 6.1            |
|          | ( <sup>2</sup> ) | 0.15                  | 0.7            | 1.4            | 6.3            | 0.09                   | 0.6            | 1.8            | 5.1            |
| SAU      | ( <sup>1</sup> ) | 0.07                  | 0.2            | 6.3            | 9.2            | 0.09                   | 0.6            | 3.4            | 8.8            |
|          | ( <sup>2</sup> ) | 0.11                  | 0.3            | 1.3            | 8.4            | 0.13                   | 0.5            | 1.9            | 6.4            |
| SAL      | ( <sup>1</sup> ) | 0.06                  | 0.6            | 2.1            | 1.4            | 0.13                   | 1.2            | 2.4            | 3.8            |
|          | ( <sup>2</sup> ) | 0.12                  | 0.5            | 5.6            | 3.3            | 0.14                   | 1.4            | 1.3            | 4.0            |
| ASA      | ( <sup>1</sup> ) | 0.06                  | 0.3            | 5.0            | 6.7            |                        |                |                |                |
|          | ( <sup>2</sup> ) | 0.09                  | 0.3            | 1.3            | 6.4            |                        |                |                |                |

<sup>a</sup>Concentrations assayed, photometric detection: (<sup>1</sup>)100 ng mL<sup>-1</sup> and (<sup>2</sup>)500 ng mL<sup>-1</sup>; fluorometric detection: (<sup>1</sup>) 15 ng mL<sup>-1</sup> and (<sup>2</sup>) 200 ng mL<sup>-1</sup> of each analyte

<sup>b</sup>A: intra-day precision (n=6), B: inter-day precision (n=15)

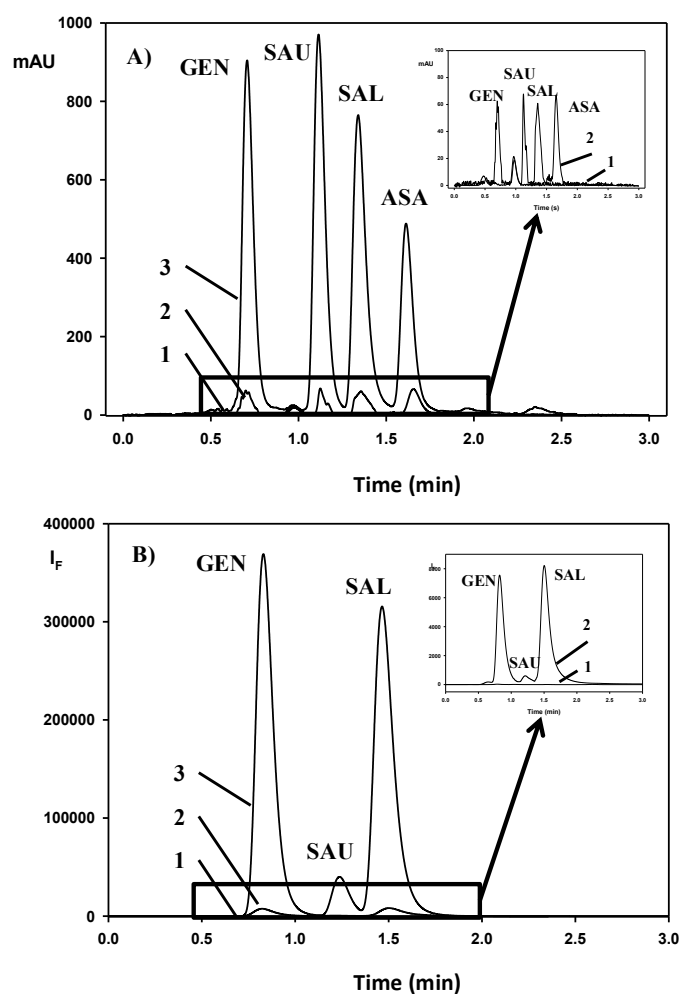
A selectivity study was performed in order to investigate the potential interference of other drugs of veterinary use on the determination of GEN, SAU, SAL and ASA. A compound was considered not to interfere when the signal

obtained in the presence of the interfering compound was within one standard deviation of that of the analytes in its absence. Non-steroidal antiinflammatory drugs, such as ketoprofen, antibiotics, such as penicillins (amoxicillin), aminoglycosides (gentamicin, neomycin, and streptomycin), macrolides (erythromycin, spiramycin), ionophores (lasalocid, monensin and tylosin), quinolones (flumequine), tetracyclines (tetracycline) and sulfonamides (sulfadimethoxine) were assayed. The maximum potential interferent/analyte concentration ratio assayed was 100. Neither of these compounds interfered in the determination of GEN, SAU and SAL at the maximum ratio assayed using fluorometric detection. However, some interferences were found when photometric detection was used. Thus, amoxicillin and tetracycline interfered in the GEN determination at the same concentration level, whereas ketoprofen only was tolerated at a concentration 20-fold than those of all the analytes. This study demonstrates the usefulness of the fluorometric detection to improve the selectivity.

### **3.4. Applications**

The UPLC method was applied to the analysis of bovine urine samples, using photometric detection for ASA determination and fluorometric detection for GEN, SAU and SAL determination. A SPE step was included in the process in order to clean up the samples prior to injection, which is usual for the determination of these compounds in urine samples [12, 22]. A polymeric phase was used to retain the analytes, since they contain an aromatic benzene ring. The urine sample, acidified to pH 1.3 with 1 M HCl, was applied to the cartridges, which were afterwards washed with 0.045 M HCl in order to elute some components of the sample matrix. The analytes were eluted using 90% ACN because the use of a higher percentage of this solvent also eluted some interfering compounds from sample matrix. The analytes were not detected in the samples analyzed. The potential effect of the sample matrix on the system was studied by assaying different dilutions of the sample, after the SPE treatment. The results obtained showed that this variable did not affect the determination of the analytes from a 1:500 dilution. Although a 1:2000 sample dilution was used to carry out the recovery study below described, a lower dilution

could be performed for the analysis of samples containing very low concentrations of the analytes. Figure 2 shows the chromatograms obtained using photometric (Figure 2.A) and fluorometric (Figure 2.B) detection for a spiked urine sample, which was treated as indicated in Section 2.3.4 and diluted 2000-fold, in the presence of 200 ng mL<sup>-1</sup> of each analyte (final concentration).



**Figure 2.** Chromatograms obtained using photometric (A) and fluorometric (B) detection for a treated and diluted (1:2000) urine sample alone (1) and in the presence of the analytes (2 and 3). Final concentration of each analyte: 30 ng mL<sup>-1</sup> (A.2), 3 ng mL<sup>-1</sup> (B.2) and 200 ng mL<sup>-1</sup> (A.3 and B.3).

Also, the chromatograms obtained for a similarly treated and diluted urine sample alone and in the presence of 30 ng mL<sup>-1</sup> (Figure 2.A) and 3 ng mL<sup>-1</sup> (Figure 2.B) (final concentrations) of each analyte are inserted in these figures. As can be seen, the sample matrix shows a small peak in the chromatogram obtained using photometric detection, which does not affect the determination of the analytes, whereas the chromatogram obtained using fluorometric detection does not show any signal from the sample matrix. The recovery study was performed by adding three different amounts of the analytes to each sample, which was treated and diluted as indicated above to obtain the final concentrations given in Table 3. The use of the standard addition method to carry out the analysis showed that the slopes of the calibration curves were similar to those obtained using standard solutions alone. Table 3 shows the results obtained, in which can be seen that the mean recovery values for GEN, SAU, SAL and ASA were 90.1%, 95.7%, 88.7% and 95.3%, respectively.

#### 4. CONCLUSIONS

The results obtained show that the use of UPLC allows the separation of ASA and its major metabolites GEN, SAU and SAL in less than 2 min, which is shorter than the time required for the separation of similar analyte mixtures using CE [9-11] or HPLC [13-15]. Also, the study carried out has demonstrated the usefulness of fluorometric detection for the determination of ASA metabolites, reaching lower detection limits and better selectivity than those obtained using photometric detection.

The developed method has proven to be a useful analytical tool for the control of veterinary practice as it shows the suitable analytical properties, such as sensitivity, selectivity and precision, for its application to the analysis of bovine urine samples. Only a simple clean-up step and the further dilution of the samples are just required. Additionally, the good results obtained in the recovery study contribute to demonstrate the practical usefulness of the developed method.

Table 3. Recovery study for the analysis of urine samples

| Urine sample | GEN                             |   |                 | SAU   |                 |   | SAL             |   |                 | ASA                             |   |                 |
|--------------|---------------------------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---|-----------------|---------------------------------|---|-----------------|
|              | Added/<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Found <sup>a</sup> /<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Recovery<br>(%) | Found <sup>a</sup> /<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Recovery<br>(%) | Found <sup>a</sup> /<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Recovery<br>(%) | Found <sup>a</sup> /<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Recovery<br>(%) | Added/<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Found <sup>a</sup> /<br>$\mu\text{g mL}^{-1}$ | Recovery<br>(%) |
| 1            | 15                              | 13.0 ± 0.7                                    | 86.7            | 14.9 ± 0.5                                    | 99.3            | 12.1 ± 0.3                                    | 80.7            | 27 ± 1  | 90.0            | 30                              | 27 ± 1  | 90.0            |
|              | 20                              | 19.9 ± 0.7                                    | 99.5            | 19.4 ± 0.7                                    | 97.0            | 18.8 ± 0.3                                    | 94.0            | 39 ± 1  | 97.5            | 40                              | 39 ± 1  | 97.5            |
|              | 25                              | 20.2 ± 0.4                                    | 80.8            | 22.6 ± 0.7                                    | 90.4            | 20.1 ± 0.3                                    | 80.4            | 44 ± 1  | 88.0            | 50                              | 44 ± 1  | 88.0            |
| 2            | 15                              | 13 ± 1  | 86.6            | 14.9 ± 0.6                                    | 99.3            | 14 ± 2  | 93.3            | 29 ± 1  | 96.7            | 30                              | 29 ± 1  | 96.7            |
|              | 20                              | 16.0 ± 0.3                                    | 80.0            | 19 ± 1  | 95.0            | 18 ± 2  | 90.0            | 37 ± 1  | 92.5            | 40                              | 37 ± 1  | 92.5            |
|              | 25                              | 20.3 ± 0.6                                    | 81.2            | 22.2 ± 0.5                                    | 88.8            | 21.5 ± 0.4                                    | 86.0            | 48 ± 2  | 96.0            | 50                              | 48 ± 2  | 96.0            |
| 3            | 15                              | 14.7 ± 0.3                                    | 98.0            | 14.5 ± 0.4                                    | 96.7            | 14.3 ± 0.3                                    | 95.3            | 27.1 ± 0.9                                    | 90.3            | 30                              | 27.1 ± 0.9                                    | 90.3            |
|              | 20                              | 19.6 ± 0.6                                    | 98.0            | 19.6 ± 0.3                                    | 98.0            | 19.6 ± 0.2                                    | 98.0            | 39.0 ± 0.7                                    | 97.5            | 40                              | 39.0 ± 0.7                                    | 97.5            |
|              | 25                              | 21 ± 1  | 84.0            | 22.9 ± 0.8                                    | 91.6            | 22.5 ± 0.4                                    | 90.0            | 48.9 ± 0.5                                    | 97.8            | 50                              | 48.9 ± 0.5                                    | 97.8            |
| 4            | 15                              | 14.3 ± 0.3                                    | 95.3            | 14.8 ± 0.4                                    | 98.7            | 12.5 ± 0.4                                    | 83.3            | 30 ± 1  | 100             | 30                              | 30 ± 1  | 100             |
|              | 20                              | 19 ± 1  | 95.0            | 19.5 ± 0.9                                    | 97.5            | 17.0 ± 0.4                                    | 85.0            | 39.2 ± 0.7                                    | 98.0            | 40                              | 39.2 ± 0.7                                    | 98.0            |
|              | 25                              | 24 ± 1  | 96.0            | 24.0 ± 0.6                                    | 96.0            | 22.1 ± 0.2                                    | 88.4            | 49.6 ± 0.7                                    | 99.2            | 50                              | 49.6 ± 0.7                                    | 99.2            |

<sup>a</sup>Mean ± SD (n=3)



### **ACKNOWLEDGEMENTS**

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, MINECO (Grant No. CTQ2012-32941), the Junta de Andalucía (Grant No.P09- FQM4933) and the FEDER Program.

## REFERENCES

- [1] P. Lees, M.F. Landoni, J. Giraudel, P.L. Toutain, Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest, *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 27 (2004) 479 – 490.
- [2] R. Mullangi, K. Sharma, N. Srinivas, Review of HPLC methods and HPLC methods with mass spectrometric detection for direct determination of aspirin with its metabolite(s) in various biological matrices, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 906 – 941.
- [3] A.L. Weiner, C. Ko, C.A. McKay Jr., A comparison of two bedside tests for the detection of salicylates in urine, *Acad. Emerg. Med.* 7 (2000) 834 – 836.
- [4] *Comission Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.* *Off. J. Eur. Union*, L15 (2010) 1 – 72.
- [5] J.F. Coetzee, A review of analgesic compounds used in food animals in the United States, *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 29 (2013) 11 – 28.
- [6] C.R. Short, L.C. Hsieh, M.S. Marlborough, S.A. Barker, C.A. Neff-Davis, L.E. Davis, G. Koritz, R.F. Beville, Elimination of salicylic acid in goats and cattle, *Am. J. Vet. Res.* 51 (1990) 1267 – 1270.
- [7] B. Muralidharan, G. Gopu, C. Vedhi, P. Manisankar, Determination of analgesics in pharmaceutical formulations and urine samples using nano polypyrrole modified glassy carbon electrode, *J. Appl. Electrochem.* 39 (2009) 1177 – 1184.
- [8] L. Campanella, E. Gregori, M. Tomassetti, Salicylic acid determination in cow urine and drugs using a bienzymatic sensor, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42 (2006) 94 – 99.

- [9] J. Caslavská, W. Thormann, Monitoring of drugs and metabolites in body fluids by capillary electrophoresis with XeHg lamp-based and laser-induced fluorescence detection, *Electrophoresis* 25 (2004) 1623 – 1631.
- [10] S.H. Hansens, M.E. Jensen, I. Bjomsdottir, Assay of acetylsalicylic acid and three of its metabolites in human plasma and urine using non-aqueous capillary electrophoresis with reversed electroosmotic flow, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1155 – 1160.
- [11] S. Zaugg, X. Zhang, J. Sweedler, W. Thormann, Determination of salicylate, gentisic acid and salicylic acid in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 752 (2001) 17 – 31.
- [12] Y. Ohwaki, T. Yamane, T. Ishimatsu, M. Wada, K. Nakashima, Semi-micro column high-performance liquid chromatography with UV detection for quantification of aspirin and salicylic acid and its application to patients' sera administered with low-dose enteric-coated aspirin, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 221 – 224.
- [13] J.N. Buskin, R. A. Bupton, R.L. Williams, Improved liquid-chromatography of aspirin, salicylate and salicylic acid in plasma, with a modification for determining aspirin metabolites in urine, *Clin. Chem.* 28 (1982) 1200 – 1203.
- [14] J.H. Liu, P.C. Smith, Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicylic acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 675 (1996) 61 – 70.
- [15] M. Zheng, Y. Wu, L. Lu, K. Ding, F. Tang, Z. Lin, X. Wu, Simultaneous analysis of acetaminophen, p-aminophenol and aspirin metabolites by hydrophilic interaction and strong anion exchange capillary liquid chromatography coupled to amperometric detection, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2072 – 2078.

- [16] X. Xu, L. Koetzner, J. Boulet, H. Maselli, J. Beyenhof, G. Grover, Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 973 – 979.
- [17] S.K. Bae, K.A. Seo, E.J. Jung, H.S. Kim, C.W. Yeo, J.H. Shon, K.M. Park, K.H. Liu, J.G. Shin, Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix® in Korean healthy volunteers, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 590 – 595.
- [18] E.L. Hobl, B. Jilma, J. Ebner, R.W. Schmid, Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by isocratic high-pressure liquid chromatography with post-column hydrolysis and fluorescence detection, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 695 – 698.
- [19] H. Ibrahim, A. Boyer, J. Bouajila, F. Couderc, F. Nepve, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 59 – 66.
- [20] C. Gosh, A. Upadhyay, A. Singh, S. Bahadur, P. Jain, B.S. Chakraborty, Simultaneous determination of aspirin and its metabolite from human plasma by UPLC-UV detection: Application to pharmacokinetic study, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 34 (2011) 2326 – 2338.
- [21] P. Rubak, T.F. Hardlei, M. Würtz, S.D. Kristensen, A.M. Hvas, Low-dose acetylsalicylic acid therapy monitored with ultra high performance liquid chromatography, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 988 – 992.
- [22] S. Magiera, S. Gülmez, A. Michalik, I. Baranowska, Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed

- sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 1 – 9.
- [23] T. Peng, A.L. Zhu, Y.N. Zhou, T. Hu, Z.F. Yue, D.D. Chen, G.M. Wang, J. Kang, C.L. Fan, Y. Chen, H.Y. Jiang, Development of a simple method for simultaneous determination of nine subclasses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 933 (2013) 15 – 23.
- [24] J. Zhan, Y.Y. Zhong, X.J. Yu, J.F. Peng, S. Chen, J.Y. Yin, J.J. Zhang, Y. Zhu, Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 827 – 834.
- [25] G. Long, J.D. Winefordner, Limit of detection A closer look at the IUPAC definition, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A – 724A.



## **Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast liquid chromatography and luminescence detection**

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

*Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry,  
Faculty of Sciences, University of Córdoba, Annex to Marie Curie (C-3) building, Campus of Rabanales,  
14071 Córdoba, Spain*

A chromatographic method based on the use of a fused-core column and luminescence detection is described for the determination of six penicillin antibiotics used in veterinary practice, namely amoxicillin, ampicillin, penicillin G, oxacillin, cloxacillin and nafcillin. The use of this column provides the fast separation of these antibiotics with retention times lower than 4.5 min. The tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) [Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>] - Ce(IV) system has been used as post-column derivatization reagent, obtaining a luminescence signal ( $I_{em}$  610 nm) proportional to the analyte concentration when the system is excited at 450 nm.

The dynamic ranges of the calibration graphs are 100 - 10000 ng mL<sup>-1</sup> for all the antibiotics assayed and the limits of detection are in the range of 44 - 51 ng mL<sup>-1</sup>. The precision, established at two concentration levels of each analyte and expressed as the percentage of the relative standard deviation is in the range of 6.9 - 9.8 %. The method has been satisfactorily applied to the analysis of water and pharmaceutical samples, with recoveries ranging from 88.6 to 108.5%.

**KEYWORDS:** *penicillin antibiotics, ruthenium(II)-tris(2,2'-bipyridyl), cerium(IV) sulphate, fast liquid chromatography, luminescence detection*



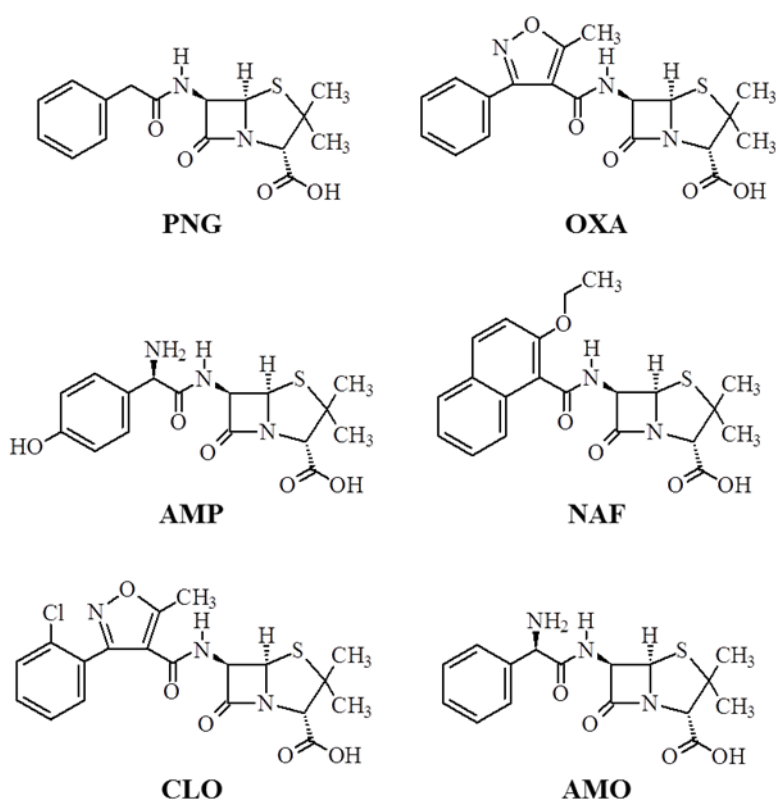
## **I. INTRODUCTION**

Penicillin antibiotics are among the first antibacterial drugs that were discovered and are widely used for human and animal therapeutics [1, 2]. There are different classes depending on their mode of action, so they can be used as narrow spectrum antibiotics [some naturally occurring penicillin antibiotics, such as penicillin G (PNG)] or broad spectrum, such as amoxicillin (AMO) and ampicillin (AMP). Some members of this family, such as oxacillin (OXA), cloxacillin (CLO), nafcillin (NAF), are semisynthetic drugs, which functional groups have been modified to be resistant to  $\beta$ -lactamase enzymes. Some pharmaceutical formulations for veterinary use are available to be orally administered when dissolved in the drinking water for animals, so their analytical monitoring through their treatment and their potential ecotoxicology can be of interest [3].

A relatively high number of bioanalytical methods, such as microbial inhibition tests and immunoassays [4, 5], have been described for the individual determination of penicillins, although liquid chromatography (LC) is usually the preferred technique for the resolution of mixtures of these antibiotics [3, 6 - 12]. Some of these chromatographic methods, which involve the use of an ultra-performance LC (UPLC) system [6, 8], only require 3 - 5 min for the separation of penicillin mixtures, but other methods based on the use of conventional LC require about 10 min [10], 15 min [11] or up to more than 30 min [12] for similar penicillin mixture separations. The method presented here has tried to shorten the retention times obtained for a mixture of penicillins using a fused-core column [13], which contains 2.7- $\mu$ m core-shell particles formed by a non-porous silica core and a thin porous shell composed of functionalized silica nanoparticles. This column allows fast separations using a conventional chromatograph, avoiding the high pressures required in UPLC. The penicillins AMO, AMP, PNG, OXA, CLO and NAF (Figure 1), which are allowed for their use in veterinary practice, have been chosen as model analytes to study the usefulness of this column.



As the chemical structure of penicillins do not contain strong chromophore or luminophore moieties, LC methods usually involve the use of MS [3, 6 - 9] or UV [9 - 12] detection. Absorbance measurements are usually obtained at wavelengths lower than 250 nm, which can be potentially interfered by background signals. Luminescence detection is an alternative option to the use of more expensive MS detection or low selective UV detection, but it has been scarcely described for the determination of penicillins using LC [9].



*Figure 1. Chemical structure of the penicillin antibiotics assayed*

Several chemical compounds characterized by their luminescence emission at long wavelengths were assayed as potential post-column derivatizing reagents with the aim of developing a new luminescence method for the quantification of

penicillins. As known, measurements at long wavelengths allow the selectivity improvement of analytical determinations, because the potential interfering species usually emit at lower wavelengths [14]. After several assays, the tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II) [Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>] chelate in the presence of Ce(IV) was chosen for this purpose.

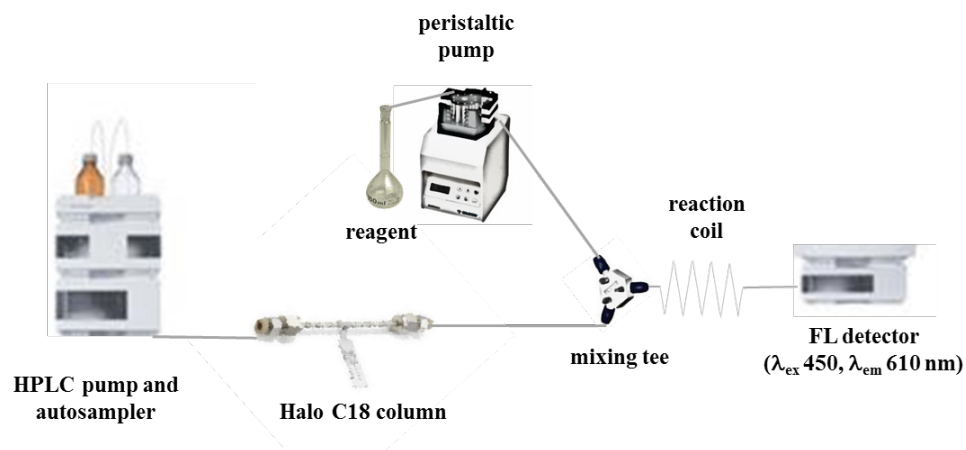
The Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate has been widely described in LC for the determination of a relatively high number of organic compounds using chemiluminescence (CL) detection [15, 16]. The CL signal is generated when the chelate is chemically, photochemically or electrochemically oxidized to Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, which is then reduced by the analyte to Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in the excited state, emitting orange light at 610 nm when the excited chelate returns to the ground state [17]. Usually, the methods described using the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate as derivatizing reagent in LC involve the use of an oxidant reagent such as Ce(IV) for the chemical oxidation of the chelate [15]. However, the assays carried out to study the potential applicability of the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> - Ce(IV) system to the detection of penicillins showed that the CL signal was negligible, but it was possible to obtain a luminescence signal by exciting the system at 450 nm, which corresponds to the maximum excitation wavelength of the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate. Thus, this manuscript describes a new method involving the fast chromatographic separation of the six penicillin mixture above indicated using a fused-core column in a conventional chromatograph, which is attained in less than 4.5 min, and the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> - Ce(IV) system for their luminescent quantification.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Instrumentation**

An Agilent 1200 series liquid chromatography system composed by a quaternary pump, a degasser unit, a vial autosampler, a thermostated column compartment, and a fluorescence detector was used. The chromatographic

separation was performed with a Halo C18 analytical column (100 mm x 3.0 mm I.D., particle size 2.7  $\mu\text{m}$ ; Thermoscientific, Inc., Waltham, MA). A Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-3 peristaltic pump was used to perform post-column derivatization. The manifold used is depicted in Figure 2.



**Figure 2.** Manifold used to perform the post-column derivatization reaction

## 2.2 Reagents and solutions

All reagents were of analytical grade. AMO, AMP, PNG potassium salt, OXA sodium salt monohydrate, CLO sodium salt monohydrate and NAF sodium salt were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Stock solutions of these compounds (1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were prepared in Milli-Q water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  for two weeks. Working solutions were daily prepared by diluting the stock solutions in doubly deionized water. Acetonitrile (ACN) CHROMASOLV® gradient grade, for HPLC, was purchased from Teknokroma (Sant Cugat del Vallès, Spain). The ammonium acetate solution used as aqueous mobile phase was prepared by dissolving the appropriate amount of this salt (Merck, Schuchardt, Germany) in Milli-Q water and was filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter (Millipore, Bedford, USA). The derivatizing reagent was daily prepared by dissolving the appropriate amount of cerium(IV) sulfate tetrahydrate (Merck, Darmstadt, Germany)

in 0.05 M sulfuric acid to achieve a 0.65 mM concentration and then adding the necessary amount of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> hexahydrate (Sigma, St. Louis, MO, USA) to be finally 35 μM. This derivatizing solution was prepared 24 h before use and kept at 30 °C in order to provide repeatable determinations of penicillin antibiotics.

### 2.3. Procedures

#### 2.3.1. Fast LC determination of penicillin antibiotics with luminescence detection

A volume (100 μL) of a standard or sample extract, containing the analytes at concentrations within their corresponding dynamic ranges, was injected onto the chromatographic system. The analytical separation was performed by reversed phase chromatography under gradient elution, combining an organic phase A (ACN) and an aqueous phase B (ammonium acetate solution), as follows: 0 min 17% A; 1.0 min 17% A; 1.2 min 17% A; 1.8 min 35% A; and 2.5 min 17% A, at a flow-rate of 0.6 mL min<sup>-1</sup>. The temperature was kept at 30°C in the column oven. The derivatizing reagent was pumped at a flow-rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup> by using a peristaltic pump and it merged by using a mixing tee with eluate from the column, and the mixture flows to the fluorescence detector (Figure 2). Teflon tubes were used to connect the derivatizing reagent and the column eluate with the mixing tee and the mixture of both flows to the detector. Chromatograms were recorded at λ<sub>ex</sub> 450 nm and λ<sub>em</sub> 610 nm using a response time of 2 s and a PMT-gain of 16. The blank signal was subtracted from each chromatogram. Each standard or sample extract was assayed in triplicate. Data were processed using Agilent ChemStation software.

#### 2.3.2. Assessment of precision

The precision of the method was evaluated at two different concentration levels of each analyte, which were 300 and 4000 ng mL<sup>-1</sup> and it was performed in the presence of water samples. The intra-day precision was evaluated by assaying ten solutions during the same day, whereas the inter-day precision was determined by analyzing three solutions for five different days. Each solution was injected in triplicate

in both instances and the percentage of relative standard deviation (%RSD) was calculated for retention times and areas in each case.

#### 2.3.3. Estimation of limits of detection

The estimation of the limits of detection (LODs) was performed following IUPAC recommendations [18], which involve the use of a signal-to noise ratio of 3. The signal considered as the blank signal was the y-intercept of the calibration curve made using 12 mixtures of aqueous standards of the compounds determined.

#### 2.3.4. Analysis of samples

*Pharmaceutical sample:* an appropriate amount (0.5 g) of the Hipromax® pharmaceutical sample was accurately weighed and dissolved in water up to a final volume of 1 L, according to the instructions given by the supplier to match the therapeutic concentration. The sample was further diluted 100 times and injected onto the chromatographic system.

*Drinking water samples:* Three tap and one well water samples were analysed by filtering them using 0.2 µm regenerated cellulose membranes and injecting them directly into the chromatographic system.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1. Choice of the derivatization reaction conditions

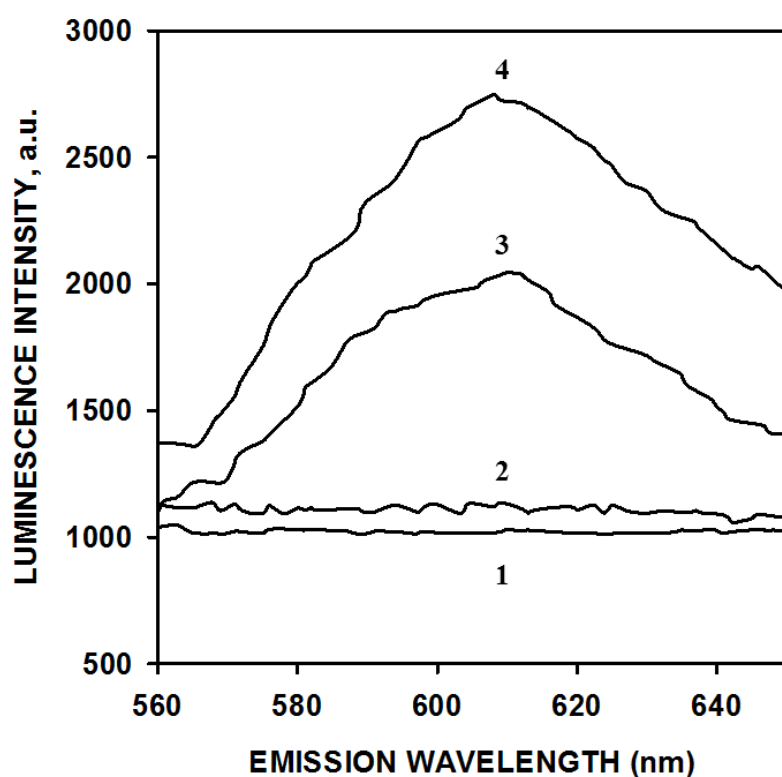
The potential interaction of penicillins with several long wavelength fluorophores (LWFs), such as toluidine blue, Nile blue, indocyanine green and Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate, has been explored in order to achieve the luminescent determination of penicillins after their separation using fast LC. These compounds were chosen because it has been previously reported that their emission at long wavelengths allows the selectivity improvement of analytical determinations [14], but no direct interaction was observed between the assayed LWFs and penicillin antibiotics. Also, the modification of the fluorophore by using Ce(IV) as oxidant was

explored because it has been previously described the interaction of indocyanine green with Ce(IV) for the luminescent determination of the aminoglycoside antibiotic amikacin in serum [19]. The best results were obtained using the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate - Ce(IV) system, being necessary to use an excitation wavelength at 450 nm, which corresponds to the maximum absorption wavelength of the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate, to obtain suitable luminescent signals at 610 nm. As indicated above, the typical CL signal obtained with the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> - Ce(IV) system is ascribed to the oxidation of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> by Ce(IV) to Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>, which is reduced by the analyte to Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in the excited state and emits luminescence when returns to the ground state, being the intensity proportional to the analyte concentration. However, although this system has been widely described for the CL determination of several organic compounds [15, 16], the CL signals obtained in the presence of penicillins were negligible, which could be ascribed to the fast transition of the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> in the excited state to the ground state.

Previous studies have shown that the luminescence signals obtained using the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-Ce(IV) system depend on the acid medium [20, 21]. Thus, the influence of nitric and sulphuric acids on this system in the absence and the presence of AMO was studied, using an excess of Ce(IV) to ensure that all ruthenium chelate was as Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup>. Figure 3 shows the emission spectra obtained by exciting at 450 nm, in which can be seen that no luminescence signal was obtained in the absence of AMO, which confirms that all the ruthenium chelate is oxidized, but the typical emission of the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate at 610 nm was obtained in the presence of AMO, being the intensity in the presence of sulphuric acid higher than in the presence of nitric acid. These results show the interaction of the penicillin with the ruthenium system.

A possible mechanism of the luminescence signal obtained involves the oxidation of the penicillin by Ce(IV), as it has been previously described [22], and the interaction of the oxidation product with the Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>3+</sup> chelate, giving rise to the

luminescent  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  chelate. Similar mechanisms have been suggested when the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  -  $\text{Ce}(\text{IV})$  system has been applied to the determination of folates [23], carbamazepine [24] and quinolones [20]. Although the information about the potential structure of the oxidation product of penicillin is limited, the potential formation of aminoxyl radicals by reaction of penicillins with hydrogen peroxide has been suggested [25].



**Figure 3.** Luminescence spectra obtained using the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  -  $\text{Ce}(\text{IV})$  system in the presence of  $0.25 \text{ M HNO}_3$  (1, 3) and in the presence of  $0.125 \text{ M H}_2\text{SO}_4$  (2, 4), using an AMO standard solution ( $5000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (3, 4). Blank signals (1, 2). Conditions:  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}] = 20 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Ce}(\text{IV})] = 0.33 \text{ mmol L}^{-1}$ , emission slits =  $16 \text{ nm}$

The use of the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Ce(IV) reaction as post-column derivatization system for penicillins determination required to perform several assays to obtain suitable chromatographic peaks. The usual manifold described for this system involves the use of separate streams of  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  complex and Ce(IV) that merge to give rise to the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  reagent, which interacts with the analytes to originate CL emission [15, 16]. However, this approach did not give rise to adequate luminescence signals with the penicillins eluted from the column and the use of long reaction coils to increase the reaction time resulted in a larger dispersion of the peaks. Better luminescence signals were obtained by the integration of both  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  and Ce(IV) in a single stream but it was observed that these signals depended on the time elapsed since both reagents were mixed. Thus, several strategies were assayed to stabilize the derivatizing reagent, such as irradiation with UV light, heating, and storage of the ready-made solution at constant temperature prior to use. The use of UV irradiation, assayed at different exposure times up to 2 h, did not allow the reagent stabilization, but it was achieved by heating the reagent mixture in the temperature range of 30 - 50 °C. Thus, the preparation of the reagent 24 h before use and its conservation at 30 °C provided a stable reagent, which had a pale yellow-green color, to be used for one day.

### ***3.2. Optimization of the separation and post-column derivatization variables***

The hydrodynamic and chemical variables involved in the LC system were optimized applying the univariate methodology. Values chosen were those yielding the best resolution and maximum luminescence signals with a minimum standard deviation. Table I summarizes the studied variables and their ranges, as well as the values chosen as optimum.



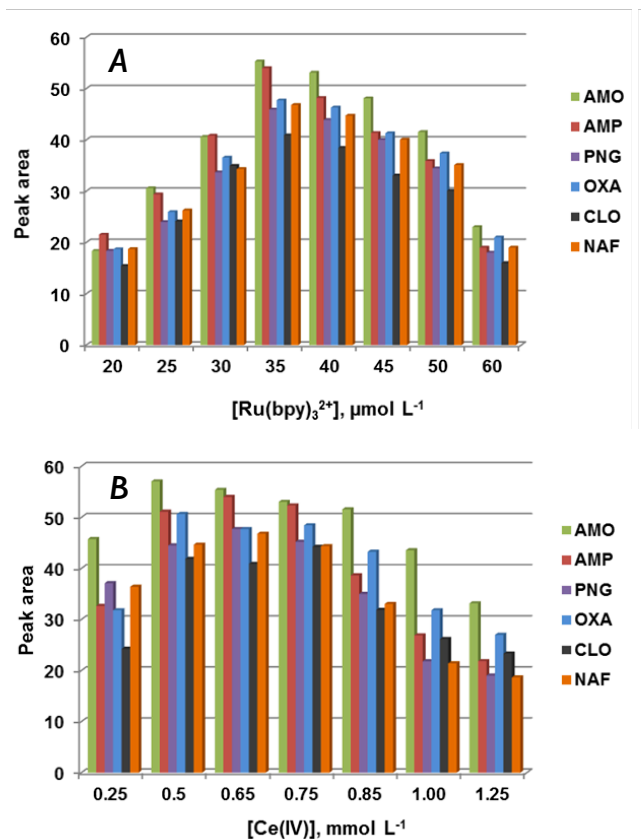
Table I. Summary of variable optimisation study

|  | Variable                             | Assayed range         | Optimum value    |
|--|--------------------------------------|-----------------------|------------------|
| Chromatographic separation                     | $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}]$ | 25 – 100 mM           | 50 mM            |
|  | pH                                   | 6.0 – 7.5             | 6.7              |
|  | Oven temperature                     | 20 – 40°C             | 30°C             |
|  | ACN inical composition               | 10 – 40%              | 17%              |
| $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Ce(IV) reagent | $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$     | 20 – 80 $\mu\text{M}$ | 35 $\mu\text{M}$ |
|  | $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$         | 0.25 – 1.25 mM        | 0.65 mM          |
|  | $[\text{H}_2\text{SO}_4]$            | 25 – 150 mM           | 50 mM            |
|  | Flow-rate                            | 0.4 – 1.4 mL/min      | 1.2 mL/min       |
|  | Reaction coil lenght                 | 12 – 100 cm           | 25 cm            |

The separation of the penicillins was carried out using a fused-core column with 2.7- $\mu\text{m}$  particles, so that it can be seen as a fast LC method, as it has been reported for methods involving this type of columns [26]. These columns can provide similar separations to those provided by sub-2- $\mu\text{m}$ -particle size columns, but with less problems of back-pressure. The chromatographic separation has been achieved using ammonium acetate as aqueous mobile phase, since it provides better separations than the use of acidic aqueous mobile phases. This mobile phase has also been used previously to separate mixtures of penicillins [9] and penicillins with cephalosporins [12]. The study of the influence of ammonium acetate concentration showed that it did not affect critically the chromatographic separation in the assayed range, but the luminescence signal decreased when its concentration was higher than 75 mmol L<sup>-1</sup>. The pH of the aqueous mobile phase was assessed at mild acidic and neutral pH values, finding that the resolution between AMO and AMP improved at pH values close to 7.5, but the retention times were longer. A pH value of 6.7

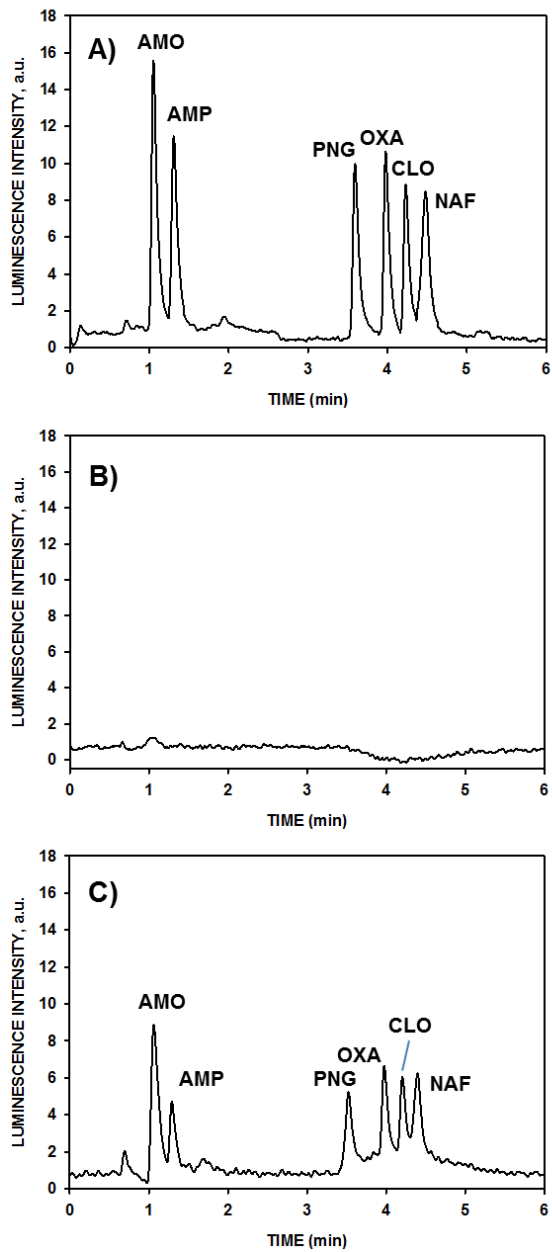
provided an adequate separation of both penicillin antibiotics with relatively short retention times. The temperature of the column was not a critical variable for the separation of the analytes but it was set at 30°C because more reproducible results were obtained. The study of the gradient conditions showed that the use of ACN% higher than 20% prevented the separation of AMO and AMP, so 17% ACN was chosen for the initial step of the gradient program. The use of flow-rates below 0.4 mL min<sup>-1</sup> showed separations with long retention times but with similar resolution values for penicillin peaks. This variable could not be assayed at values higher than 0.65 mL min<sup>-1</sup> because very high pressures were obtained.

The study of the influence of Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> chelate concentration on the net luminescence signals obtained for the different analytes showed that these signals increased up to a chelate concentration of 35 μmol L<sup>-1</sup> for most penicillins (Figure 4.A), decreasing at higher concentrations. Figure 4.B shows the influence of Ce(IV) concentration, in which can be seen that an excess of this reagent has a negative effect on the luminescence signals. Sulphuric acid concentration did not affect significantly the intensity of the luminescence signal, but a 50 mmol L<sup>-1</sup> concentration was needed to ensure the stability of the reagents, since the precipitation of Ce(IV) was observed after 24 h at lower sulphuric acid concentrations. The study of the flow rate of the derivatizing reagent showed that an increase up to 1.1 mL min<sup>-1</sup> led to an increase of the luminescent signal and it was almost constant up to 1.4 mL min<sup>-1</sup>, but it was kept to 1.2 mL min<sup>-1</sup> to decrease reagent consumption. The use of a 25-cm reaction coil was selected since longer tubes provided greater dispersion, and hence, poorer separations, whereas shorter tubes provided less stable baselines.



**Figure 4.** Influence of  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$  (A) and  $\text{Ce}(\text{IV})$  (B) concentrations on the peak area for penicillin antibiotics. Conditions: flow-rate:  $0.65 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $[\text{H}_2\text{SO}_4] = 0.05 \text{ mol L}^{-1}$  [penicillins] =  $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ; in A),  $[\text{Ce}(\text{IV})] = 0.75 \text{ mmol L}^{-1}$ ; in B)  $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}] = 35 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$

Figure 5.A shows a typical chromatogram obtained under the optimum experimental conditions, where it can be seen that the retention times for the analytes were shorter than 4.5 min, which means this is a faster separation than those achieved using conventional LC columns for a similar number of analytes [10-12]. Although CLO and AMP were not separated to baseline, the resolution between both peaks had a value of about 1.3, which is slightly lower than the value accepted for peaks separated to the baseline (1.5) [27].



**Figure 5.** Chromatograms obtained for a mixture of pure standards of the analytes at  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  (A), for a water sample (B) and for the same water sample spiked at  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  of each penicillin (C)

### 3.3 Analytical features

Calibration curves were obtained using the optimum experimental conditions and an external calibration method, in order to establish the method features. Table 2 shows the retention time for each compound, the calibration parameters and the LODs obtained, which were calculated according IUPAC recommendations [18]. These LODs, which ranged from 44 to 51 ng mL<sup>-1</sup>, are comparable to those obtained by a flow-injection method with CL detection [28] and lower than those reported for some penicillin antibiotics, such as AMO and CLO with a LC-UV method using a fused-core column [11]. The regression coefficients obtained in all instances indicate a good fit of experimental data to the calibration curve.

The precision of the method was evaluated by using standard solutions at two different analyte concentration levels, which were 300 and 4000 ng mL<sup>-1</sup> in the presence of water samples. Intra-day and inter-day precision data, expressed as percentage of relative standard deviation (%RSD), were calculated for both retention time and peak area. Very low precision values were obtained for the retention times, 0.08 - 0.38% for intra-day and 0.18 - 0.63% for inter-day precision data, which could be partly ascribed to a reproducible flow-rate of the derivatization reagent. Intra-day and inter-day precision values obtained for the peak areas were equal to or lower than 6.9% and 9.8%, respectively. These relatively high precision values for peak areas could be ascribed to variable dispersion phenomena within the 25-cm reaction coil.

A selectivity study was performed in order to investigate the potential interference of other drugs of veterinary use on the determination of the penicillins assayed. A compound was considered not to interfere when the signal obtained in the presence of the interfering compound was within one standard deviation of that of the analytes in its absence. The maximum potential interferent/analyte concentration ratio assayed was 50. Different antibiotics belonging to the penicillin group, such as dicloxacillin, phenoxymethylpenicillin and penicillin V and to other

Table 2. Calibration parameters and LODs for penicillin antibiotics

| Compound | Retention time (min) | Linear range ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Slope $\pm$ SD | y-intercept $\pm$ SD | Regression coefficient (r) | LOD ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |
|----------|----------------------|--|----------------|----------------------|----------------------------|-----------------------------|
| AMO      | 1.05                 | 0.1 - 10                               | 53.0 $\pm$ 0.2 | 2.3 $\pm$ 0.8        | 0.9997                     | 45                          |
| AMP      | 1.28                 | 0.1 - 10                               | 47.0 $\pm$ 0.2 | 7.0 $\pm$ 0.7        | 0.9997                     | 45                          |
| PNG      | 3.59                 | 0.1 - 10                               | 38.2 $\pm$ 0.3 | 7.3 $\pm$ 0.6        | 0.9988                     | 47                          |
| OXA      | 3.95                 | 0.1 - 10                               | 42.2 $\pm$ 0.3 | 5.6 $\pm$ 0.7        | 0.9995                     | 50                          |
| CLO      | 4.19                 | 0.1 - 10                               | 35.3 $\pm$ 0.2 | 5.6 $\pm$ 0.6        | 0.9994                     | 51                          |
| NAF      | 4.37                 | 0.1 - 10                               | 41.1 $\pm$ 0.2 | 5.7 $\pm$ 0.6        | 0.9996                     | 44                          |

antibiotic groups such as cephalosporins (cefuroxime), aminoglycosides (gentamicin and streptomycin), macrolides (erythromycin), quinolones (norfloxacin and enrofloxacin), tetracyclines (tetracycline), ionophores (tylosin), and sulfonamides (sulphamerazine) were assayed. Most of the antibiotics assayed were tolerated at higher concentrations than those of analytes. Only penicillin V showed a tolerated ratio of 1, interfering at higher ratios in the determination of OXA, but it has been reported to be used at a similar concentration level [1], so it would not interfere under normal veterinary practice.

### 3.4. Applications

The new method for the determination of penicillins was applied to the analysis of one veterinary pharmaceutical preparation (Hipramox®), which is a fine powder that contains AMO and it was bought in a local store. Several water samples, which were taken at different locations of Cordoba city (W1, W2, W3) and at a well (S1) from a local farm, were also analyzed. The content found in the pharmaceutical sample, which was prepared according to the information provided by the supplier in drinking water, is displayed in Table 3, where it can be also seen the content declared by the manufacturer. The application of the t-test (95% confidence level, n=3) revealed that there are not significant differences between the results provided by the method and the nominal content.

**Table 3.** Determination of penicillin content in the pharmaceutical preparation analysed

| Content | Found <sup>a,b</sup> | Declared <sup>a</sup> | Recovery study |                      |      |
|---------|----------------------|-----------------------|----------------|----------------------|------|
|         |                      |                       | Added          | Found <sup>a,b</sup> | R(%) |
| AMO     | 212 ± 10             | 200                   | 100            | 95.6 ± 0.7           | 95.6 |
|         |                      |                       | 200            | 197 ± 4              | 98.5 |

<sup>a</sup>Units: mg AMO/g sample

<sup>b</sup>Mean ± SD (n=3)

Composition: amoxicillin trihydrate, 200 mg, water-soluble excipient, up to 1g.

A recovery study was performed by adding two different amounts of AMO to the pharmaceutical sample and subtracting the results obtained from a similarly prepared unspiked sample. The recoveries obtained were 95.6 and 98.5%. The analysis of water samples could not detect the presence of these antibiotics (Figure 5.B). A recovery study was carried out by spiking water samples with three different amounts of penicillin antibiotics and analyzing them using the new method (Table 4). Figure 5.C shows the chromatogram obtained for one of the spiked water samples, in which can be seen that the separation of the analytes is not affected by the sample matrix when they were directly introduced without any sample clean up, just a filtration step. The recovery values were ranged between 88.6 and 108.5%.

#### **4. CONCLUSIONS**

The method described here shows two significant innovations for the chromatographic determination of penicillin mixtures: 1) the use of a fused-core column that incorporates nano-structuring technology, with an overall 2.7- $\mu\text{m}$  particle diameter, which allows the separation of the analytes in less than 4.5 min using a conventional chromatograph, as an alternative to UPLC, and 2) the luminescent detection of the analytes at a relatively long wavelength, which may provide a better selectivity than UV detection, using the  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -Ce(IV) system. The relatively short separation times also contribute to a low consumption of the derivatization reagent.

The method has been applied to the direct analysis of drinking water samples at concentrations much below than the therapeutic concentrations administered to animals, so the monitoring of the antibiotic administration can be performed in real time. This method can be also applied for the control of the therapeutic concentrations achieved in the preparation of commercial veterinary pharmaceutical samples to be later administered orally to animals.



**Table 4.** Recovery study for drinking water samples using the proposed method

| Sample | AMO                |                    | AMP   |                    | PNG   |                    | OXA   |                    | CLO   |                    | NAF   |                    |       |
|--------|--------------------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
|        | Added <sup>a</sup> | Found <sup>b</sup> | R(%)  | Found <sup>b</sup> | R(%)  | Found <sup>b</sup> | R(%)  | Found <sup>b</sup> | R(%)  | Found <sup>b</sup> | R(%)  | Found <sup>b</sup> | R(%)  |
| W1     | 2.0                | 1.96 ± 0.15        | 98.0  | 2.0 ± 0.1          | 100.0 | 1.98 ± 0.09        | 99.0  | 1.80 ± 0.21        | 90.0  | 1.8 ± 0.1          | 90.0  | 2.13 ± 0.32        | 106.5 |
|        | 3.5                | 3.54 ± 0.18        | 101.1 | 3.28 ± 0.03        | 93.7  | 0.31 ± 0.01        | 88.6  | 3.48 ± 0.15        | 99.4  | 3.17 ± 0.34        | 90.6  | 3.17 ± 0.17        | 90.6  |
|        | 5.0                | 5.01 ± 0.05        | 100.2 | 4.59 ± 0.06        | 91.8  | 4.75 ± 0.28        | 95.0  | 5.07 ± 0.13        | 101.4 | 5.02 ± 0.23        | 100.4 | 4.54 ± 0.22        | 90.8  |
| W2     | 0.2                | 0.217 ± 0.007      | 108.5 | 0.18 ± 0.01        | 90.0  | 0.206 ± 0.012      | 103.0 | 0.206 ± 0.008      | 103.0 | 0.18 ± 0.01        | 90.0  | 0.217 ± 0.006      | 108.5 |
|        | 0.35               | 0.361 ± 0.007      | 103.1 | 0.32 ± 0.02        | 91.4  | 0.358 ± 0.021      | 102.3 | 0.349 ± 0.004      | 99.7  | 0.312 ± 0.021      | 89.1  | 0.361 ± 0.015      | 103.1 |
|        | 0.5                | 0.478 ± 0.023      | 95.6  | 0.514 ± 0.016      | 102.8 | 0.519 ± 0.009      | 103.8 | 0.522 ± 0.021      | 104.4 | 0.471 ± 0.046      | 94.2  | 0.508 ± 0.015      | 101.6 |
| W3     | 0.2                | 0.204 ± 0.007      | 102.0 | 0.192 ± 0.017      | 96.0  | 0.191 ± 0.015      | 95.5  | 0.197 ± 0.008      | 98.5  | 0.18 ± 0.01        | 90.0  | 0.194 ± 0.015      | 97.0  |
|        | 0.35               | 0.348 ± 0.019      | 99.4  | 0.349 ± 0.014      | 99.7  | 0.347 ± 0.011      | 99.1  | 0.373 ± 0.012      | 106.6 | 0.34 ± 0.01        | 97.1  | 0.359 ± 0.005      | 102.6 |
|        | 0.5                | 0.511 ± 0.029      | 102.2 | 0.496 ± 0.031      | 99.2  | 0.480 ± 0.012      | 96.0  | 0.451 ± 0.025      | 90.2  | 0.48 ± 0.01        | 96.0  | 0.469 ± 0.022      | 93.8  |
| S1     | 0.2                | 0.211 ± 0.018      | 105.5 | 0.217 ± 0.022      | 108.5 | 0.195 ± 0.008      | 97.5  | 0.211 ± 0.011      | 105.5 | 0.204 ± 0.017      | 102.0 | 0.213 ± 0.003      | 106.5 |
|        | 0.35               | 0.342 ± 0.014      | 97.7  | 0.358 ± 0.023      | 102.3 | 0.362 ± 0.026      | 103.4 | 0.35 ± 0.01        | 100.0 | 0.326 ± 0.044      | 93.1  | 0.31 ± 0.01        | 88.6  |
|        | 0.5                | 0.52 ± 0.05        | 103.6 | 0.516 ± 0.019      | 103.2 | 0.50 ± 0.01        | 100.0 | 0.483 ± 0.013      | 96.6  | 0.464 ± 0.017      | 92.8  | 0.465 ± 0.022      | 93.0  |

<sup>a</sup>Units: µg mL<sup>-1</sup>  
<sup>b</sup>Mean ± SD (n=3)

**ACKNOWLEDGEMENTS**

Authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, MICINN (Grant No. CTQ2012-32941), the Junta de Andalucía (Grant No.P09- FQM4933) and the FEDER Program.

**CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

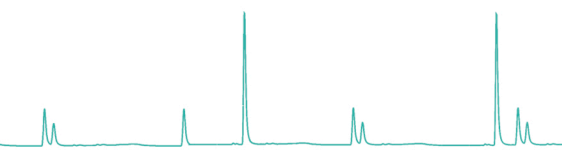
- [1] The Merck veterinary manual. Merck & Co. 2009. [http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antibacterial\\_agents/penicillins.html](http://www.merckvetmanual.com/mvm/pharmacology/antibacterial_agents/penicillins.html). Accessed 1 June 2016.
- [2] Commission Regulation EU No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Union. 2010;L15:1-72.
- [3] Tong L, Wang YX, Herno MP, Barrón D, Barbosa J. Simultaneous determination and toxicological assessment of penicillins in different water matrices. *Ecotoxicology*. 2014;23:2005 – 13.
- [4] Babington R, Matas S, Marco MP, Galve R. Current bioanalytical methods for detection of penicillins. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403:1549 – 66.
- [5] Song E, Yu M, Wang Y, Hu W, Cheng D, Swihart MT, Song Y. Multi-color quantum dot-based fluorescence immunoassay array for simultaneous visual detection of multiple antibiotic residues in milk. *Biosens Bioelectron*. 2015;72:320 – 5.
- [6] Cazorla-Reyes R, Romero-González R, Garrido-Frenich A, Rodríguez-Maresca MA, Martínez-Vidal JL. Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*. 2014;89:203 – 12.
- [7] Pozo OJ, Guerrero C, Sancho JV, Ibáñez M, Pitarch E, Hogendoorn E, Hernández F. Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1103:83 – 93.

- [8] Rezende CP, Almeida MP, Brito RB, Nonaka CK, Leite MO. Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle. *Food Addit Cont A*. 2012;29:541 – 49.
- [9] Lara FJ, del Olmo-Iruela M, Cruces-Blanco C, Quesada-Molina C, García-Campaña AM. Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography. *Trends Anal Chem*. 2012;38:52 – 66.
- [10] Cámara M, Gallego-Picó A, Garcimuño RM, Fernández-Hernando P, Durand-Alegría JS, Sánchez PJ. An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine  $\beta$ -lactam antibiotics in ewe milk. *Food Chem*. 2013;141:829 – 34.
- [11] Samanidou VF, Karageorgou EG. On the use of Kinetex™-C18 core shell 2.6  $\mu$ m stationary phase to the multiclass determination of antibiotics. *Drug Test Analysis*. 2011;3:234 – 44.
- [12] Karageorgou EG, Samanidou VF, Papadoyannis IN. Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of  $\beta$ -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection. *J Sep Sci*. 2012;35:2599 – 607.
- [13] Ali I, Gaitonde VD, Grahn A. Halo columns: new generation technology for high speed liquid chromatography. *J Chromatogr Sci*. 2010;48:386-94.
- [14] Aguilar-Caballeros MP, Gómez-Hens A. Long-wavelength fluorophores: new trends in their analytical use. *Trends Anal Chem*. 2004;23:127 – 36.

- [15] Huertas-Pérez JF, Moreno-González D, Airado-Rodríguez D, Lara FJ, García-Campaña AM. Advances in the application of chemiluminescence detection in liquid chromatography. *Trends Anal Chem.* 2016;75:35 – 48.
- [16] Gámiz-Gracia L, García-Campaña AM, Huertas-Pérez JF, Lara FJ. Chemiluminescence detection in liquid chromatography: applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis--A review. *Anal Chim Acta.* 2009;640:7 – 28.
- [17] Iranifam M. Revisiting flow-chemiluminescence techniques: pharmaceutical analysis. *Luminescence.* 2013;28:798 – 820.
- [18] Long G, Winefordner JD. Limit of detection A closer look at the IUPAC definition. *Anal Chem.* 1983;55:712A – 724A.
- [19] Sánchez-Martínez ML, Aguilar-Caballos MP, Gómez-Hens A. Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;34:1021 – 27.
- [20] Wan CH, Cui H, Pan YL, Zheng P, Liu LJ. Determination of quinolone residues in prawn using high-performance liquid chromatography with Ce(IV)- Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-HNO<sub>3</sub> chemiluminescence detection. *J Chromatogr B.* 2006;843:1 – 9.
- [21] Gorman BA, Lin KF, Hogan CF, Barnett NW. Effect of oxidant type on the chemiluminescence intensity from the reaction of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) with various organic acids. *Talanta.* 2007;72:568 – 74.
- [22] Walily AFME, Gazy AAK, Belal SF, Khamis EF. Use of cerium(IV) in the spectrophotometric and spectrofluorimetric determinations of penicillins and cephalosporins in their pharmaceutical preparations. *Spectrosc Lett.* 2000;33:931-48.

- [23] Ikeda R, Ichiyama K, Tabuchi N, Wada M, Kuroda N, Nakashima K. Determination of folates by HPLC-chemiluminescence using a ruthenium(II)-cerium(IV) system, and its application to pharmaceutical preparations and supplements. *Luminescence*. 2014;29:824 – 30.
- [24] Long XY, Chen FN. Determination of carbamazepine in human urine and serum samples by high-performance liquid chromatography with post-column  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ - $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  chemiluminescence detection. *Luminescence*. 2013;28:211–6.
- [25] Lagercrantz C. Formation of aminoxyl radicals in the reaction between penicillins and hydrogen peroxide. *Free Radical Bio Med*. 1992;13:455-7.
- [26] Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins CPB, Lucci P, Busquets R. State-of-the-art in fast liquid chromatography–mass spectrometry for bio-analytical applications. *J Chromatogr B*. 2013;927:3 – 21.
- [27] Snyder LR, Kirkland JJ, Dolan JW. Introduction to modern liquid chromatography 3rd ed. New York: Wiley & Sons; 2010. pp. 54-57.
- [28] Ma L, Kang WJ, Xu XD, Niu LM, Shi HM, Li S. Flow-injection chemiluminescence determination of penicillin antibiotics in drugs and human urine using luminol-Ag(III) complex system. *J Anal Chem*. 2012;67:219 – 25.





# CAPÍTULO V



## DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS





**E**n este Capítulo de la Memoria se aborda una discusión detallada y crítica de los resultados obtenidos a lo largo de la Tesis Doctoral, dedicada al desarrollo de nuevas metodologías con detección luminiscente aplicables al análisis agroalimentario. Se discuten las ventajas y limitaciones de los métodos propuestos y se comparan sus características con las de otros métodos previamente descritos. Asimismo, se discute la utilidad de estos métodos a partir de los resultados obtenidos mediante su aplicación al análisis de muestras agroalimentarias, ya que uno de los objetivos de las investigaciones desarrolladas ha sido demostrar su aplicabilidad y su posible utilización en análisis de rutina.

El Capítulo está dividido en cuatro secciones, dedicando las dos primeras al uso de nanomateriales en el desarrollo de nuevas metodologías analíticas, bien como reactivos luminiscentes o bien para mejorar alguna etapa del proceso cromatográfico. En la tercera sección se discute el desarrollo de nuevas metodologías en cromatografía de líquidos rápida con detección luminiscente. En la última parte se resumen las ventajas y limitaciones de los métodos desarrollados.

#### **V.1 NUEVOS NANOMATERIALES COMO REACTIVOS ANALÍTICOS LUMINISCENTES**

Las magníficas prestaciones, ampliamente demostradas, que ofrece la Nanotecnología en Química Analítica, justifican que se continúe investigando en el uso de nuevos nanomateriales para mejorar las características de los métodos determinativos. Con este fin se ha estudiado por primera vez la utilidad de nanopartículas de óxido de terbio ( $Tb_4O_7$  NPs) como reactivo para originar luminiscencia sensibilizada, comparando los resultados con los obtenidos mediante iones  $Tb(III)$  en disolución. Como ya se ha comentado en la Introducción de esta

Memoria, los iones lantánidos, principalmente Tb(III) y Eu(III), forman quelatos luminiscentes con ligandos orgánicos multidentados debido al fenómeno de la luminiscencia sensibilizada [1, 2]. Este fenómeno ha sido muy utilizado con fines analíticos debido a sus especiales características, tales como 1) la buena estabilidad de los iones lantánidos, 2) la rápida formación de quelatos muy luminiscentes, 3) la minimización de interferencias procedentes de la matriz de la muestra, ya que la emisión se produce a longitudes de onda relativamente largas, y 4) la capacidad de estos sistemas para conseguir una selectividad temporal debido a la larga vida media de la luminiscencia de estos quelatos.

Para estudiar el comportamiento luminiscente de Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs se han elegido el lasalocid (LAS) y el salicilato (SAL) como analitos modelo. Estos compuestos son fármacos de uso veterinario, por lo que su determinación en alimentos para animales y en muestras de alimentos de origen animal es de interés. En concreto, LAS es un antibiótico ampliamente utilizado para prevenir la coccidiosis en aves de corral y SAL se puede utilizar por vía tópica para el tratamiento de infecciones en la piel, siendo también uno de los principales metabolitos del ácido acetilsalicílico. Las estructuras químicas de ambos compuestos se muestran en la Figura V.1, donde puede observarse que LAS contiene una molécula de SAL y una larga cadena como sustituyente que le confiere actividad ionófora.

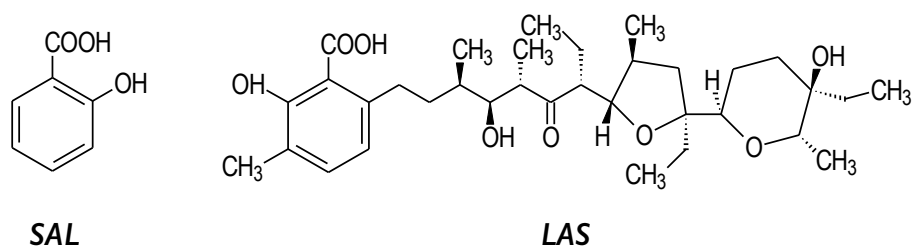
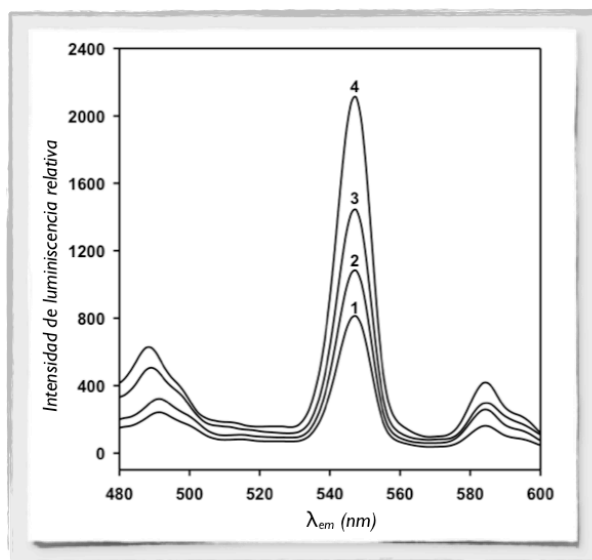


Figura V.1. Estructuras químicas de SAL y LAS

Se han seleccionado estos compuestos para estudiar la posible utilidad de las  $Tb_4O_7$  NPs como reactivo luminiscente ya que originan quelatos muy luminiscentes con iones  $Tb(III)$  en disolución, lo que ha sido previamente utilizado para el desarrollo de metodologías analíticas para su determinación [3 – 5]. El estudio se ha realizado en dos medios, a pH próximo a la neutralidad y en medio básico, comparando las señales luminiscentes obtenidas en el equilibrio con  $Tb_4O_7$  NPs y con iones  $Tb(III)$  en disolución.

Ambos reactivos se prepararon en concentraciones equivalentes de terbio, aunque es de prever que la cantidad de lantánido disponible en las NPs sea menor que la teórica debido a que es bastante improbable que los analitos penetren en el núcleo de las mismas. Estas NPs presentan una baja dispersión en agua, por lo que se realizaron ensayos con diferentes disolventes orgánicos, tales como 2-propanol, metanol, etanol, tolueno y disoluciones de polietilenglicol (PEG), comprobándose que la mejor dispersión se obtiene en 2-propanol mediante agitación permanente. La intensidad de la luminiscencia de estas disoluciones se midió en un espectrofluorímetro a  $\lambda_{ex}$  318 nm y  $\lambda_{em}$  545 nm.

En la Figura V.2 se muestran los espectros de emisión obtenidos a pH 6 para SAL y LAS en presencia de ambos reactivos. Puede observarse que en los cuatro sistemas ensayados aparecen las bandas de emisión típicas de la luminiscencia sensibilizada de terbio, obteniendo señales más intensas para LAS con  $Tb_4O_7$  NPs, a diferencia de SAL que proporcionó una mayor luminiscencia con iones  $Tb(III)$ .



**Figura V.2.** Espectros de emisión obtenidos con LAS (1,3) y SAL (2,4) usando iones Tb(III) (1,4) y  $Tb_4O_7$  NPs (2,3) como reactivos,  $\lambda_{ex}$  318 nm

El pH del medio y la presencia de agentes sinérgicos y tensoactivos son variables que pueden afectar notablemente a los sistemas basados en luminiscencia sensibilizada cuando se utilizan iones Tb(III) como reactivo [1]. El pH se evaluó en el intervalo 5,5 – 8,0, utilizando para ello tres disoluciones reguladoras distintas: hexamina, imidazol y acetato. Las mejores señales se obtuvieron para LAS en presencia de hexamina (pH 6,2) y para SAL en presencia de imidazol (pH 7,2). Se estudiaron la influencia del óxido de tri n-octilfosfina (TOPO) como agente sinérgico y del Tritón X-100 como tensoactivo, observándose su efecto positivo en las señales obtenidas para ambos analitos con  $Tb_4O_7$  NPs, al igual que se ha descrito anteriormente con los iones terbio [3 – 5]. Es de destacar que la luminiscencia obtenida en presencia de TOPO y de Tritón X-100 en los sistemas estudiados fue unas diez veces mayor que la obtenida en ausencia de estos reactivos.

En la Tabla V.I se resumen los resultados obtenidos en el estudio de la optimización de las condiciones experimentales mediante el método univariante, incluyendo las variables estudiadas, los intervalos ensayados y los valores óptimos.

**Tabla V.I.** Estudio de las variables que afectan a los sistemas en medio neutro

| Variable      | LAS                  |                 |             | SAL                  |                 |          |
|---------------|----------------------|-----------------|-------------|----------------------|-----------------|----------|
|               | Intervalo de estudio | Valores óptimos |             | Intervalo de estudio | Valores óptimos |          |
|               |                      | Tb(III)         | NPs         |                      | Tb(III)         | NPs      |
| pH            | 5,5-8,0              | 6-6,5           |             | 5,5-8,0              | 7-7,5           |          |
| [TX-100], %   | 0,02-0,12            | 0,08            |             | 0,02-0,06            | 0,04            |          |
| [TOPO], mM    | 0,01-0,25            | 0,04-0,08       | 0,045-0,065 | 0,01-0,25            | 0,07-0,08       | 0,06-0,1 |
| [Tb], mM      | 0,01-1,8             | 1               | 0,06        | 0,02-0,75            | 0,1             | 0,11     |
| 2-propanol, % | 2,5-20               | 10              |             | 2,5-20               | 2,5             |          |

El estudio de la concentración de Tritón X-100 reveló que su valor óptimo para los sistemas con LAS fue el doble que para los sistemas con SAL, mientras que la concentración de TOPO no fue una variable crítica dentro de los intervalos estudiados. Del estudio de la influencia de las concentraciones de iones Tb(III) y Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs cabe destacar que la concentración óptima de NPs para el sistema con LAS fue unas quince veces menor que la de iones Tb(III), no observando esta diferencia para el sistema con SAL. Este comportamiento podría atribuirse a que la estructura química de LAS es más plana que la de SAL, lo que puede favorecer el proceso de transferencia de energía.

En lo referente a la influencia del porcentaje de 2-propanol, necesario para mejorar la dispersión de las NPs en el medio acuoso, como ya se ha indicado, ésta fue bastante distinta para los sistemas con LAS y SAL. La luminiscencia de LAS

utilizando iones Tb(III) o NPs no se afectó por la presencia de 2-propanol hasta un porcentaje de éste del 10%, pero valores superiores disminuyeron la señal, lo que puede atribuirse a la capacidad del disolvente para destruir las micelas del tensoactivo, las cuales protegen al quelato y favorecen el proceso de transferencia energética intramolecular desde el analito al terbio. Sin embargo, el 2-propanol tuvo un efecto más negativo para los sistemas con SAL ya que la luminiscencia disminuyó unas ocho veces cuando el porcentaje aumentó del 2,5 al 10%. El distinto comportamiento de los sistemas LAS y SAL en presencia del disolvente orgánico podría explicarse por el carácter más hidrofóbico de la molécula de LAS, originado por la presencia de una cadena sustituyente relativamente larga en su estructura.

Debido a que previamente se ha descrito la determinación de SAL mediante luminiscencia sensibilizada de terbio en medio básico [5], se ha investigado también la potencial utilidad de las Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs como reactivo en dicho medio, siendo necesaria en este caso la adición de un agente quelante fuerte, como el ácido etilendiaminotetracético (AEDT), para evitar la precipitación del hidróxido de terbio. Se estudió la influencia de dos tensoactivos, uno no iónico, el Tritón X-100, y otro catiónico, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), observándose un efecto más positivo en la señal luminiscente en presencia de este último. No obstante, la luminiscencia obtenida para el sistema Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs - LAS fue muy baja por lo que sólo se estudió el sistema Tb(III) - LAS y se realizó el estudio comparativo para SAL utilizando ambos reactivos.

En la Tabla V.2 se resumen las variables estudiadas, los intervalos ensayados y los valores seleccionados como óptimos en medio alcalino. Como puede observarse, los valores óptimos de concentración de AEDT y de hidróxido sódico fueron los mismos para los sistemas LAS y SAL con iones Tb(III), pero menores para el sistema NPs - SAL. La concentración de CTAB requerida para LAS es superior a la de los sistemas con SAL, debido probablemente a la necesidad de estabilizar la cadena sustituyente. La concentración de terbio fue una variable crítica, destacando

que la concentración óptima de NPs fue bastante inferior a las de iones Tb(III). El estudio de la influencia del 2-propanol en medio básico mostró unos resultados similares a los obtenidos en medio neutro.

**Tabla V.2.** Estudio de las variables que afectan a los sistemas en medio alcalino

| Variable      | LAS                  |              | SAL                           |                 |      |
|---------------|----------------------|--------------|-------------------------------|-----------------|------|
|               | Intervalo de estudio | Valor óptimo | Intervalo de estudio          | Valores óptimos |      |
|               |                      | Tb(III)      |                               | Tb(III)         | NPs  |
| [AEDT], mM    | 2,0 – 6,5            | 5            | 1 – 10                        | 5               | 2,5  |
| [NaOH], M     | 0,016 – 0,11         | 0,08         | 0,016 – 0,11                  | 0,08            | 0,06 |
| [CTAB], mM    | 0,125 – 5,0          | 1,2          | $1,25 \times 10^{-4}$ – 0,125 | 0,05            | 0,08 |
| [Tb], mM      | 0,05 – 1             | 0,5          | 0,05 – 1                      | 0,9             | 0,2  |
| 2-propanol, % | 2,5 – 20             | 10           | 2,5 – 20                      | 2,5             |      |

Una vez optimizadas las condiciones experimentales, se establecieron las características analíticas de los siete sistemas desarrollados, cuatro en medio neutro y tres en medio básico.

Los parámetros de calibración y límites de detección obtenidos para los sistemas en medio neutro se muestran en la Tabla V.3, donde puede observarse que los intervalos dinámicos abarcan entre 2 y 3 órdenes de magnitud, presentando en algunos casos dos intervalos lineales obtenidos usando distinta sensibilidad instrumental. Los límites de detección (LDs), calculados siguiendo las recomendaciones de la IUPAC, son en todos los casos inferiores a 5 ng/mL y comparables a los de otros métodos previamente descritos [1, 3-5]. Cabe destacar que el LD obtenido para LAS con las NPs fue inferior al obtenido con los iones



Tb(III), mientras que el comportamiento fue al contrario en el caso de SAL. En lo referente a la precisión de estos métodos, expresada con porcentaje de desviación estándar relativa (%DER), los valores obtenidos usando NPs (2,3 - 3,8%) fueron ligeramente menores que con iones Tb(III) (3,5 - 6,6%). Estos resultados demuestran que la utilización de Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs como reactivo en medio neutro para la determinación de LAS y SAL ofrece unas prestaciones bastantes similares a las de los iones Tb(III).

**Tabla V.3.** Parámetros de calibración y límites de detección en medio neutro

| Sistema                                 | Tb(III)-LAS   | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -LAS                             | Tb(III)-SAL  | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|---|---|---|--|-------------------------------------|
| Intervalo lineal (ng mL <sup>-1</sup> ) | 5 – 300<br>300 – 5000   | 3 – 700<br>700 – 4000   | 3 – 250<br>250 – 2500                                      | 20 - 1250                           |
| Pendiente ± DE                          | 144 ± 2<br>6,4 ± 0,2  | 44,0 ± 0,8<br>4,72 ± 0,08                                       | 97 ± 2<br>13,9 ± 0,9                                       | 9,7 ± 0,8                           |
| Ordenada en origen ± DE                 | (1,9 ± 0,2) × 10 <sup>1</sup><br>(-1,0 ± 0,2) × 10 <sup>1</sup> | (1,0 ± 0,3) × 10 <sup>1</sup><br>(-1,3 ± 0,8) × 10 <sup>2</sup> | (2,0 ± 0,9) × 10 <sup>1</sup><br>(9 ± 1) × 10 <sup>2</sup> | (5,0 ± 0,4) × 10 <sup>1</sup>       |
| Coefficiente de regresión (r)           | 0,9991<br>0,992   | 0,998<br>0,999  | 0,996<br>0,990   | 0,998                               |
| LD (ng mL <sup>-1</sup> )               | 1,8   | 1,0   | 1,0  | 4,0                                 |

Los parámetros de calibración para las metodologías en medio básico se muestran en la Tabla V.4. Como se comentó anteriormente, los resultados para el sistema Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> – LAS no fueron satisfactorios, por lo que no se establecieron sus características analíticas. Puede observarse que los intervalos de calibración son similares a los obtenidos en medio neutro, pero los LDs son superiores, a excepción del correspondiente a SAL en presencia de iones Tb(III). Los valores de %DER fueron algo mayores que los obtenidos en medio neutro, pero menores o iguales al 8%.

A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que el medio neutro es más adecuado para las determinaciones de LAS y SAL.

**Tabla V.4.** Parámetros de calibración y límites de detección en medio alcalino

| Sistema                                      | Tb(III)-LAS                    | Tb(III)-SAL   | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|--|--------------------------------|---|-------------------------------------|
| <b>Intervalo lineal (ng mL<sup>-1</sup>)</b> | 100 – 5000                     | 5 – 700<br>700 – 4500                                       | 40 – 2500                           |
| <b>Pendiente ± DE</b>                        | 6,7 ± 0,2                      | 85 ± 2<br>2,8 ± 0,1   | 4,3 ± 0,1                           |
| <b>Ordenada en origen ± DE</b>               | (-4,3 ± 2,1) × 10 <sup>1</sup> | (-4,7 ± 2,3) × 10 <sup>1</sup><br>(6 ± 3) × 10 <sup>2</sup> | -5,2 ± 3,3                          |
| <b>Coefficiente de regresión (r)</b>         | 0,997                          | 0,997<br>0,995  | 0,996                               |
| <b>LD (ng mL<sup>-1</sup>)</b>               | 30                             | 1,1   | 12                                  |

Para demostrar la utilidad de las Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs como reactivo analítico se ha aplicado el método para LAS en medio neutro al análisis de distintos alimentos. Previamente se llevó a cabo un estudio de la potencial influencia de otros agentes antimicrobianos de uso veterinario para evaluar la selectividad del método. Los compuestos ensayados fueron antibióticos del grupo de los ionóforos (monensina y salinomina), aminoglucósidos (gentamicina y neomicina), macrólidos (estreptomicina, tilosina, eritromicina y espectinomicina), fluoroquinolonas (marbofloxacin), tetraciclinas (tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina) y colistina. Las tetraciclinas originaron una disminución en la señal luminiscente, pero esta interferencia pudo eliminarse mediante la adición de iones calcio, siendo toleradas finalmente a una concentración 4 veces superior a la de LAS. Los restantes antibióticos no afectaron al método.

El método propuesto para la determinación de LAS con el uso de Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs se aplicó al análisis de agua de grifo, de una pre-mezcla para aves comercializada como Avatec® 150 G, utilizada con fines terapéuticos, y de huevos. El tratamiento previo fue distinto para cada muestra, dependiendo de su composición, aplicando el método de adición estándar para los análisis. Las muestras de agua no requirieron ningún tratamiento previo, pero el análisis de la pre-mezcla necesitó una etapa de extracción sólido-líquido, al igual que en otros métodos descritos previamente [3, 6], y el análisis de muestras de huevo incluyó una etapa de extracción en fase sólida (SPE). El contenido de LAS encontrado en la pre-mezcla para aves fue  $13,9 \pm 0,5\%$ , ligeramente inferior al valor que aparece en la ficha técnica suministrada por el fabricante (15%) [7]. En el resto de muestras analizadas no se encontró LAS. Se realizó un estudio de recuperaciones añadiendo tres concentraciones distintas de LAS a cada muestra, obteniéndose valores de recuperación entre 80,0% y 105,0%. Para las muestras de huevo, la adición del estándar de LAS se realizó a 0,5, 0,75 y 1 veces su LMR, de acuerdo con la directiva de la UE EC/37/2010 [8].

Los resultados obtenidos han demostrado la capacidad de Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs para originar luminiscencia sensibilizada y para utilizarlas como reactivos alternativos a los iones Tb(III) para la determinación de LAS y SAL el medio neutro. También se ha demostrado su aplicabilidad para el análisis de distintos tipos de muestras. Cabe indicar que las Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs se encuentran comercialmente disponibles, a diferencia de otras NPs utilizadas como reactivos analíticos, que requieren su síntesis previa en el laboratorio.

Aunque las características analíticas de los métodos desarrollados con las NPs son bastante similares a las obtenidas utilizando iones Tb(III), así como el precio de ambos reactivos, una ventaja del uso de las NPs es la disminución del coste de cada análisis ya que la cantidad de NPs requerida es 15 veces menor que la de sal de Tb(III).

La aplicabilidad analítica de las Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs podría ampliarse mediante su utilización en cromatografía de líquidos para la derivatización postcolumna, con un montaje similar al propuesto en la Sección V.3.2 de este capítulo. También podría investigarse su utilidad para el desarrollo de un método de selección mediante la tecnología de reactivos secos, teniendo en cuenta la elevada estabilidad de estas NPs. Después de su inmovilización en un soporte sólido adecuado, la determinación sólo requeriría la adición de la muestra, lo que permitiría la miniaturización del método y su aplicación al análisis de rutina, debido a la elevada frecuencia de muestreo que ofrece esta tecnología.

## **V.2 NUEVAS ESTRATEGIAS EN CROMATOGRAFÍA CON EL USO DE NANOMATERIALES**

Como ya se ha comentado, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido ampliar y demostrar la utilidad de la Nanotecnología en el desarrollo de métodos analíticos cromatográficos. Con este fin, se ha realizado un estudio bibliográfico en el que se pone de manifiesto las prestaciones que ofrecen diversos nanomateriales en las distintas etapas del proceso cromatográfico. En esta sección también se incluye un método para la determinación de tetraciclinas y quinolonas mediante cromatografía de líquidos ultrarrápida (UHPLC), en el que se ha utilizado un nuevo nanomaterial magnético híbrido como sorbente en extracción en fase sólida magnética, usada como etapa previa a la determinación cromatográfica.

### **V.2.1 Nanomateriales como herramientas en métodos cromatográficos**

En el estudio bibliográfico realizado se ha investigado la utilidad de distintos nanomateriales en las tres etapas principales del proceso cromatográfico: tratamiento de muestra, separación cromatográfica y derivatización-detección. Es de destacar que de los numerosos artículos encontrados en las distintas bases de datos sobre nanomateriales y determinaciones analíticas, aproximadamente el 30% implica el uso de técnicas cromatográficas. Debido a la extensa bibliografía existente sobre esta temática, para realizar este estudio se han seleccionado exclusivamente los artículos

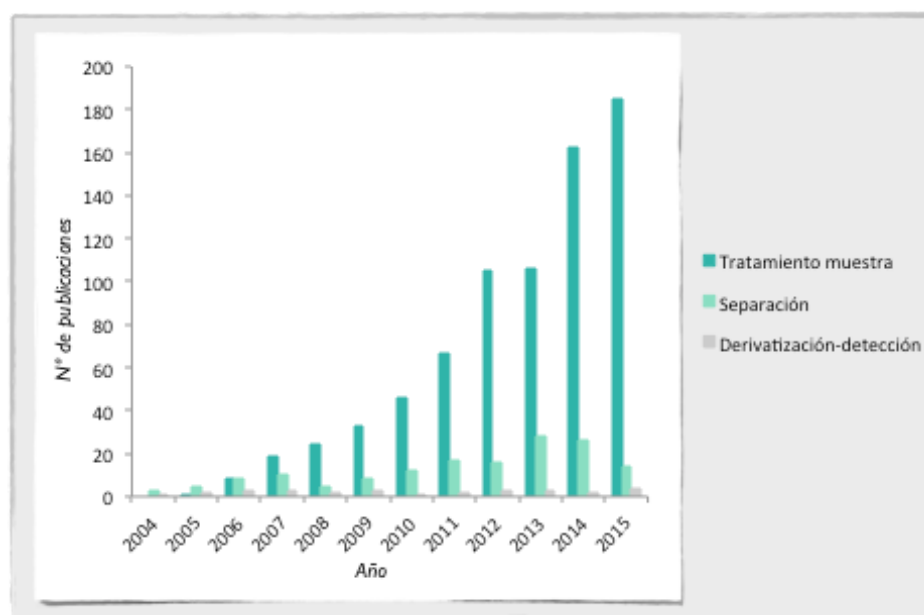
que incluyen una comparación de los resultados obtenidos en presencia y ausencia de nanomateriales. Esta selección ha permitido demostrar los beneficios reales que ha aportado la Nanotecnología para mejorar las características analíticas de las determinaciones cromatográficas, principalmente la sensibilidad y la selectividad.

La disponibilidad de métodos reproducibles para la síntesis de nanomateriales y de técnicas adecuadas para su caracterización ha dado lugar a una gran diversidad de nanomateriales con distintas propiedades que pueden utilizarse según la etapa del proceso cromatográfico que se pretenda mejorar. Dentro de los distintos tipos, se ha descrito el uso de nanomateriales de carbono (nanotubos de carbono, grafeno y óxido de grafeno), NPs metálicas (de oro y plata), de óxidos metálicos, de sílice y magnéticas, entre otros. Además, el desarrollo de nuevos nanomateriales híbridos y de procedimientos para la funcionalización de su superficie han ampliado las posibilidades de aplicación de los nanomateriales en técnicas cromatográficas.

En la Figura V.3 se muestra el crecimiento exponencial en el número de artículos, publicados en las revistas analíticas con mayor índice de impacto en los últimos doce años, sobre el uso de nanomateriales en cada una de las tres etapas básicas del proceso cromatográfico. Puede observarse que la etapa de tratamiento de muestra es la que ha experimentado un mayor crecimiento, muy superior al de las etapas de separación y derivatización-detección.

La SPE con el uso de nanomateriales como sorbentes ha sido ampliamente utilizada en la etapa de tratamiento de muestra [9 – 18] debido a algunas propiedades de éstos, tales como gran área superficial, facilidad de funcionalización y elevada capacidad de adsorción, lo que permite conseguir elevados factores de preconcentración. No obstante, su uso también presenta algunos inconvenientes como pueden ser una elevada presión en el cartucho, baja selectividad, formación de agregados o posibles pérdidas del sorbente desde el cartucho. Algunas de estas

limitaciones pueden evitarse utilizando la SPE dispersiva (d-SPE), en la que NPs recubiertas con el sorbente se dispersan en la disolución, donde interaccionan con los analitos y los retienen en su superficie sin necesidad de utilizar columnas de SPE. Posteriormente se separa el sorbente, normalmente mediante centrifugación o filtración, y se procede a eluir los analitos retenidos en el sorbente.



**Figura V.3.** Evolución del número de artículos publicados en las principales revistas analíticas sobre el uso de nanomateriales en las tres etapas básicas del proceso cromatográfico (Fuente: Scopus 2016, Elsevier B.V.)

El desarrollo de NPs magnéticas (MNPs) ha dado lugar a la d-SPE magnética (MSPE), ampliamente utilizada como etapa previa a la separación cromatográfica. De hecho, un elevado porcentaje de los artículos publicados sobre tratamiento de muestra en métodos cromatográficos inciden en el uso de MSPE. En esta técnica, los analitos son retenidos en la superficie de un nanomaterial magnético sorbente y separados de la matriz de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético externo, evitando así las etapas de centrifugación y/o filtración necesarias en d-SPE

convencional. El uso de la MSPE permite conseguir extracciones rápidas muy eficaces debido a la elevada relación área superficial-volumen de las MNPs, lo que facilita la transferencia de masa desde la disolución de la muestra a las NPs.

Los materiales magnéticos más utilizados son la magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) y la maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), los cuales se recubren con sustancias inorgánicas u orgánicas para mejorar las propiedades sorbentes de las MNPs mediante grupos funcionales adecuados y para evitar su oxidación [9, 10, 15, 16, 19]. Entre las sustancias inorgánicas se han utilizado sílice, metales y óxidos metálicos mientras que nanotubos de carbono, grafeno, diversos polímeros, polímeros de impresión molecular, líquidos iónicos y surfactantes son ejemplos de compuestos orgánicos utilizados para preparar MNPs modificadas.

En lo referente al uso de nanomateriales en la etapa de separación cromatográfica, aunque el número de artículos publicados es muy inferior al de artículos dedicados a tratamiento de muestra, se han descrito ejemplos muy interesantes que demuestran la utilidad de la Nanotecnología para mejorar las características de las columnas utilizadas en cromatografía de gases [12, 20 – 24] y de líquidos [12, 20 – 22, 25 - 36]. Distintos nanomateriales, tales como NPs metálicas y de óxidos metálicos, nanotubos de carbono, fullerenos y grafeno, se han utilizado para aumentar el área de contacto de la fase estacionaria con los solutos, mejorar la selectividad, la eficacia de la separación y las propiedades mecánicas.

La aplicabilidad de los nanomateriales en la etapa de derivatización-detección ha sido más limitada y restringida principalmente al uso de NPs metálicas, bien como reactivos para la derivatización post-columna [37-40] o como modificadores de la superficie de electrodos para mejorar la sensibilidad de la detección electroquímica [41]. Por ejemplo, se ha demostrado la utilidad de NPs de oro para la determinación de compuestos tiólicos mediante la agregación de estas NPs [37, 38] o basándose en su efecto catalítico en sistemas quimioluminiscentes [39, 40]. También se ha

demostrado la utilidad de estas NPs [41], así como la de nanotubos de carbono [42] para mejorar la señal electroquímica, basándose en las propiedades electroquímicas de estos nanomateriales y en su capacidad para aumentar el área de contacto del electrodo con el eluyente procedente de la columna cromatográfica.

En resumen, de este estudio puede deducirse el efecto positivo que tiene la Nanotecnología en los métodos cromatográficos analíticos. Los logros alcanzados hasta la fecha justifican que exista una clara tendencia hacia el desarrollo de nuevas metodologías que continúen mejorando las propiedades analíticas de estos métodos. La disponibilidad de nuevos nanomateriales funcionalizados con grupos químicos selectivos continuará siendo un tema candente dentro de las investigaciones en este área analítica.

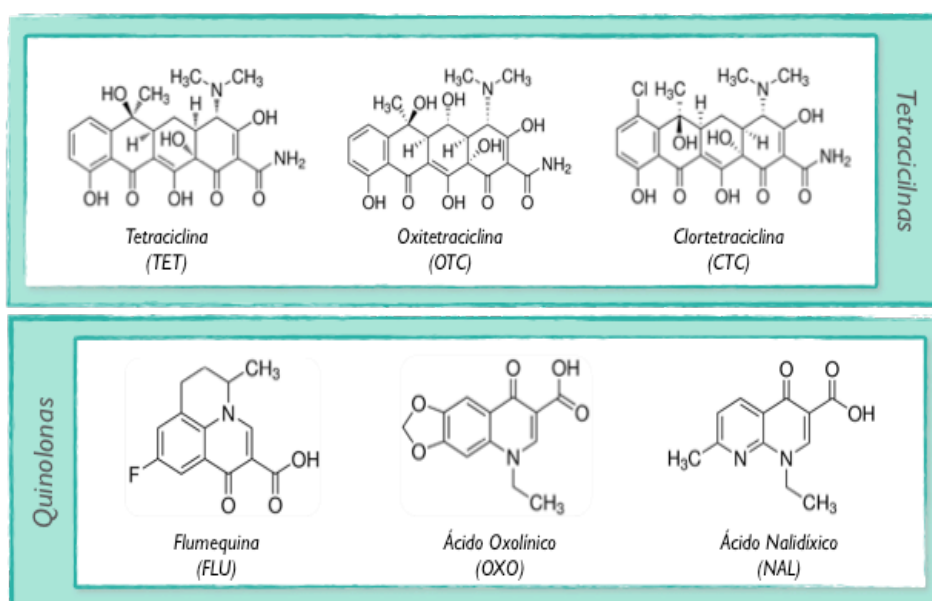
#### ***V.2.2 Utilidad de nanomateriales híbridos magnéticos para la preconcentración de quinolonas y tetraciclinas previa a su separación mediante cromatografía de líquidos ultrarrápida (UHPLC)***

El control de la presencia de residuos de antibióticos en alimentos es problemático debido a los bajos límites de concentración definidos por la legislación y a la complejidad de la matriz de las muestras de alimentos. Normalmente es necesario utilizar etapas previas de tratamiento de muestra bastante laboriosas para alcanzar los niveles de concentración requeridos. Como se ha indicado anteriormente, el desarrollo de la Nanotecnología ha dado lugar a nuevas técnicas para el tratamiento de muestra, como la MSPE, que permiten simplificar esta etapa y reducir el consumo de disolventes orgánicos [43-52].

En esta Memoria se ha presentado un método en el que se propone un nuevo nanomaterial híbrido constituido por un núcleo magnético recubierto con terbio y europio para utilizarlo como soporte sólido en MSPE, previa a la determinación de los analitos mediante UHPLC con detección fluorimétrica. Para el desarrollo de estas investigaciones, se han seleccionado seis analitos modelo



pertenecientes a dos familias de antibióticos, tetraciclinas y quinolonas, los cuales son muy utilizados con fines veterinarios: tetraciclina (TET), oxitetraciclina (OTC), clortetraciclina (CTC), flumequina (FLU), ácido oxolínico (OXO) y ácido nalidíxico (NAL), cuyas estructuras se muestran en la Figura V.4.



**Figura V.4.** Estructuras químicas de las tetraciclinas y quinolonas seleccionadas como analitos modelo

En la investigación realizada se estudió la posible utilización de diferentes tipos de NPs para separar los analitos de la matriz de la muestra y preconcentrarlos. Se ensayaron NPs de oro, de plata, de óxido de terbio ( $Tb_4O_7$ ) y de europio ( $Eu_2O_3$ ) y de sílice modificada con grupos fenilo como posibles materiales sorbentes en d-SPE. Sólo se observó interacción de las quinolonas con las  $Tb_4O_7$  NPs y de las tetraciclinas con las  $Eu_2O_3$  NPs debido a la formación de los correspondientes quelatos entre los iones lantánidos y las NPs. En esta interacción intervienen los grupos carboxilo de las quinolonas y los grupos  $\beta$ -dicetona de las tetraciclinas, según se ha descrito previamente para los iones  $Tb(III)$  [1] y  $Eu(III)$  [53]. No obstante, la

extracción de los analitos con estas NPs no fue posible debido a que no pudieron separarse en su totalidad mediante centrifugación y/o filtración, lo que podría dar lugar a que entraran en el sistema cromatográfico obstruyendo los tubos de reducido diámetro del instrumento de UHPLC y dañando la columna.

Para evitar esta limitación se sintetizaron en el laboratorio NPs magnéticas híbridas mediante la modificación de un método de síntesis previamente descrito [54], como se indica en el Apartado I.9 del Capítulo I de esta Memoria. Después de sintetizar las NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  recubiertas con polietilenglicol (PEG), éstas se recubrieron con terbio y europio utilizando los correspondientes nitratos de estos iones lantánidos. Las NPs se caracterizaron utilizando microscopía de transmisión electrónica (TEM), difracción de rayos X (XRD) y espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS), obteniendo un diámetro medio de  $9,5 \pm 0,4$  nm y demostrando la presencia de ambos lantánidos en las NPs. El núcleo magnético en este nanomaterial híbrido permite su separación del extracto de muestra de forma sencilla con ayuda de un imán.

Se realizó un exhaustivo estudio de las variables que afectan al proceso de extracción con el nanomaterial híbrido utilizando el método univariante (Tabla V.5). La cantidad de nanomaterial se evaluó en el intervalo 5 – 20 mg, encontrándose resultados satisfactorios con 12 mg de NPs. El estudio de la influencia del pH en un intervalo de 7 – 9 mostró que las tetraciclinas se retenían mejor a pH básico, debido a que sus valores de pKs están próximos a 8, mientras que las quinolonas requerían valores de pH más cercanos a la neutralidad ya que sus pKs están próximos a 6, por lo que se eligió el valor de 8,3 como solución de compromiso. El estudio del tiempo de interacción demostró que la máxima eficiencia de la extracción se conseguía entre los primeros 5 y 10 minutos, manteniéndose prácticamente constante a partir de este último valor.

Tabla V.5. Estudio de las variables que afectan a la etapa de MSPE

| Variable   | Intervalo de estudio | Valor óptimo |
|--|----------------------|--------------|
| Cantidad de sorbente, mg                                   | 5 – 20               | 12           |
| pH para retener los analitos                               | 7 – 9                | 8,3          |
| Tiempo para retener los analitos, min                      | 5 – 30               | 10           |
| [Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ], mmol L <sup>-1</sup> | 50 – 500             | 100          |
| pH de la disolución de Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   | 7 – 12               | 9,8          |
| [Na <sub>2</sub> AEDT], mmol L <sup>-1</sup>               | 5 – 100              | 75           |
| pH de la disolución de Na <sub>2</sub> AEDT                | 4,5 – 10             | 4,8          |
| Volumen de eluyente, µL                                    | 250 – 2000           | 500          |
| Tiempo de elución, min                                     | 5 – 60               | 30           |

Aunque se realizaron diversos ensayos para conseguir la elución simultánea de los analitos retenidos en el sorbente, no fue posible debido básicamente a la necesidad de utilizar reacciones de desplazamiento y un cambio de pH. Las quinolonas se eluyeron adecuadamente en disolución de nitrato de magnesio a pH básico, mientras que las tetraciclinas necesitaron un quelatante fuerte como el AEDT en medio ligeramente ácido. No fue posible la utilización conjunta de ambos reactivos desplazantes en una única elución debido a las distintas propiedades físico-químicas de los analitos por lo que se investigó la elución secuencial estudiando por separado las condiciones óptimas para las quinolonas y las tetraciclinas. En la Tabla V.5 se resumen los valores óptimos para las concentraciones de los eluyentes y el volumen y tiempo de elución. Debido a que las quinolonas requieren un medio básico para la elución, según estudios preliminares realizados, se ajustó el pH de la disolución de Mg(II) a 9,8 con objeto de evitar la precipitación del hidróxido de magnesio a pHs mayores. Para la elución de las tetraciclinas, el pH de la disolución de AEDT se ajustó a un valor de 4,8.

Para desarrollar la separación cromatográfica se ha utilizado la modalidad de fase reversa con gradiente de elución, mediante una fase móvil cuya composición era una mezcla de acetonitrilo (ACN) con una disolución de acetato amónico a pH 6,9 que contiene nitrato de magnesio. La detección se ha realizado mediante fluorimetría, obteniendo los cromatogramas simultáneamente a dos pares de longitudes de onda de excitación y emisión, 255 y 360 nm, respectivamente, para quinolonas, y 390 y 512 nm, respectivamente, para tetraciclinas.

En la Tabla V.6 se resume el estudio de la optimización de las variables que afectan al sistema cromatográfico, realizado mediante el método univariante, incluyendo el intervalo de estudio y el valor seleccionado como óptimo para cada variable.

**Tabla V.6.** Estudio de las variables que afectan al sistema cromatográfico

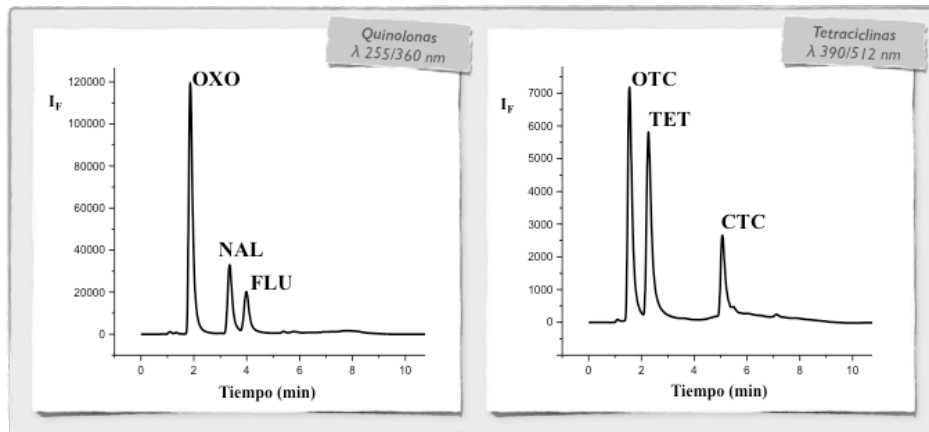
| <i>Variable</i>              | <i>Intervalo de estudio</i> | <i>Valor óptimo</i> |
|------------------------------|-----------------------------|---------------------|
| $[NH_4CH_3COO]$ , mM         | 50 – 125                    | 75                  |
| $[Mg(NO_3)_2]$ , mM          | 25 – 200                    | 200                 |
| pH                           | 2,6 – 7,6                   | 6,9                 |
| ACN inicial, %               | 10 – 20                     | 12                  |
| Caudal, mL min <sup>-1</sup> | 0,4 – 0,55                  | 0,5                 |
| Temperatura, °C              | 22 – 42                     | 32                  |
| Volumen inyección, µL        | 10 – 18                     | 15                  |

La separación cromatográfica de tetraciclinas requiere una fase móvil que contenga cationes divalentes tales como calcio o magnesio para mejorar los picos cromatográficos [55]. Se estudió la influencia de varias sales (cloruros de magnesio y de calcio y nitratos de magnesio y de calcio) encontrando que los iones magnesio

fueron más efectivos que los de calcio y que el uso de cloruro o nitrato no afectó a la separación. Se eligió el nitrato de magnesio por su mayor solubilidad en medio acuoso y se investigó la influencia de su concentración, encontrándose que se obtenían picos más estrechos para las tetraciclinas a concentraciones relativamente elevadas de la sal. Se eligió la concentración de 200 mM para el desarrollo del método, ya que permitió obtener buenos picos cromatográficos para las tetraciclinas sin afectar los de las quinolonas.

La influencia del pH se evaluó en el intervalo 2,6 – 7,6, usando diferentes disoluciones, tales como acetato sódico, acetato amónico y ácido acético, obteniendo picos más estrechos y mejor definidos en el intervalo 6 - 7,6. A valores de pH más bajos se obtuvieron picos que presentaban colas e incluso desdoblados. Se eligió un pH de 6,9 como valor óptimo, utilizando una disolución acuosa de acetato amónico 75 mM para ajustarlo.

La elección del disolvente orgánico que forma parte de la fase móvil se realizó ensayando metanol, ACN y mezclas de ambos disolventes, manteniendo el porcentaje de fase acuosa, obteniendo los mejores resultados con ACN. El porcentaje inicial de ACN se ensayó entre 10 y 20%, eligiendo 12% como valor óptimo ya que para porcentajes más elevados de ACN se obtenían tiempos de retención más cortos pero empeoraba la separación de los picos. Sin embargo este valor no era suficiente para eluir la CTC de forma satisfactoria, por lo que se ensayaron diferentes gradientes de elución, comprobándose que era necesario aumentar el porcentaje de ACN hasta el 88% para conseguir picos adecuados de CTC. La Figura V.6 muestra los cromatogramas típicos obtenidos en condiciones cromatográficas óptimas donde puede observarse que los tiempos de retención no superan los 5 min.



**Figura V.6.** Cromatogramas obtenidos simultáneamente con detección fluorimétrica dual en condiciones óptimas

Las características analíticas del método se muestran en la Tabla V.7, en la que se incluyen los parámetros de calibración y los LDs obtenidos con estándares y referidos al contenido en muestras de carne. Cabe destacar los amplios intervalos dinámicos de las calibraciones y los valores de los coeficientes de regresión, todos ellos muy próximos a la unidad.

Los límites de cuantificación del método, dados como los límites inferiores de los intervalos lineales presentados en la Tabla V.7, fueron muy inferiores a los Límites Máximos de Residuos (LMRs) establecidos para la mayoría de estos analitos (Tabla V.8) [8] y menores o comparables a los obtenidos con otros métodos ya descritos [47, 49, 50, 52, 56]. Esta característica del método permite su aplicación al análisis de muestras de carne.

Tabla V.7. Parámetros de calibración y límites de detección del método

| Analito | Tiempo de retención (min) | Intervalo lineal (ng mL <sup>-1</sup> ) | Pendiente ± DE | Ordenada ± DE                 | Coefficiente regresión (r) | LD (ng mL <sup>-1</sup> ) | LD (µg kg <sup>-1</sup> ) |
|---------|---------------------------|---|----------------|-------------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| OTC     | 1,56                      | 2 - 7500                                | 478 ± 1        | (7,4 ± 1,5) × 10 <sup>2</sup> | 0,9999991                  | 1,0                       | 3,3                       |
| TET     | 2,32                      | 3 - 7500                                | 609 ± 1        | (1,7 ± 0,3) × 10 <sup>3</sup> | 0,9999997                  | 1,5                       | 5,0                       |
| CTC     | 4,97                      | 10 - 1000                               | 397 ± 2        | (1,7 ± 0,5) × 10 <sup>3</sup> | 0,999824                   | 3,8                       | 12,7                      |
| OXO     | 1,87                      | 0,5 - 2000                              | 10940 ± 30     | (6,4 ± 0,9) × 10 <sup>3</sup> | 0,9999991                  | 0,25                      | 0,8                       |
| NAL     | 3,39                      | 1,5 - 2000                              | 3826 ± 2       | (1,8 ± 0,9) × 10 <sup>3</sup> | 0,9999998                  | 0,7                       | 2,3                       |
| FLU     | 4,13                      | 2,5 - 2000                              | 2310 ± 2       | (2,3 ± 0,9) × 10 <sup>3</sup> | 0,9999994                  | 1,2                       | 4,0                       |

Tabla V.8. Límites máximos de residuo de los analitos

| Tetraciclinas | LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) |       | Quinolonas | LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) |       |
|---------------|-------------------------------|-------|------------|-------------------------------|-------|
|               | Pollo                         | Cerdo |            | Pollo                         | Cerdo |
| OTC           | 100                           |       | OXO        | 100                           |       |
| TET           | 100                           |       | NAL        | No definido                   |       |
| CTC           | 100                           |       | FLU        | 400                           | 200   |

El estudio de la precisión se realizó a dos niveles de concentración de los analitos, obteniéndose valores de %DERs para el área de pico comprendidos entre 2,6 y 9,1% para medidas realizadas en un mismo día y 4,2 y 14,4% para medidas realizadas en distintos días. En las muestras analizadas, estos intervalos fueron 2,6 – 11,4% y 3,8 – 15,4%, respectivamente. Los resultados obtenidos para las tetraciclinas fueron mayores que los obtenidos para las quinolonas en todos los casos, lo que podría deberse a la menor estabilidad de las tetraciclinas. Asimismo, se calcularon el límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC\beta$ ), de acuerdo con la directiva europea 2002/657/EC [57] para cada analito en muestras de carne picada de pollo y cerdo, obteniéndose valores de  $CC\alpha$  comprendidos entre 104,7 y 206,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y de  $CC\beta$  entre 109,4 y 213,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

También se evaluó la selectividad del método ensayando diferentes antibióticos de uso veterinario pertenecientes al grupo de tetraciclinas y quinolonas (doxiciclina, minociclina, ciprofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina y norfloxacina), y de otras familias tales como penicilinas (amoxicilina), cefalosporinas (cefuroxima), aminoglucósidos (amikacina), macrólidos (eritromicina), ionóforos (lasalocid) y sulfamidas (sulfasalazina), encontrándose que la mayoría de ellos eran tolerados en una relación analito-interferente de 1:10 como mínimo. Sólo la minociclina y la enrofloxacina fueron toleradas en una relación máxima de 1,



interfiriendo con CTC y NAL a mayores relaciones. Sin embargo, la minociclina no se usa con fines veterinarios y los niveles de enrofloxacin definidos por la legislación son menores que los de las quinolonas determinadas [8].

Finalmente, el método desarrollado se aplicó al análisis de diferentes tipos de carne, tales como lomo de cerdo, pechuga de pollo y carne picada. El tratamiento de muestra fue el indicado en el Apartado I.10.4, no detectándose la presencia de los antibióticos utilizados como analitos en ninguna de las muestras analizadas. Se realizó un estudio de recuperación por triplicado a tres concentraciones distintas de analito para cada muestra, correspondientes a 0,5, 1 y 2 veces su LMR. Las recuperaciones medias obtenidas para cada analito estuvieron comprendidas entre el 79,1 – 91,8%. Aunque algunos de estos valores son relativamente bajos, son comparables a los obtenidos utilizando otros tipos de extracción para estos compuestos [47, 50, 52, 55, 58].

Entre las innovaciones que presenta el método propuesto cabe destacar la utilización por primera vez de un nanomaterial magnético dopado con Tb(III) y Eu(III) que permite la extracción de quinolonas y tetraciclinas mediante un mecanismo de retención que implica la formación de complejos entre el nanomaterial y los antibióticos. Una característica destacable del uso de este sorbente es que la elución de los analitos se realiza mediante adición secuencial de sales, evitando la utilización de disolventes orgánicos, lo que contribuye a que el método sea respetuoso con el medio ambiente. Además, el núcleo magnético del sorbente utilizado permite el uso de dispositivos con múltiples imanes para la separación de las NPs realizando la extracción simultánea y rápida de varias muestras sin necesidad de centrifugación.

En lo referente a la separación cromatográfica, la detección fluorimétrica dual permite la determinación simultánea de los analitos en un tiempo inferior a 5 minutos, disminuyendo los tiempos de retención obtenidos en otras separaciones

descritas de mezclas similares usando cromatografía de líquidos [43, 47 – 52]. La utilidad práctica del método desarrollado ha quedado demostrada mediante su aplicación al análisis de muestras de carne, con recuperaciones medias satisfactorias para los antibióticos ensayados a niveles de concentración inferiores a sus LMRs.

### **V.3 NUEVOS DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS RÁPIDA CON DETECCIÓN LUMINISCENTE**

En este apartado se incluyen dos métodos cromatográficos rápidos con detección luminiscente para la determinación de compuestos de interés agroalimentario, cuyo desarrollo no implica la utilización de nanomateriales. El objetivo básico de estos métodos ha sido mejorar las propiedades analíticas de métodos previamente descritos, ya sean básicas, como sensibilidad, selectividad y precisión, o complementarias (rapidez, coste y factores personales), pudiendo considerarse alternativos para aplicarlos al control de calidad en el sector agroalimentario.

Para alcanzar este objetivo se ha utilizado la cromatografía de líquidos rápida, ya sea de ultra-alta resolución mediante UHPLC o de alta resolución mediante el empleo de columnas “*fused-core*”. Para la detección se ha utilizado en el primer caso la fluorescencia intrínseca de los analitos y en el otro la señal luminiscente obtenida mediante derivatización post-columna de los analitos. Se han desarrollado las siguientes metodologías analíticas:

- ❑ Un método para la determinación de ácido acetilsalicílico y sus principales metabolitos en muestras de orina de bovino mediante UHPLC.
  
- ❑ Un método para la determinación de penicilinas de uso veterinario mediante cromatografía de líquidos rápida con detección luminiscente.

### V.3.1 Determinación de ácido acetilsalicílico y sus principales metabolitos mediante UHPLC

El ácido acetilsalicílico (ASA) y el ácido salicílico (SAL), su principal metabolito, son ampliamente utilizados como fármacos de uso veterinario por lo que la disponibilidad de métodos que permitan su determinación rápida tiene interés para controlar la presencia de estos compuestos o la de sus metabolitos en animales que van a dedicarse a la alimentación humana. En esta Memoria se ha investigado la separación y determinación rápida de ASA y sus principales metabolitos [SAL, ácido gentísico (GEN) y ácido salicílico (SAU)] en muestras de orina de bovino mediante UHPLC utilizando detección fotométrica para la cuantificación de ASA y fluorimétrica para la de sus metabolitos.

La Figura V.7 muestra la ruta metabólica del ASA, donde puede observarse que se hidroliza a SAL, principalmente en el sistema digestivo del animal, pudiendo también hidroxilarse originando GEN, mientras que SAL puede conjugarse con glicina para dar lugar a SAU. Pueden formarse otros derivados glucurónidos de SAU y GEN, pero sus niveles en orina animal son muy bajos [59].

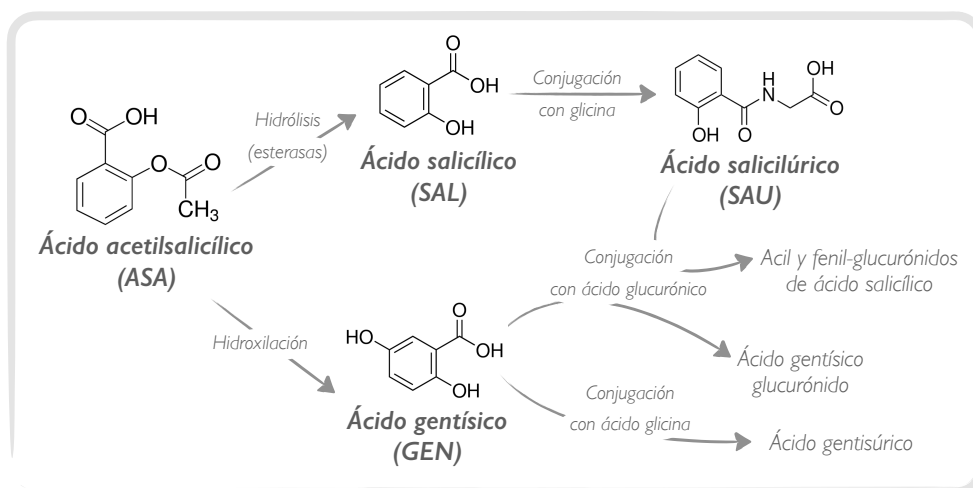
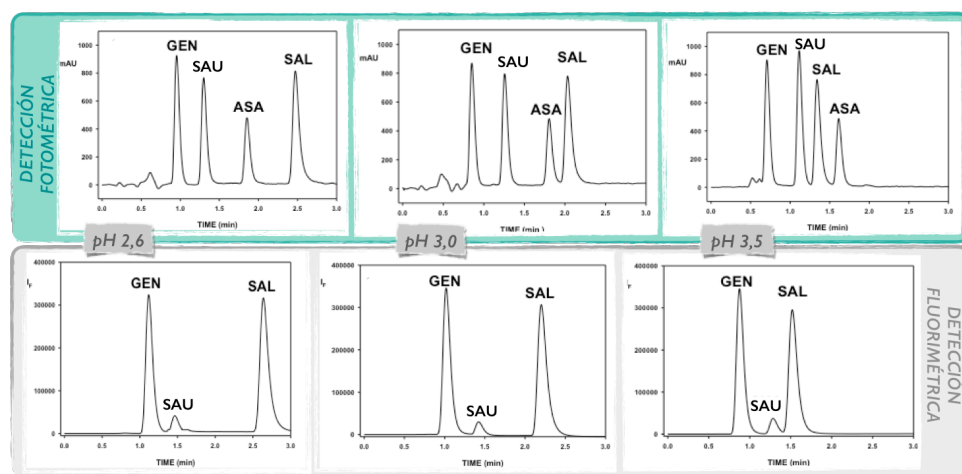


Figura V.7. Ruta metabólica del ácido acetilsalicílico y sus principales metabolitos

El método propuesto se basa en la separación mediante UHPLC de los cuatro analitos utilizando la modalidad en fase reversa con una columna analítica de C<sub>18</sub> como fase estacionaria y una fase móvil que consiste en ACN/disolución reguladora fosfato 3,5 mM a pH 3,5 (26:74, v/v), en condiciones isocráticas. Se ha conseguido la separación de los analitos en menos de dos minutos, lo que mejora los tiempos de análisis de los métodos previamente descritos en la bibliografía, donde las metodologías más rápidas que pueden encontrarse requieren al menos tres minutos y sólo determinan ASA y SAL [60 – 63]. El método desarrollado utiliza dos sistemas de detección, uno fotométrico, necesario para cuantificar ASA, ya que no presenta propiedades fluorescentes, y otro fluorimétrico para cuantificar los metabolitos que sí presentan fluorescencia intrínseca.

A partir de los espectros de excitación y emisión se seleccionaron las longitudes de onda de excitación/emisión máximas de los tres metabolitos estudiados, encontrando que estas eran 320/444 nm para GEN y 295/410 nm para SAU y SAL, por lo que se realizó una programación de las longitudes de onda para obtener el cromatograma con objeto de medir la señal máxima de cada compuesto. También se obtuvieron los espectros de absorción para localizar las longitudes de onda de máxima absorción de los analitos, seleccionando 240 nm como óptima para la determinación de ASA.

En el proceso de optimización, realizado mediante el método univariante, se estudiaron las principales variables implicadas en el sistema, tales como la composición y el caudal de la fase móvil, pH, temperatura y volumen de inyección. Una de las variables más críticas fue el pH, cuya influencia utilizando detección fotométrica y fluorimétrica se muestra en la Figura V.8. Puede observarse que al aumentar el pH disminuyen los tiempos de retención de los analitos, manteniéndose prácticamente constantes los valores de las señales obtenidas. Se eligió un pH de 3,5, ya que permite la adecuada separación de todos los analitos en el menor tiempo posible.



**Figura V.8.** Influencia del pH en la separación de GEN, SAU, SAL Y ASA usando detección fotométrica y fluorimétrica

Utilizando las condiciones experimentales óptimas se establecieron las características de los métodos fotométrico y fluorimétrico desarrollados. Es de destacar los bajos LDs obtenidos mediante detección fluorimétrica, muy inferiores a los obtenidos utilizando detección fotométrica, como muestra la Tabla V.9. Puede observarse que los LDs alcanzados en el método fluorimétrico para GEN, SAU y SAL son 100, 12 y 150 veces menores, respectivamente, que los obtenidos en el método fotométrico.

**Tabla V.9.** Límites de detección de los métodos fotométrico y fluorimétrico

| Analito | Límite de detección (ng mL <sup>-1</sup> ) |                         |
|---------|--|-------------------------|
|         | Detección fotométrica                      | Detección fluorimétrica |
| GEN     | 9  | 0,09                    |
| SAU     | 13   | 1,1                     |
| SAL     | 12   | 0,08                    |
| ASA     | 2,2  | -                       |

El estudio de la precisión en el día y entre días mostró que los valores de %DER obtenidos fueron iguales o inferiores a 6,3 y 9,2%, respectivamente, en el método fotométrico, y ligeramente inferiores, 3,4 y 8,8%, respectivamente, en el método fluorimétrico. En lo referente a la selectividad de ambos métodos, estudiada ensayando distintos fármacos de uso veterinario (ketoprofeno, amoxicilina, gentamicina, neomicina, estreptomina, eritromicina, espiromicina, lasalocid, monensin, tilosina, flumequina, tetraciclina y sulfadimetoxina), cabe destacar que ninguno de ellos interfirió en el método fluorimétrico. Sin embargo, utilizando detección fotométrica, se encontró que amoxicilina y tetraciclina interfirieron en la determinación de GEN, aunque ninguno de los fármacos ensayados afectó a la determinación de ASA.

De la comparación de ambos métodos se deduce que el método fluorimétrico presenta mejores características analíticas que el fotométrico: menores LDs y valores de %DER y mayor selectividad. Sin embargo, debido a que la cuantificación de ASA no puede realizarse con detección fluorimétrica, fue necesario el uso de los dos sistemas de detección para la determinación de los cuatro analitos.

En la Tabla V.10 se comparan las características de la metodología propuesta con las de otros métodos cromatográficos previamente descritos para la determinación de ASA y sus metabolitos. Puede observarse que los LDs obtenidos con el nuevo método son, en general, inferiores a los de otros métodos cromatográficos [62 – 68], aunque la mayoría de estas metodologías solo determinan ASA y SAL [62 – 64, 67].

Tabla V.10. Comparación entre métodos cromatográficos

| Análitos                      | Condiciones   | Detección   | Intervalo lineal (ng mL <sup>-1</sup> )                | LD (ng mL <sup>-1</sup> ) | T <sub>R</sub> (min)       | Referencia |
|-------------------------------|---|-------------|--|---------------------------|----------------------------|------------|
| ASA<br>SAL                    | Columna: C18 Acquity UPLC BEH<br>Fase móvil: Dihidrogenofosfato potásico 20mM en H <sub>2</sub> O/MeOH/ACN (70:15:15, v/v/v) pH 2,1                                     | Fotométrica | 15 – 6000  | -                         | 1,87<br>2,64               | [62]       |
| ASA<br>SAL                    | Columna: Zorbax RRHD C18<br>Fase móvil: Tampón fosfato en ACN pH 2,5  | Fotométrica | 200 – 200000   | 170<br>53                 | 1,38<br>2,00               | [63]       |
| ASA<br>SAL                    | Columna: Develosid ODS<br>Fase móvil: MeOH/Ácido ortofosfórico 0,7 mM pH 2,5 (50:50, v/v)   | Fotométrica | 500 – 50000<br>250 – 50000                             | 114<br>38                 | 7,2<br>12,8                | [64]       |
| GEN<br>2,3-DHBA<br>ASA<br>SAL | Columna: Hydrosphere C18<br>Fase móvil: H <sub>2</sub> O/ACN(1000:10) conteniendo 0,2% TFA + H <sub>2</sub> O/ACN(100:900) conteniendo 0,1% TFA en gradiente de elución | Fotométrica | 200 – 20000<br>200 – 20000<br>60 – 20000<br>60 – 20000 | -                         | 13,5<br>15<br>18,5<br>21   | [65]       |
| GEN<br>SAU<br>SAL<br>ASA      | Columna: Bondapak phenyl<br>Fase móvil: MeOH/H <sub>2</sub> O/TEA pH 3,5 (28:71,75:0,25, v/v/v)   | Fotométrica | 500 – 20000<br>50 – 20000<br>100 – 20000<br>50 – 20000 | -                         | 5,5<br>8,6<br>10,1<br>11,6 | [66]       |

ACN: Acetonitrilo, ASA: Ácido acetilsalicílico, GEN: Ácido gentísico, LD: Límite de detección, MeOH: Metanol, MF: Ácido mefenámico, PIR: Piroxicam, SAL: Ácido salicílico, SAU: Ácido salicílico, TEA: Trietilamina, TFA: Ácido trifluoroacético, T<sub>R</sub>: Tiempo de retención.

Tabla V.10. Comparación entre métodos cromatográficos (cont.)

| Análitos                 | Condiciones   | Detección     | Intervalo lineal<br>(ng mL <sup>-1</sup> )         | LD<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | T <sub>R</sub> (min)         | Referencia          |
|--------------------------|---|---------------|--|------------------------------|------------------------------|---------------------|
| ASA<br>SAL               | Columna: ProntoSIL 120 C18 ace-EPS<br>Fase móvil: ACN/Ácido fórmico 10 mM pH2,9<br>(30:70, v/v) | Fluorimétrica | 50 – 20000   | 32,5<br>1,5                  | 3,3<br>5,8                   | [67]                |
| ASA<br>SAL<br>PIR<br>MF  | Columna: ACE® C18<br>Fase móvil: ACN/Ácido ortofosfórico 0,1%<br>en gradiente de elución        | Fluorimétrica | 1,5 – 2500   | 2,5<br>7<br>-<br>-           | 3<br>3,9<br>4,9<br>7,8       | [68]                |
| GEN<br>SAU<br>SAL<br>ASA | Columna: Synchronis C18<br>Fase móvil: ACN/tampón fosfato 3,5 mM,<br>pH 3,5 (26:74, v/v)        | Fotométrica   | 25 – 2500<br>30 – 20000<br>25 – 2000<br>10 – 25000 | 9<br>13<br>12<br>2,2         | 0,71<br>1,12<br>1,34<br>1,61 | Método<br>propuesto |
| GEN<br>SAU<br>SAL        | Columna: Synchronis C18<br>Fase móvil: ACN/tampón fosfato 3,5 mM, pH<br>3,5 (26:74, v/v)        | Fluorimétrica | 0,2 – 2500<br>2,5 – 15000<br>0,2 – 2500            | 0,09<br>1,1<br>0,08          | 0,88<br>1,29<br>1,52         | Método<br>propuesto |

ACN: Acetonitrilo, ASA: Ácido acetilsalicílico, GEN: Ácido gentísico, LD: Límite de detección, MeOH: Metanol, MF: Ácido mefenámico, PIR: Piroxicam, SAL: Ácido salicílico, SAU: Ácido salicílico, TEA: Ácido trifluoroacético, T<sub>R</sub>: Tiempo de retención.

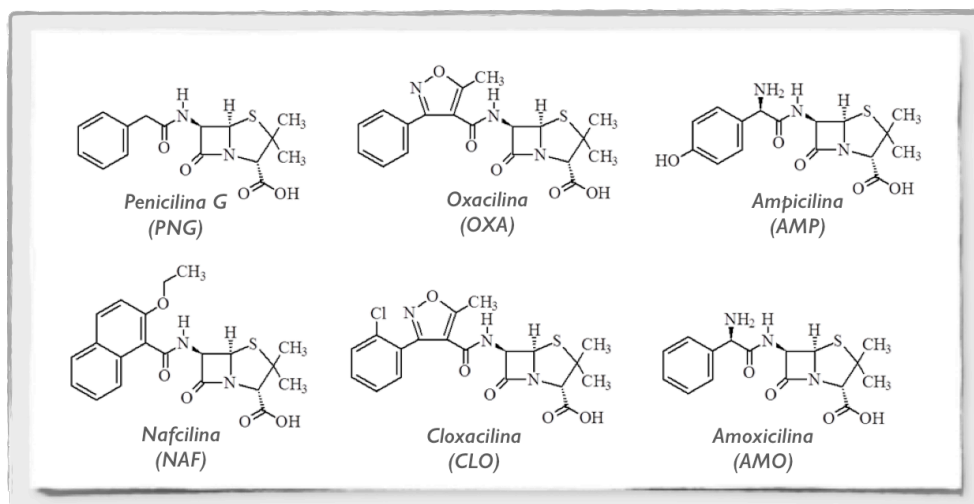


La aplicabilidad del método se demostró mediante el análisis de muestras de orina de bovino, en el que es necesaria una etapa previa de SPE con cartuchos poliméricos para eliminar la matriz de la muestra, su dilución para adecuar la concentración de los analitos al intervalo lineal del método y su filtración antes de introducir los analitos en el sistema cromatográfico. Este tratamiento previo es común para la determinación de salicilatos en muestras de orina [64, 69]. Se evaluó el efecto matriz mediante el estudio de diferentes diluciones de la muestra, encontrando que es mínimo a partir de una dilución 1:500.

Para validar el método se llevó a cabo un estudio de recuperaciones añadiendo tres concentraciones distintas de los analitos a cada muestra, obteniéndose unos valores de recuperación media entre 88,7% y 95,7%. Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad práctica del método desarrollado para el control analítico del uso terapéutico de ASA y SAL en animales destinados al consumo humano.

### ***V.3.2 Determinación de penicilinas de uso veterinario mediante cromatografía de líquidos rápida con derivatización luminiscente post-columna***

Con objeto de ampliar la aplicabilidad de la cromatografía de líquidos rápida al análisis agroalimentario, se ha investigado su utilidad para la separación y determinación de penicilinas, antibióticos muy utilizados como fármacos veterinarios. Con este fin se han seleccionado seis penicilinas de uso veterinario: amoxicilina (AMO), ampicilina (AMP), penicilina G (PNG), oxacilina (OXA), cloxacilina (CLO) y nafcilina (NAF), cuyas estructuras se muestran en la Figura V.9. El estudio realizado ha estado enfocado a disminuir la duración de la separación cromatográfica de estos compuestos y a mejorar su cuantificación utilizando detección luminiscente.



**Figura V.9.** Estructuras químicas de las penicilinas seleccionadas como analitos modelo

Se ha investigado la utilidad de columnas con tecnología “*fused-core*” que contienen partículas con un tamaño medio de 2,7  $\mu\text{m}$  para la separación rápida de los analitos seleccionados. Como se ha mencionado en la Introducción, las partículas están formadas por un núcleo no poroso recubierto por una capa, de unas 0,5  $\mu\text{m}$  de espesor, de NPs esféricas de sílice funcionalizada. Debido al fino espesor de esta capa de NPs, se reducen los fenómenos de difusión de las moléculas en el interior de la columna, lo que permite aumentar el caudal sin pérdida de eficacia en las separaciones cromatográficas. Esta tecnología proporciona separaciones similares a las obtenidas en UHPLC con columnas empaquetadas con partículas de un diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ , pero evita las altas presiones provocadas por estas, permitiendo la utilización de un cromatógrafo convencional. Se ha descrito previamente el uso de una columna similar para la separación de penicilinas y anfenicoles [70], pero los tiempos de retención para penicilinas fueron mayores que los obtenidos con el método descrito en esta Memoria.

La cuantificación de penicilinas en los métodos cromatográficos previamente descritos se realiza normalmente utilizando MS [71-75] o fotometría [70, 75-77]. Para la detección fotométrica suelen utilizarse longitudes de onda menores de 250 nm, debido a la ausencia de grupos cromóforos en las estructuras de estos compuestos, por lo que las medidas analíticas pueden estar interferidas por señales de fondo de la muestra. La detección luminiscente ha sido poco utilizada, pero puede ser una alternativa más selectiva que la detección UV y más económica que MS, aunque requiere una etapa de derivatización post-columna para formar derivados luminiscentes.

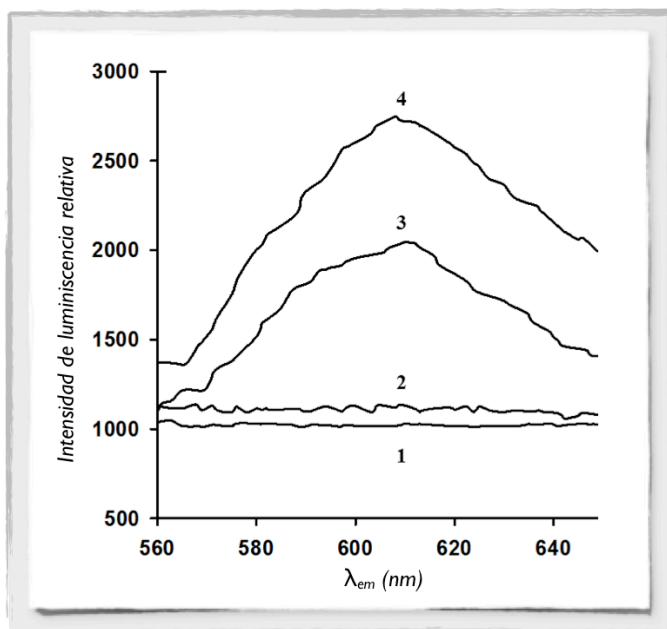
Para buscar nuevos sistemas luminiscentes aplicables a penicilinas, se ha investigado la formación de derivados que emitan a larga longitud de onda, con objeto de evitar posibles interferencias que se puedan producir a menores longitudes de onda. Con este fin se estudió la posible interacción directa de las penicilinas con distintos fluoróforos de larga longitud de onda: azul de toluidina, azul nilo, verde de indocianina y el quelato rutenio(II)-tris-(2,2'-bipiridina)  $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ . Debido a que no se obtuvieron resultados satisfactorios, se investigó la utilización de la forma oxidada del fluoróforo, originada por Ce(IV), ya que se ha descrito previamente el uso del sistema verde de indocianina-Ce(IV) para la determinación del antibiótico aminoglucósido amikacina en suero [78]. Los mejores resultados se obtuvieron con el sistema  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  - Ce(IV), siendo necesario excitarlo a 450 nm, que es la longitud de onda de máxima absorción del quelato  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , para obtener una señal luminiscente adecuada a 610 nm.

El sistema  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  - Ce(IV) ha sido muy utilizado para la determinación quimioluminiscente (QL) de diversos compuestos orgánicos [40, 79], basada en la formación de quelato  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , que es relativamente estable y que interacciona con los analitos, reduciéndose a  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  en el estado excitado y originando una señal luminescente ( $\lambda_{\text{em}}$  610 nm) al volver al estado fundamental, proporcional a la concentración del analito. No obstante, la señal QL obtenida en presencia de

penicilinas fue muy baja, lo que podría atribuirse a la rápida transición del  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  desde el estado excitado al fundamental, pero se consiguió obtener una señal analítica adecuada excitando el sistema a 450 nm.

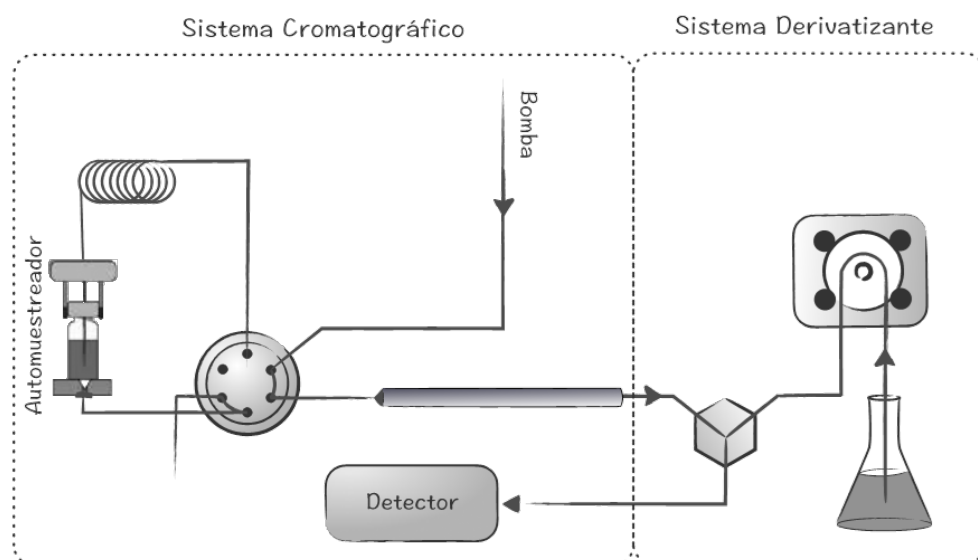
Debido a que previamente se ha descrito que la luminiscencia originada con el sistema  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}\text{-Ce(IV)}$  depende del medio ácido utilizado [80, 81], se estudió la influencia de los ácidos nítrico y sulfúrico en ausencia y en presencia de AMO, utilizando un exceso de  $\text{Ce(IV)}$  para asegurar que todo el quelato de rutenio estaba como  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ . En la Figura V.10 se muestran los espectros de emisión obtenidos excitando a 450 nm, donde puede observarse que no se produce ninguna señal luminiscente en ausencia de AMO, lo que confirma que todo el quelato de rutenio está oxidado. Sin embargo, en presencia de AMO se obtiene la emisión típica a 610 nm del quelato  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , la cual es mayor en presencia de ácido sulfúrico que de ácido nítrico, demostrando en ambos casos la interacción de la penicilina con el quelato de rutenio.

La luminiscencia obtenida podría atribuirse a la oxidación de la penicilina por el  $\text{Ce(IV)}$ , como se ha descrito previamente [82], y la interacción del producto de oxidación con el quelato  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$ , dando lugar al quelato luminiscente  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ . Se han sugerido mecanismos similares para las determinaciones de folatos [83], carbamacepina [84] y quinolonas [80]. Aunque la información sobre la estructura del producto de oxidación de la penicilina es bastante limitada, se ha sugerido la potencial formación de radicales aminoxilo al reaccionar las penicilinas con peróxido de hidrógeno [85].



**Figura V.10.** Espectros de luminiscencia obtenidos para el sistema  $Ru(bpy)_3^{2+}$  -  $Ce(IV)$  en presencia de  $HNO_3$  0,25 M (1, 3) y en presencia de  $H_2SO_4$  0,125 M (2, 4), utilizando una disolución estándar de AMO ( $5000 \text{ ng mL}^{-1}$ ) (3, 4). Blancos (1, 2).  $[Ru(bpy)_3^{2+}] = 20 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[Ce(IV)] = 0,33 \text{ mmol L}^{-1}$ , rendijas = 16 nm

Para realizar la separación cromatográfica de las seis penicilinas se ha utilizado la modalidad de fase reversa mediante gradiente de elución de fase móvil que consiste en una mezcla de ACN y acetato amónico. La etapa de derivatización requiere una bomba peristáltica adicional para establecer el flujo del reactivo derivatizante, conectada entre la salida de la columna y la entrada al detector mediante un mezclador en forma de T. En la Figura V.11 se muestra un esquema del montaje experimental.



**Figura V.11.** Montaje experimental de la separación cromatográfica mediante LC rápida con derivatización post-columna

La oxidación de  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  a  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$  no se consiguió adecuadamente en las condiciones hidrodinámicas del sistema por lo que fue necesario proceder a su oxidación previa, optimizando las condiciones experimentales en las que el reactivo se mantiene estable. Se realizaron diversos ensayos, tales como irradiación con luz ultravioleta y calentamiento, manteniendo la disolución preparada a temperatura constante. La estabilización del reactivo oxidado se consiguió preparándolo 24 horas antes de su utilización y manteniéndolo a  $30^\circ\text{C}$ . El reactivo tenía un color amarillo verdoso pálido y fue estable durante un día.

En la Tabla V.11 se resume el estudio de la optimización del método, incluyendo el intervalo ensayado para cada variable y el valor seleccionado como óptimo.

**Tabla V.11.** Estudio de las variables que afectan al método

|                              | Variable                                  | Intervalo de estudio | Valor óptimo |
|------------------------------|---|----------------------|--------------|
| Separación<br>cromatográfica | $[\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}]$ , mM | 25 – 100             | 50           |
|                              | pH  | 6,0 – 7,5            | 6,7          |
|                              | ACN inicial, %                            | 10 – 40              | 17           |
|                              | Temperatura, °C                           | 20 – 40              | 30           |
|                              | Caudal, mL min <sup>-1</sup>              | 0,4 – 0,65           | 0,6          |
| Reactivo<br>derivatizante    | $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ , μM     | 20 – 80              | 35           |
|                              | $[\text{Ce}(\text{SO}_4)_2]$ , mM         | 0,25 – 1,25          | 0,65         |
|                              | $[\text{H}_2\text{SO}_4]$ , mM            | 25 – 150             | 50           |
|                              | Caudal, mL min <sup>-1</sup>              | 0,4 – 1,4            | 1,2          |
|                              | Longitud tubo, cm                         | 12 – 100             | 25           |

La fase móvil utilizada para la separación cromatográfica fue una mezcla de acetato amónico y ACN. La influencia del pH de la disolución de acetato amónico se evaluó en el intervalo 6 – 7,5, observándose que al aumentar el pH mejoró la separación entre AMO y AMP, mientras que para el resto de los analitos la resolución cromatográfica fue similar, pero aumentaban los tiempos de retención. Se eligió un pH de 6,7 como solución de compromiso con el que se consiguió la correcta separación de AMO y AMP sin aumentar excesivamente el tiempo de análisis.

El porcentaje inicial de ACN es una variable que también afecta a la separación de AMO y AMP, siendo necesario que este porcentaje sea menor del 20%. Sin embargo, la separación de los restantes analitos requirió aumentar este porcentaje hasta un valor del 35%, por lo que fue necesario trabajar en gradiente de

elución. Después de estudiar varios gradientes se seleccionó el siguiente: una primera etapa isocrática al 17% de ACN (0 – 1 min), seguida de un aumento lineal hasta el 35% de ACN (1,5 min), otra etapa isocrática al 35% de ACN (1,5 – 2 min) y, finalmente, vuelta a las condiciones iniciales del 17% de ACN (2,6 min) para reequilibrar la columna. Se seleccionó un caudal de 0,6 mL min<sup>-1</sup> ya que valores superiores causaron un notable aumento de la presión. En lo referente a la temperatura de la columna, cabe indicar que esta variable no afectó significativamente a la separación cromatográfica.

Para la optimización del sistema de derivatización se investigó la influencia de las concentraciones de Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> y de Ce(IV) en las áreas de pico obtenidas para las seis penicilinas. En la Figura V.12 se muestran los resultados obtenidos donde puede observarse que un exceso de ambos reactivos causa un efecto negativo en las señales obtenidas, siendo este comportamiento similar para todos los analitos ensayados. También se estudió la influencia de la concentración de ácido sulfúrico, encontrando que no tuvo un efecto significativo en la reacción de derivatización, pero fue necesario utilizar una concentración 50 mM para estabilizar el reactivo.

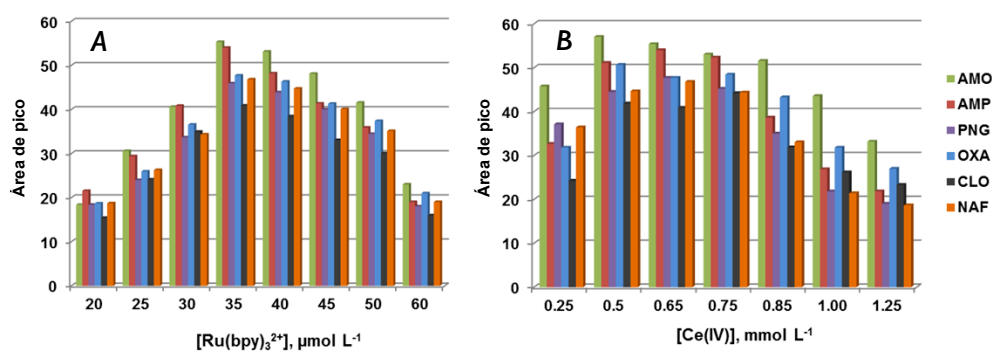


Figura V.12 Influencia de las concentraciones de Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> (1) y de Ce(IV) (2) en las áreas de pico obtenidas para los seis analitos



En lo referente a las condiciones hidrodinámicas del sistema derivatizante, se estudiaron la influencia del caudal y de la longitud del tubo de reacción entre el reactivo derivatizante y los analitos. Se seleccionaron un caudal de  $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ , ya que valores menores originaban picos menos intensos, y una longitud de tubo de 25 cm, debido a que longitudes mayores causaron un aumento en el ancho de banda de los picos, disminuyendo su intensidad. Aunque las áreas de las bandas utilizando tubos más cortos fueron similares a las obtenidas con un tubo de 25 cm, las líneas de base fueron más inestables.

En la Tabla V.12 se resumen las características analíticas del método, obtenidas bajo las condiciones experimentales óptimas, donde puede observarse que los tiempos de retención oscilan entre 1,05 min para AMO y 4,37 min para NAF. Todos los analitos presentan los mismos intervalos dinámicos de calibración, con valores de coeficientes de regresión muy próximos a la unidad, y similares LDs, en el intervalo  $44 - 51 \text{ ng mL}^{-1}$ . Estos valores son comparables a los obtenidos en un método de inyección en flujo con detección luminiscente [86] y a los descritos para AMO y CLO tras su separación mediante cromatografía líquida con una columna "core-shell" con detección UV [70].

La precisión del método se evaluó a dos niveles de concentración para cada analito. Los intervalos de los valores de %DER obtenidos utilizando el área de banda fueron  $2,7 - 6,9\%$  y  $5,6 - 9,8\%$ , en el día y entre días, respectivamente, obteniendo valores muy inferiores, menores de  $0,65\%$  en todos los casos, para los tiempos de retención.

**Tabla V.12.** Parámetros de calibración y límites de detección del método

| Anlito | Tiempo de retención (min) | Intervalo lineal ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Pendiente $\pm$ DE | Ordenada $\pm$ DE | Coefficiente regresión (r) | LD ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) |
|--------|---------------------------|--|--------------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|
| AMO    | 1,05                      | 0,1 - 10                                   | 53,0 $\pm$ 0,2     | 2,3 $\pm$ 0,8     | 0,9997                     | 45                         |
| AMP    | 1,28                      | 0,1 - 10                                   | 47,0 $\pm$ 0,2     | 7,0 $\pm$ 0,7     | 0,9997                     | 45                         |
| PNG    | 3,59                      | 0,1 - 10                                   | 38,2 $\pm$ 0,3     | 7,3 $\pm$ 0,6     | 0,9988                     | 47                         |
| OXA    | 3,95                      | 0,1 - 10                                   | 42,2 $\pm$ 0,3     | 5,6 $\pm$ 0,7     | 0,9995                     | 50                         |
| CLO    | 4,19                      | 0,1 - 10                                   | 35,3 $\pm$ 0,2     | 5,6 $\pm$ 0,6     | 0,9994                     | 51                         |
| NAF    | 4,37                      | 0,1 - 10                                   | 41,1 $\pm$ 0,2     | 5,7 $\pm$ 0,6     | 0,9996                     | 44                         |

Se realizó un exhaustivo estudio de la selectividad del método ensayando antibióticos del grupo de las penicilinas (dicloxacilina, fenoximetilpenicilina y penicilina V) y de otros grupos de antibióticos como cefalosporinas (cefuroxima), aminoglucósidos (gentamicina y estreptomina), macrólidos (eritromicina), quinolonas (norfloxacina y enrofloxacina), tetraciclinas (tetraciclina), ionóforos (tilosina) y sulfonamidas (sulfameracina). Todos estos antibióticos fueron tolerados a niveles de concentración muy superiores a los de los analitos, excepto la penicilina V que sólo fue tolerada en la determinación de OXA cuando la relación de concentraciones interferente-analito fue 1, pero no afectó la determinación de los otros analitos. No obstante, la penicilina V no interferiría en la determinación de OXA en condiciones normales de uso ya que se ha descrito que debe utilizarse al mismo nivel de concentración que OXA [8].

El método se aplicó al análisis de Hipramox®, un preparado farmacéutico que contiene AMO y que se suministra al animal disuelto en agua. El contenido de AMO encontrado en el preparado farmacéutico fue de  $(212 \pm 10)$  mg de AMO por g de muestra. La comparación de este valor con el declarado por el fabricante ( $200 \text{ mg g}^{-1}$ ) demostró que no existían diferencias significativas entre ambos valores para un nivel de confianza del 95%. Se realizó un estudio de recuperación adicionando dos cantidades de AMO a la muestra, obteniendo valores de 95,6 y 98,5%. Se analizaron también muestras de agua de grifo y de pozo, no detectando la presencia de los analitos. El estudio de recuperación aplicado a estas muestras dio valores comprendidos entre 88,6 y 108,5%.

En resumen, el nuevo método presenta dos innovaciones significativas para la determinación cromatográfica de mezclas de penicilinas: 1) la utilización de una columna fused-core que permite la separación de los analitos en menos de 4,5 min utilizando un cromatógrafo convencional, como alternativa a UHPLC, y 2) la utilización de detección luminiscente a longitud de onda relativamente larga, lo que puede mejorar la selectividad de la detección UV. Aunque se requiere una etapa de

derivatización post-columna, la rapidez de la separación contribuye al bajo consumo de reactivos.

#### V.4 VENTAJAS Y LIMITACIONES DE LOS MÉTODOS DESARROLLADOS

Como resumen de las investigaciones descritas en esta Memoria, se relacionan en la Tabla V.13 las principales ventajas y las limitaciones de las metodologías analíticas desarrolladas.

**Tabla V.13.** Ventajas y limitaciones de los métodos propuestos

| Ventajas   | Limitaciones   |
|--|--|
| <b>NUEVOS NANOMATERIALES COMO REACTIVOS ANALÍTICOS LUMINISCENTES</b>   |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> NPs comerciales</li> <li><input type="checkbox"/> Menor coste del ensayo que el basado en el uso de sales de terbio</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Limitada utilidad en medio alcalino</li> </ul>   |
| <b>NUEVAS ESTRATEGIAS EN CROMATOGRAFÍA CON EL USO DE NANOMATERIALES</b>  |  |
| <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Extracción de dos tipos de antibióticos en una misma muestra</li> <li><input type="checkbox"/> Elevada selectividad de la extracción debido a la presencia de iones lantánidos en las MNPS</li> <li><input type="checkbox"/> Bajo consumo de disolventes orgánicos</li> <li><input type="checkbox"/> Fácil separación de los analitos debido a las propiedades magnéticas del nanomaterial híbrido</li> <li><input type="checkbox"/> Tratamiento simultáneo de muestras mediante el uso de un dispositivo multi-imán</li> <li><input type="checkbox"/> Determinación de 6 analitos en menos de 4,5 min con detección fluorimétrica dual</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Necesidad de sintetizar el nanomaterial híbrido</li> <li><input type="checkbox"/> Elución secuencial de los analitos en la etapa de tratamiento</li> </ul> |

| <b>NUEVOS DESARROLLOS EN CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS RÁPIDA CON DETECCIÓN LUMINISCENTE</b>  |  |
|---|--|
| <p><b>Determinación de ácido acetilsalicílico y sus metabolitos mediante UHPLC</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Separación de 4 analitos en menos de 2 min</li> <li><input type="checkbox"/> Disminución de los límites de detección y mejora de la selectividad mediante detección fluorimétrica</li> <li><input type="checkbox"/> La modalidad isocrática no requiere reequilibración de la columna</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Utilización de dos detectores para determinar los 4 analitos</li> </ul>  |
| <p><b>Determinación de penicilinas con derivatización luminiscente post-columna</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Mejores límites de detección que en ausencia de derivatización</li> <li><input type="checkbox"/> Separación de las 6 penicilinas en menos de 4,5 min</li> <li><input type="checkbox"/> Bajo consumo de reactivo derivatizante</li> <li><input type="checkbox"/> Análisis directo de las muestras, sin tratamiento previo</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Necesidad de utilizar una segunda bomba para la derivatización</li> <li><input type="checkbox"/> Ligera dispersión de los picos cromatográficos debido a la etapa de derivatización</li> </ul> |

## REFERENCIAS

- [1] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 131-141.
- [2] A.K. Hagan, T. Zuchner, Lanthanide-based time-resolved luminescence immunoassays, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2847-2864.
- [3] M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Determination of lasalocid with sensitized terbium(III) luminescence detection, *Talanta* 48 (1999) 209-217.
- [4] E.J. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, Fast determination of salicylic acid in pharmaceuticals by using a terbium-sensitized luminescent SIA optosensor, *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 791-797.
- [5] S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Kinetic determination of salicylic acid, diflunisal and their mixture based on lanthanide-sensitized luminescence, *Anal. Chim. Acta* 329 (1996) 135-141.
- [6] C. Focht, H. Campbell, J. Dalgleish, A. DeAtley, S. Eigen, M. Farrow, P. Graham, M. Gramse, J. Henry, P. Kirby, J. Lanthier, R. Larson, B. Lavack, R. Mace, D. Marshall, S. Pleasants, K. Riter, N. Schrier, R. Sensmeier, D. Singh, B. Smith, D. Tripp, B. Wagner, L. Wetzler, S. Williams, Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed-phase liquid chromatography: collaborative study, *J. AOAC Int.* 91 (2008) 479-488.
- [7] Technical sheet of AVATEC 150 g product. Alpha, inc., <http://alpha.com>, March 19, 2004.
- [8] Commission Regulation EU No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding

- maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off. J. of the Eur. Union*, L15 (2010) 1-72.
- [9] Y. Wen, L. Chen, J. Li, D. Liu, L. Chen, Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 26-41.
- [10] J. Tian, J. Xu, F. Zhu, T. Lu, C. Su, G. Ouyang, Application of nanomaterials in sample preparation, *J. Chromatogr. A* 1300 (2013) 2-16.
- [11] B. Socas-Rodríguez, A.V. Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, Recent applications of carbon nanotube sorbents in analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1357 (2014) 110-146.
- [12] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena, Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34-43.
- [13] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Creciente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta*, 892 (2015) 10-26.
- [14] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50-58.
- [15] B.H. Fumes, M.R. Silva, F.N. Andrade, C.E.D. Nazario, F.M. Lanças, Recent advances and future trends in new materials for sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 9-25.
- [16] R. Sitko, B. Zawisza, E. Malicka, Graphene as a new sorbent in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 33-43.

- [17] A. Spietelun, L. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1321 (2013) 1-13.
- [18] M. Moradi, Y. Yamini, Surfactant roles in modern simple preparation techniques: A review, *J. Sep. Sci.* 35 (2012), 2319-2340.
- [19] X.S. Li, G.T. Zhu, Y.B. Luo, B.F. Yuan, Y.Q. Feng, Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 233-247.
- [20] A.H. Duan, S.M. Xie, L.M. Yuan, Nanoparticles as stationary and pseudo-stationary phases in chromatographic and electrochromatographic separations, *Trends Anal. Chem.* 30 (2011) 484-491.
- [21] E. Guihen, Nanoparticles in modern separation science, *Trends Anal. Chem.* 46 (2013) 1-14.
- [22] J. Krenkova, F. Foret, F. Svec, Less common applications of monoliths: V. Monolithic scaffolds modified with nanostructures for chromatographic separations and tissue engineering, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 1266-1283.
- [23] Q. Li, D. Yuan, Evaluation of multi-walled carbon nanotubes as gas chromatographic column packing, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 203-209.
- [24] L. Zhao, P. Ai, A.H. Duan, L.M. Yuan, Single-walled carbon nanotubes for improved enantioseparations on a chiral ionic liquid stationary phase in GC, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 143-147.
- [25] E.P. Nesterenko, P.N. Nesterenko, D. Connolly, X. He, P. Floris, E. Duffy, B. Paull, Nano-particle modified stationary phases for high-performance liquid chromatography, *Analyst* 138 (2013) 4229-4254.



- [26] S. Tong, S. Liu, H. Wang, Q. Jia, Recent advances of polymer monolithic columns functionalized with micro/nanomaterials: synthesis and application, *Chromatographia* 77 (2014) 5–14.
- [27] S. Tang, Y. Guo, C. Xiong, S. Liu, X. Liua, S. Jiang, Nanoparticle-based monoliths for chromatographic separations, *Analyst* 139 (2014) 4103-4117.
- [28] W.J. Cheong, F. Ali, J.H. Choi, J.O. Lee, K.Y. Sung, Recent applications of molecular imprinted polymers for enantio-selective recognition, *Talanta* 106 (2013) 45-59.
- [29] X. Dong, R. Wu, J. Dong, M. Wu, Y. Zhu, H. Zou, Recent progress of polar stationary phases in CEC and capillary liquid chromatography, *Electrophoresis* 30 (2009) 141-154.
- [30] D. Connolly, S. Currivan, B. Paull, Polymeric monolithic materials modified with nanoparticles for separation and detection of biomolecules: A review, *Proteomics* 12 (2012) 2904-2917.
- [31] M. Zhang, H. Qiu, Progress in stationary phases modified with carbonaceous nanomaterials for high-performance liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 65 (2015) 107-121.
- [32] C. Andre, R. Aljhani, T. Gharbi, Y.C. Guillaume, Incorporation of carbon nanotubes in a silica HPLC column to enhance the chromatographic separation of peptides: Theoretical and practical aspects, *J. Sep. Sci* 34 (2011) 1221-1227.
- [33] A. Speltini, D. Merli, D. Dondi, C. Milanese, P. Galinetto, C. Bozzetti, A. Profumo, Radiation-induced grafting of carbon nanotubes on HPLC silica microspheres: theoretical and practical aspects, *Analyst* 138 (2013) 3778-3785.

- [34] S. Sandron, B. Paull, P.N. Nesterenko, Investigation on selectivity of mercaptopropylsilica and silver nanoparticles-functionalised mercaptopropylsilica, *Curr. Chromatogr.* 2 (2015) 122-135.
- [35] C. André, G. Lenancker, Y.C. Guillaume, Non-covalent functionalisation of monolithic silica for the development of carbon nanotube HPLC stationary phases, *Talanta* 99 (2012) 580-585.
- [36] A. Aqel, K. Yusuf, Z.A. Al-Othman, A.Y. Badjah-Hadj-Ahmed, A.A. Alwarthan, Effect of multi-walled carbon nanotubes incorporation into benzyl methacrylate monolithic columns in capillary liquid chromatography, *Analyst* 137 (2012) 4309-4317.
- [37] C.K. Zacharis, P.D. Tzanavaras, Liquid chromatography coupled to on-line post column derivatization for the determination of organic compounds: A review on instrumentation and chemistries, *Anal. Chim. Acta* 798 (2013) 1-24.
- [38] Y. Zu, Molecular and nanoparticle postcolumn reagents for assay of low-molecular-mass biothiols using high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3358-3365.
- [39] N. Li, D. Liu, H. Cui, Metal-nanoparticle-involved chemiluminescence and its applications in bioassays, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5561-5571.
- [40] J.F. Huertas-Pérez, D. Moreno-González, D. Airado-Rodríguez, F.J. Lara, A.M. García-Campaña, Advances in the application of chemiluminescence detection in liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 75 (2016) 35-48.
- [41] K. Charoenkitamorn, O. Chailapakul, W. Siangproh, Development of gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode for the analysis of

- thiram, disulfiram and their derivative in food using ultra-high performance liquid chromatography, *Talanta* 132 (2015) 416-423.
- [42] A. Dago, J. Navarro, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Carbon nanotubes and graphene modified screen-printed carbon electrodes as sensitive sensors for the determination of phytochelatin in plants using liquid chromatography with amperometric detection, *J. Chromatogr. A* 1409 (2015) 210-217.
- [43] M. Gao, H. Wang, M. Ma, Y. Zhang, X. Yin, R.A. Dahlgren, D. Du, X. Wang, Optimization of a phase separation based magnetic-stirring salt-induced liquid-liquid microextraction method for determination of fluoroquinolones in food, *Food Chem.* 175 (2015) 181-188.
- [44] J. He, M. Huang, D. Wang, Z. Zhang, G. Li, Magnetic separation techniques in sample preparation for biological analysis: a review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 101 (2014) 84-101.
- [45] R. Gao, X. Cui, Y. Hao, L. Zhang, D. Liu, Y. Tang, A highly-efficient imprinted magnetic nanoparticle for selective separation and detection of 17 $\beta$ -estradiol in milk, *Food Chem.* 194 (2016) 1040-1047.
- [46] S. Ma, M. He, B. Chen, W. Deng, Q. Zheng, B. Hu, Magnetic solid phase extraction coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry for the speciation of mercury in environmental water and human hair samples, *Talanta* 146 (2016) 93-99.
- [47] H.B. He, C. Dong, B. Li, J.P. Dong, T.Y. Bo, T.L. Wang, Q.W. Yu, Y.Q. Feng, Fabrication of enrofloxacin imprinted organic-inorganic hybrid mesoporous sorbent from nanomagnetic polyhedral oligomeric silsesquioxanes for the selective extraction of fluoroquinolones in milk samples, *J. Chromatogr. A*, 1361 (2014) 23 – 33.

- [48] L. Wang, Q. Yuan, G. Liang, L. Shi, Q. Zhan, Magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the extraction and rapid determination of six fluoroquinolones in environmental water samples, *J. Sep. Sci.* 38 (2015) 996 – 1001.
- [49] L. Norambuena, N. Gras, S. Contreras, Development and validation of a method for the simultaneous extraction and separate measurement of oxytetracycline, florfenicol, oxolinic acid and flumequine from marine sediments, *Marine Pollut. Bull.* 73 (2011) 154 – 160.
- [50] H. Zang, S. Chen, Y. Lu, Z. Dai, Simultaneous determination of quinolones in fish by liquid chromatography coupled with fluorescence detection: Comparison of sub-2  $\mu\text{m}$  particles and conventional C18 columns, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 1959 – 1967.
- [51] J. Blesa, L.J.G. Silva, C.M. Lino, G. Font, A. Pena, Comparison of three solid-phase extraction processes in quantification of ciprofloxacin and enrofloxacin in pork meat. *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 832-838.
- [52] I. Jiménez-Díaz, M.P. Hermo, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, D. Barrón, J. Barbosa, A. Navalón, Comparison of three analytical methods for the determination of quinolones in pig muscle samples, *Chromatographia*, 76 (2013) 707-713.
- [53] P. Izquierdo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, Study of the Eu(III)—tetracycline—thenoyltrifluoroacetone system by using the stopped-flow mixing technique: Determination of tetracycline in serum, *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 133 – 139.
- [54] Z.Y. Ma, D. Dosev, M. Nichkova, S.J. Gee, B.D. Hammock, I.M. Kennedy, Synthesis and bio-functionalization of multifunctional magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Y_2\text{O}_3:\text{Eu}$  nanocomposites, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 4695-4700.

- [55] A.L. Pena, C.M. Lino, M.I.N. Silveira, Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection, *J. AOAC Int.* 5 (2003) 925-929.
- [56] N. Arroyo-Manzanares, J.F. Huertas-Pérez, M. Lombardo-Agüí, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, A high-throughput method for the determination of quinolones in different matrices by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Anal. Methods* 7 (2015) 253 – 259.
- [57] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of European Communities*, L 221 (2002) 8 – 36.
- [58] D.G. Rocha, F.A. Santos, J.C. da Silva, R. Augusti, A.F. Faria, Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1379 (2015) 83-91.
- [59] C.R. Short, L.C. Hsieh, M.S. Marlborough, S.A. Barker, C.A. Neff-Davis, L.E. Davis, G. Koritz, R.F. Bevell, Elimination of salicylic acid in goats and cattle, *Am. J. Vet. Res.* 51 (1990) 1267–1270.
- [60] S.K. Bae, K.A. Seo, E.J. Jung, H.S. Kim, C.W. Yeo, J.H. Shon, K.M. Park, K.H. Liu, J.G. Shin, Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolite, salicylic acid, in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study of Astrix® in Korean healthy volunteers, *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) 590 – 595.

- [61] X. Xu, L. Koetzner, J. Boulet, H. Maselli, J. Beyenhof, G. Grover, Rapid and sensitive determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetic study, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 973 – 979.
- [62] C. Gosh, A. Upadhyay, A. Singh, S. Bahadur, P. Jain, B.S. Chakraborty, Simultaneous determination of aspirin and its metabolite from human plasma by UPLC-UV detection: Application to pharmacokinetic study, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 34 (2011) 2326 – 2338.
- [63] P. Rubak, T.F. Hardlei, M. Würtz, S.D. Kristensen, A.M. Hvas, Low-dose acetylsalicylic acid therapy monitored with ultra high performance liquid chromatography, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 988 – 992.
- [64] Y. Ohwaki, T. Yamane, T. Ishimatsu, M. Wada, K. Nakashima, Semi-micro column high-performance liquid chromatography with UV detection for quantification of aspirin and salicylic acid and its application to patients' sera administered with low-dose enteric-coated aspirin, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 221 – 224.
- [65] E. Yamamoto, S. Takakuwa, T. Kato, N. Asakawa, Sensitive determination of aspirin and its metabolites in plasma by LC-UV using on-line solid-phase extraction with methycellulose-immobilized anion-exchange restricted access media. *J. Chromatogr. B* 846 (2007) 132–138.
- [66] J. Shen, S. Wanwimolruk, C.R. Clark, M.S. Roberts, A sensitive assay for aspirin and its metabolites using reversed-phase ion-pair high- performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 13 (1990) 751–761.
- [67] E.L. Hobl, B. Jilma, J. Ebner, R.W. Schmid, Simultaneous determination of acetylsalicylic acid and salicylic acid in human plasma by isocratic high-

- pressure liquid chromatography with post-column hydrolysis and fluorescence detection, *Biomed. Chromatogr.* 27 (2013) 695 – 698.
- [68] H. Ibrahim, A. Boyer, J. Bouajila, F. Couderc, F. Nepve, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection, *J. Chromatogr. B* 857 (2007) 59 – 66.
- [69] S. Magiera, S. Gülmez, A. Michalik, I. Baranowska, Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1304 (2013) 1-9.
- [70] V.F. Samanidou, E.G. Karageorgou, On the use of Kinetex™-C18 core shell 2.6 µm stationary phase to the multiclass determination of antibiotics, *Drug Test. Analysis* 3 (2011) 234 – 244.
- [71] L. Tong, Y.X. Wang, M.P. Hermo, D. Barrón, J. Barbosa, Simultaneous determination and toxicological assessment of penicillins in different water matrices, *Ecotoxicology* 23 (2014) 2005 – 2013.
- [72] R. Cazorla-Reyes, R. Romero-González, A. Garrido-Frenich, M.A. Rodríguez-Maresca, J.L. Martínez-Vidal, Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 89 (2014) 203 – 212.
- [73] O.J. Pozo, C. Guerrero, J.V. Sancho, M. Ibáñez, E. Pitarch, E. Hogendoorn, F. Hernández, Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 83 – 93.

- [74] C.P. Rezende, M.P. Almeida, R.B. Brito, C.K. Nonaka, M.O. Leite, Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of  $\beta$ -lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle, *Food Addit. Cont. A* 29 (2012) 541 – 549.
- [75] F.J. Lara, M. del Olmo-Iruela, C. Cruces-Blanco, C. Quesada-Molina, A.M. García-Campaña, Advances in the determination of  $\beta$ -lactam antibiotics by liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.* 38 (2012) 52 – 66.
- [76] M. Cámara, A. Gallego-Picó, R.M. Garcimuño, P. Fernández-Hernando, J.S. Durand-Alegría, P.J. Sánchez, An HPLC-DAD method for the simultaneous determination of nine  $\beta$ -lactam antibiotics in ewe milk, *Food Chem.* 141 (2013) 829 – 834.
- [77] E.G. Karageorgou, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, Ultrasound-assisted matrix solid phase dispersive extraction for the simultaneous analysis of  $\beta$ -lactams (four penicillins and eight cephalosporins) in milk by high performance liquid chromatography with photodiode array detection, *J. Sep. Sci.* 35 (2012) 2599 – 2607.
- [78] M.L. Sánchez-Martínez, M.P. Aguilar-Caballeros, A. Gómez-Hens, Selective kinetic determination of amikacin in serum using long-wavelength fluorimetry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 1021 – 1027.
- [79] L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, J.F. Huertas-Pérez, F.J. Lara, Chemiluminescence detection in liquid chromatography: applications to clinical, pharmaceutical, environmental and food analysis--a review, *Anal. Chim. Acta* 640 (2009) 7 – 28.
- [80] C.H. Wan, H. Cui, Y.L. Pan, P. Zheng, L.J. Liu, Determination of quinolone residues in prawn using high-performance liquid chromatography with Ce(IV)- Ru(bipy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>-HNO<sub>3</sub> detection, *J. Chromatogr. B* 843 (2006) 1 – 9.



- [81] B.A. Gorman, K.F. Lin, C.F. Hogan, N.W. Barnett, Effect of oxidant type on the chemiluminescence intensity from the reaction of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) with various organic acids, *Talanta* 72 (2007) 568 – 574.
- [82] A.F.M.E. Walily, A.A.K. Gazy, S.F. Belal, E.F. Khamis, Use of cerium(IV) in the spectrophotometric and spectrofluorimetric determinations of penicillins and cephalosporins in their pharmaceutical preparations, *Spectrosc. Lett.* 33 (2000) 931-948.
- [83] R. Ikeda, K. Ichiyama, N. Tabuchi, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima, Determination of folates by HPLC-chemiluminescence using a ruthenium(II)-cerium(IV) system, and its application to pharmaceutical preparations and supplements, *Luminescence* 29 (2014) 824 – 830.
- [84] X.Y. Long, F.N. Chen, Determination of carbamazepine in human urine and serum samples by high-performance liquid chromatography with post-column  $\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}$ - $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  chemiluminescence detection, *Luminescence* 28 (2013) 211 – 216.
- [85] C. Lagercrantz, Formation of aminoxyl radicals in the reaction between penicillins and hydrogen peroxide, *Free Radical Bio. Med.* 13 (1992) 455-457.
- [86] L. Ma, W.J. Kang, X.D. Xu, L.M. Niu, H.M. Shi, S. Li, Flow-injection chemiluminescence determination of penicillin antibiotics in drugs and human urine using luminol-Ag(III) complex system, *J. Anal. Chem.* 3 (2012) 219 – 225.







# CONCLUSIONES





**E**n la Memoria presentada se han propuesto diversas metodologías analíticas rápidas, basadas en el uso de nanomateriales y/o cromatografía de líquidos, para la determinación de especies de interés agroalimentario, con el fin de mejorar algunas prestaciones de los métodos convencionales, principalmente su rapidez y sensibilidad. A continuación, se resumen las conclusiones más relevantes de las investigaciones realizadas:

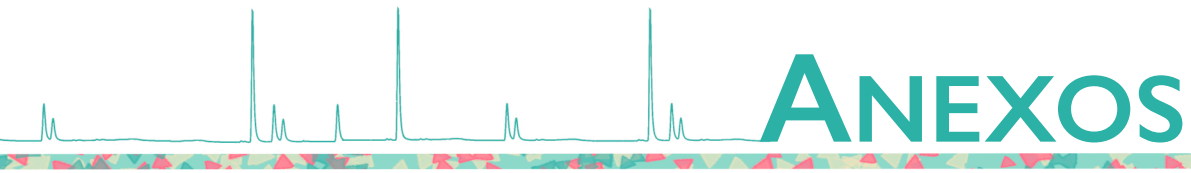
- ✓ Se ha demostrado la utilidad de las nanopartículas de óxido de terbio como nuevos reactivos analíticos luminiscentes, alternativos a otros reactivos convencionales para la determinación de ácido salicílico y lasalocid. Las características analíticas de los métodos desarrollados se han comparado con las obtenidas utilizando iones terbio(III) en disolución.
  
- ✓ Se ha sintetizado y caracterizado un nuevo nanomaterial híbrido formado por nanopartículas magnéticas recubiertas con iones terbio(III) y europio(III), el cual se ha aplicado a la separación selectiva de quinolonas y tetraciclinas mediante extracción en fase sólida magnética. Este tratamiento se ha utilizado como etapa previa a la determinación de estos antibióticos mediante un nuevo método, basado en el uso de cromatografía de líquidos ultra-rápida, que permite la separación de los analitos en menos de 5 min.

- ✓ Se ha establecido un método para la determinación de ácido acetilsalicílico y sus principales metabolitos mediante cromatografía de líquidos ultra-rápida, en el que se consigue la separación en menos de 2 min. El uso conjunto de detectores fotométrico y fluorimétrico permite la cuantificación simultánea del ácido acetilsalicílico, que carece de propiedades fluorescentes, y de sus metabolitos, que tienen fluorescencia nativa. El método presenta mejores límites de detección que los obtenidos en métodos previamente descritos para estos compuestos utilizando detección fotométrica o fluorimétrica.
  
- ✓ Se ha desarrollado un método cromatográfico para la determinación de seis penicilinas de uso veterinario en el que la separación se realiza en menos de 5 min mediante una columna con tecnología fused-core en un cromatógrafo de líquidos convencional. Para la cuantificación de los analitos se ha utilizado detección luminiscente acoplado un sistema de derivatización post-columna basado en un quelato de rutenio y cerio(IV), que permite realizar las medidas a larga longitud de onda.
  
- ✓ Se ha demostrado la utilidad analítica de los métodos desarrollados mediante su aplicación al análisis de muestras de interés en agroalimentación.
  
- ✓ Además del trabajo experimental desarrollado, se ha realizado una revisión bibliográfica en la que se demuestra la utilidad de la Nanotecnología en las tres etapas básicas del proceso cromatográfico: tratamiento de muestra, separación cromatográfica y derivatización/detección.





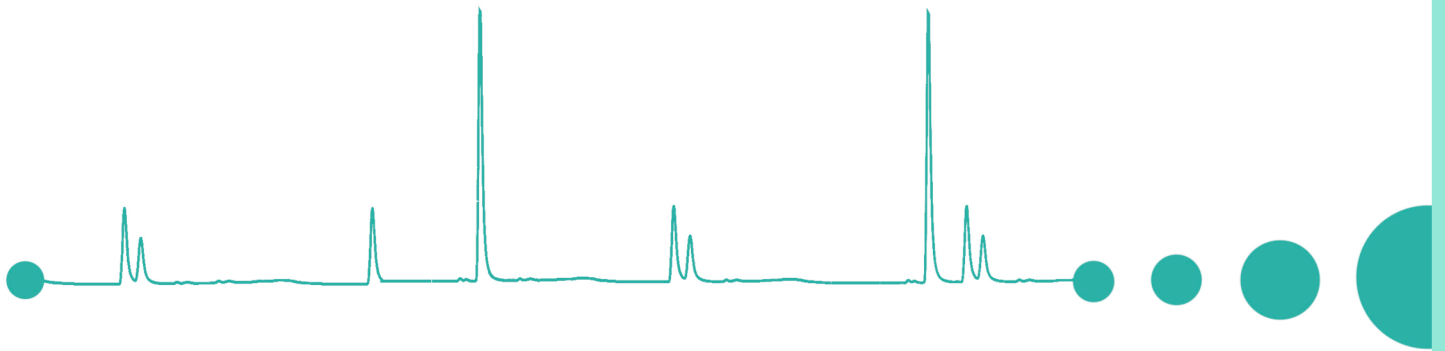




**ANEXOS**





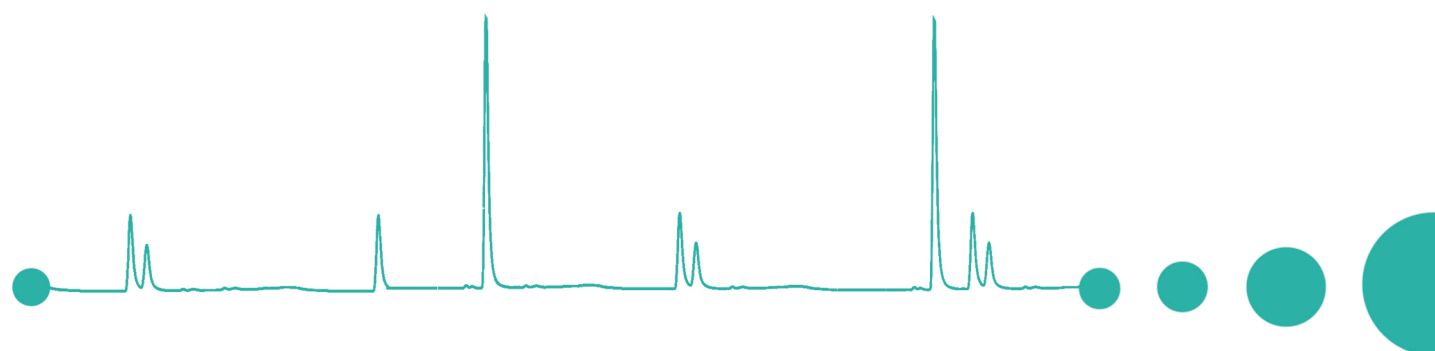


***ANEXO A: Producción Científica  
derivada de la Tesis Doctoral***



- I. **“Application of  $Tb_4O_7$  nanoparticles for lasalocid and salicylate determination in food analysis”**  
M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 2012, 60, 11741-11747
  
- II. **“Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography”**  
M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens  
Journal of Chromatography B 2015, 985, 85-90
  
- III. **“A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples”**  
M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens  
Journal of Chromatography A 2015, 1425, 73-80
  
- IV. **“Nanomaterials as tools in chromatographic methods”**  
M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens  
Trends in analytical chemistry 2016, 82, 385-393
  
- V. **“Determination of veterinary penicillin antibiotics by fast liquid chromatography and luminescence detection”**  
M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens  
Analytical and bioanalytical chemistry, enviado, octubre 2016





## ***ANEXO B: Presentación de comunicaciones a congresos***





**Póster** “Comparative study of the sensitized luminescence of terbium (III) ions and  $Tb_4O_2$  nanoparticles as derivatising reagents in ultrafast liquid chromatography”

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

12th International Conference on Methods and Applications of Fluorescence

Strasbourg (France). Septiembre 2011

**Póster** “Aplicación de nanopartículas de  $Tb_4O_2$  para la determinación de lasalocid y salicilato en muestras de alimentos”

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

Nanouco IV: Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de Investigadores Andaluces.

Córdoba (España). Febrero 2013

**Comunicación oral** “Nuevas metodologías analíticas rápidas con detección luminiscente en análisis agroalimentario”

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

II Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación de la eidA3.

Córdoba (España). Abril 2013

**Póster** “Determination of acetylsalicylic acid and its major metabolites in bovine urine using ultra performance liquid chromatography”

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

XIV Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica.

Baeza (España). Junio 2014

**Comunicación oral** “Usefulness of a new  $Fe_3O_4:Eu,Tb$  nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction for antibiotic determination in meat samples”

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

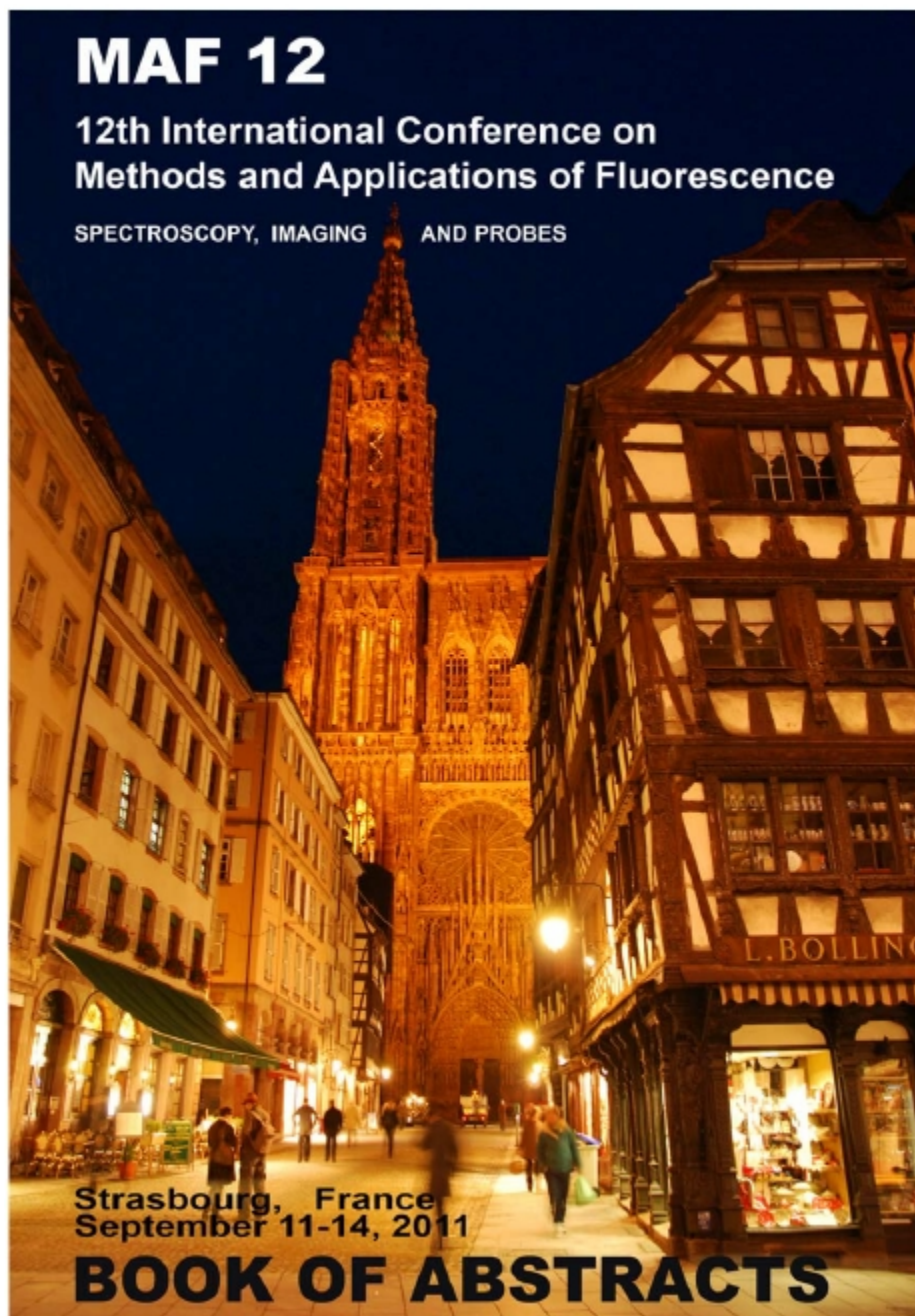
Nanouco V: Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología de Investigadores Andaluces.

Córdoba (España). Febrero 2015

**Póster** “Dispersive solid-phase extraction with a new  $Fe_3O_4:Eu,Tb$  nanocomposite as sorbent for antibiotic determination”

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

ImageNano 2015 .Bilbao (España). Marzo 2015





P70

Polymers, Materials &amp; Nanomaterials, Quantum Dots

Poster 70

### Comparative study of the sensitized luminescence of terbium(III) ions and $Tb_4O_7$ nanoparticles as derivatising reagents in ultrafast liquid chromatography

M.L. Castillo-García<sup>1</sup>, M.P. Aguilar-Caballós<sup>1</sup> & A. Gómez-Hens<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry (IAQFN), Campus of Rabanales. Marie Curie Building (Annex). University of Cordoba. 14071-Cordoba, Spain

Terbium-sensitized luminescence is a useful option to improve the sensitivity and spectral selectivity compared to some conventional chromatographic approaches described for this purpose. Terbium(III) ions have been previously described to achieve the luminescent detection of several organic compounds, such as aromatic aldehydes and ketones, carboxylic compounds and nucleotides, among others, using LC columns with conventional particle sizes [1]. The use of  $Tb_4O_7$  nanoparticles as luminescent reagents has been scarcely reported up to date, so a systematic study in order to demonstrate their usefulness as analytical reagents is desirable. Two structurally related compounds, the ionophore antibiotic lasalocid and the antimicrobial salicylic acid, have been chosen as model analytes. The influence of different physicochemical variables, such as reagent concentration, the use of synergetic agents and surfactants, has been assayed for both analytes using  $Tb_4O_7$  and terbium(III) ions for comparative purposes.

Preliminary studies performed in order to couple the luminescence detection system with ultrafast liquid chromatography have shown that pre-column derivatization is the most suitable option to achieve the long-wavelength luminescence detection of these analytes. The usefulness of either terbium(III) ions or  $Tb_4O_7$  nanoparticles depends on the analyte structure and the experimental conditions assayed.

**References:** [1] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballós, Trends Anal. Chem., 21 (2002) 131.

\*Corresponding author: e-mail: qa1gohea@uco.es



**LIBRO DE RESÚMENES**

**NANOUCO IV**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces



**Córdoba, 7 y 8 de Febrero 2013**





## P46-NA

### APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE $Tb_4O_7$ PARA LA DETERMINACIÓN DE LASALOCID Y SALICILATO EN MUESTRAS DE ALIMENTOS

**María Luisa Castillo-García, María Paz Aguilar Caballos, Agustina Gómez-Hens**

*Departamento de Química Analítica, Instituto de Química Fina y Nanoquímica, Campus de Rabanales.*

*Anexo al Edificio Marie Curie, Universidad de Córdoba, 14071-Córdoba, España.*

*Teléfono: 34-957218645, Fax. 34-957218644*

*e-mail: [ga1gohea@uco.es](mailto:ga1gohea@uco.es), web: <http://www.uco.es/investiga/grupos/FQM-303>*

Se ha investigado por primera vez la utilidad de nanopartículas (NPs) de  $Tb_4O_7$  como reactivo analítico, usando luminiscencia sensibilizada como sistema de detección, y se han comparado los resultados con los obtenidos utilizando iones  $Tb(III)$ . El estudio se ha realizado eligiendo lasalocid (LAS) y salicilato (SAL) como analitos modelo. Ambos compuestos, cuya estructura se muestra en la Figura 1, son utilizados como medicamentos de uso veterinario.

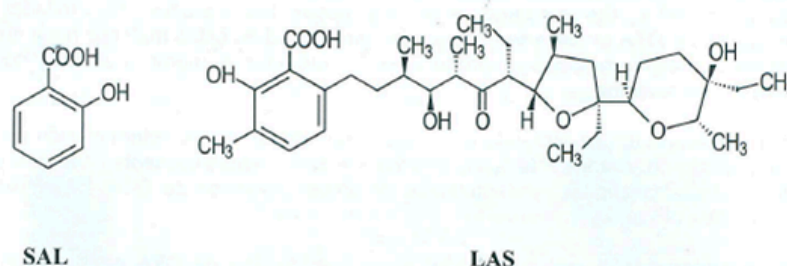


Figura 1. Estructuras químicas de los analitos seleccionados

Las condiciones experimentales de los cuatro sistemas estudiados: LAS-NPs  $Tb_4O_7$ , LAS- $Tb(III)$ , SAL-NPs  $Tb_4O_7$  y SAL- $Tb(III)$  se han optimizado y se han obtenido sus características analíticas. Los límites de detección alcanzados para LAS y SAL con NPs  $Tb_4O_7$  son comparables a los obtenidos utilizando  $Tb(III)$ , mientras que el uso de las NPs permitió obtener en todos los casos mejores valores de precisión.

La utilidad analítica de estas NPs como reactivos luminiscentes se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de LAS en agua de grifo, pre-mezcla de pienso para aves y muestras de huevo, en las que se han obtenido unas recuperaciones en un intervalo de 80,0-105,0 %. El tratamiento de muestra utilizado en cada caso depende de la complejidad de la matriz. La elevada sensibilidad y selectividad del método propuesto permite su aplicación directa al análisis de agua de grifo, la utilización de una sencilla etapa de extracción para las muestras de piensos pre-mezclados para animales y la realización de una etapa de extracción y otra etapa rápida de limpieza mediante SPE en el caso de las muestras de huevo.



El Coordinador Académico del Campus de Excelencia Internacional en Agroalimentación y Coordinador de la eidA3

**ACREDITA** que:

**MARÍA LUISA CASTILLO GARCÍA**

ha presentado la **comunicación oral** que lleva por título :

**“NUEVAS METODOLOGÍAS ANALÍTICAS RÁPIDAS CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN ANÁLISIS AGROALIMENTARIO”**

en el **II Congreso Científico de Investigadores en Formación en Agroalimentación de la eidA3** celebrado en Córdoba los días 9 y 10 de abril de 2013.

Y para que así conste, se expide y firma este certificado en

Córdoba, a 10 de abril de 2013



**Fdo: JOSE CARLOS GÓMEZ VILLAMANDOS**

**Coordinador Académico ceiA3**

**Coordinador eidA3**

Rectorado de la Universidad de Córdoba – Avd. Medina Azahara 5, 14071 CÓRDOBA



### ***Nuevas metodologías analíticas rápidas con detección luminiscente en análisis agroalimentario***

Se ha investigado por primera vez la utilidad de nanopartículas (NPs) de  $Tb_4O_7$  como reactivo analítico, usando luminiscencia sensibilizada como sistema de detección, y se han comparado los resultados con los obtenidos utilizando iones  $Tb(III)$ . El estudio se ha realizado eligiendo lasalocid (LAS) y salicilato (SAL) como analitos modelo. Ambos compuestos son utilizados como medicamentos de uso veterinario. Las condiciones experimentales de los cuatro sistemas estudiados se han optimizado y se han obtenido sus características analíticas. La utilidad analítica de estas NPs como reactivos luminiscentes se ha puesto de manifiesto mediante la determinación de LAS en agua de grifo, pre-mezcla de pienso para aves y muestras de huevo, en las que se han obtenido unas recuperaciones en un intervalo de 80,0-105,0 %. El tratamiento de muestra utilizado en cada caso depende de la complejidad de la matriz.

Se ha desarrollado un método para la determinación de ácido acetilsalicílico (ASA) y sus principales metabolitos en orina (los ácidos genticónico (GEN), salicílico (SAL) y salicílico (SLC)) mediante cromatografía de líquidos ultrarrápida (UPLC) con detección uv y fluorimétrica. La separación se realiza en modo isocrático con una composición de fase móvil ACN: fosfato (3,5 mM, pH 3,5) 26:74, con un caudal de 0.63 mL/min e inyectando 8  $\mu$ L de muestra. Con estas condiciones experimentales se consigue la separación de estos cuatro compuestos en menos de 2 minutos, lo que dota al método de una velocidad de muestreo muy adecuada para su uso en análisis de rutina. El método se ha aplicado a la determinación de estos compuestos en orina animal tras una etapa sencilla de extracción en fase sólida con sorbentes poliméricos para la limpieza de la muestra, su posterior dilución para adecuar los niveles de concentración a los intervalos dinámicos de trabajo.





**XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL  
ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA**



**BAEZA, 26 y 27 junio 2014**



GRUPO REGIONAL ANDALUZ  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA



QUÍMICA ANALÍTICA DE LA  
UNIVERSIDAD DE JAÉN  
FQM-323



XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA

Baeza, 26-27 junio 2014



BIO-03

**DETERMINATION OF ACETYLSALICYLIC ACID AND ITS METABOLITES IN BOVINE URINE USING ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY**

**María Luisa Castillo-García, María Paz Aguilar-Caballos, Agustina Gómez-Hens**

Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Cordoba, Campus Universitario de Rabanales, 14071-Córdoba, e-mail: qa1gohea@uco.es

A new method based on ultra high performance liquid chromatography with photometric and fluorimetric detection for the determination of acetylsalicylic acid and its main metabolites, namely gentisic, salicylic and salicyluric acids, in bovine urine samples is reported. Photometric detection of acetylsalicylic acid was performed at 240 nm, whereas fluorescence detection was used to monitor the native fluorescence of the three main metabolites using a programmable wavelength fluorescence detection system, with  $\lambda_{ex}$  320 nm  $\lambda_{em}$  444 nm from 0 to 1.14 min, and  $\lambda_{ex}$  295 nm  $\lambda_{em}$  410 nm from 1.15 to 3 min. The temperature was kept at 40°C in the column oven. The separation was performed under isocratic conditions, using acetonitrile – 3.5 mM phosphate solution (pH 3.5) (26:74, v/v) at 0.63 mL/min as the mobile phase. The injected volume was 8  $\mu$ L. Under these conditions, the retention times of the four compounds determined were lower than 2 min, which are shorter than those achieved using conventional HPLC [1,2]. Under the optimum separation conditions, the dynamic ranges and LODs (ng mL<sup>-1</sup>) were: 0.2 – 2500, 0.09 for gentisic acid; 0.1-2500, 0.08 for salicylic acid and 2.5 – 15000, 1.1 for salicyluric acid, using fluorescence detection. These values were 10 – 25000, 2.2 for acetylsalicylic acid, using UV detection. Intra-day and inter-day precision data were assessed at two levels of concentration of each analyte using both detection systems. The selectivity of the method was checked by assaying different drugs of veterinary use showing that there was not interference of these compounds at the same concentration levels as those of analytes, and also, at their therapeutic levels.

The method has been applied to the analysis of bovine urine samples, which only required a simple clean up step of the samples prior to injection in the UPLC system. The analytes were not detected in the samples analyzed. A recovery study was performed by adding three different amounts of the analytes to the urine samples, with recovery percentages in the range of 80 – 100%. This proves the practical usefulness of the proposed method as an ultrafast analytical tool for the therapeutic control of acetylsalicylic administration in animals intended for food production.

- [1] Y. Ohwaki, T. Yamane, T. Ishimatsu, M. Wada, K. Nakashima, Biomed. Chromatogr., 21 (2007) 221 – 224.  
[2] F. Kees, D. Jehnich, H. Grobecker. J. Chromatogr. B, 677 (1996) 172 – 177.





**LIBRO DE RESÚMENES**

**NANOUCO V**

Encuentro sobre Nanociencia y Nanotecnología  
de Investigadores y Tecnólogos Andaluces



Córdoba, 5 y 6 de Febrero de 2015



O13

### USEFULNESS OF A NEW Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Eu,Tb NANOCOMPOSITE AS SORBENT IN DISPERSIVE SOLID PHASE EXTRACTION FOR ANTIBIOTIC DETERMINATION IN MEAT SAMPLES

M.L. Castillo-García<sup>a</sup>, M.P. Aguilar-Caballos, A. Gómez-Hens

<sup>a</sup>Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Cordoba. Annex to Marie Curie (C-3). Campus of Rabanales. 14071-Córdoba. Spain.  
e-mail: qa1gohea@uco.es

A novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:Eu,Tb nanocomposite has been synthesized for its use as sorbent in dispersive solid phase extraction, which has been applied to the determination of quinolone and tetracycline antibiotics in meat samples. These nanocomposites have been synthesized<sup>1</sup> in two simple steps, which consist in the formation of the magnetic core by a co-precipitation method and a further treatment with Eu(III) and Tb(III) salts obtaining magnetic nanomaterial with these lanthanide ions in its surface. The magnetic properties of these hybrid nanoparticles ease the performance of dispersive solid phase extraction and the presence of Eu(III) and Tb(III) in their composition allows a relatively selective interaction with antibiotics bearing β-diketonate and carboxylic acid groups, such as quinolones and tetracyclines, which have been chosen as model analytes. Oxolinic acid (OXO), nalidixic acid (NAL), flumequine (FLU), oxytetracycline (OTC), tetracycline (TET) and chlortetracycline (CTC) have been simultaneously determined using ultra high performance liquid chromatography with fluorometric determination in less than 5 min. Chromatograms were simultaneously detected at two excitation/emission pairs of wavelengths, which are 255/360 and 390/512 nm for quinolones and tetracyclines, respectively.

Under the optimum conditions, the dynamic ranges and detection limits for the analytes were 0.5 – 2000 and 0.25 ng mL<sup>-1</sup> for OXO; 1.5 – 2000 and 0.7 ng mL<sup>-1</sup> for NAL; 2.5 – 2000 and 1.2 ng mL<sup>-1</sup> for FLU; 2 – 7500 and 1 ng mL<sup>-1</sup> for OTC; 3 – 7500 and 1.5 ng mL<sup>-1</sup> for TET; and finally, 10 – 1000 and 3.8 ng mL<sup>-1</sup> for CTC. Intra- and inter-day precision data were assessed for retention times and areas at two concentration levels of each antibiotic, yielding values in the range of 0.07 – 0.21% and 2.6 – 9.1% for retention times and areas, respectively, in intra-assay precision experiments, and 0.5 – 1.8% and 4.2 – 14.4% for retention times and areas obtained after inter-assay experiments, respectively. The method was applied to the analysis of different meat samples, such as chicken and pork muscle, which were spiked at 50, 100 and 200 μg kg<sup>-1</sup>, giving mean recovery values for each analyte in the range of 79.1 – 91.8%. These results prove the usefulness of the developed method to the control of these antibiotic residues in meat samples.

Authors gratefully acknowledge financial support from the MICINN (Grant No. CTQ2012-32941), from the Junta of Andalucía (Grant No.P09-FQM4933) and from the FEDER Program.

<sup>1</sup> Ma, Z.Y.; Dosev, D.; Nichkova M.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.; Kennedy, I.M. *J. Mat. Chem.*, **2009**, 19, 4695.





**Dispersive solid-phase extraction with a new Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:Eu,Tb nanocomposite as sorbent for antibiotic determination**

M.L. Castillo-García, M.P. Aguilar-Caballós, A. Gómez-Hens

Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba. Annex to Marie Curie (C-3). Campus of Rabanales. 14071-Córdoba. Spain. qa1gohea@uco.es

**Abstract**

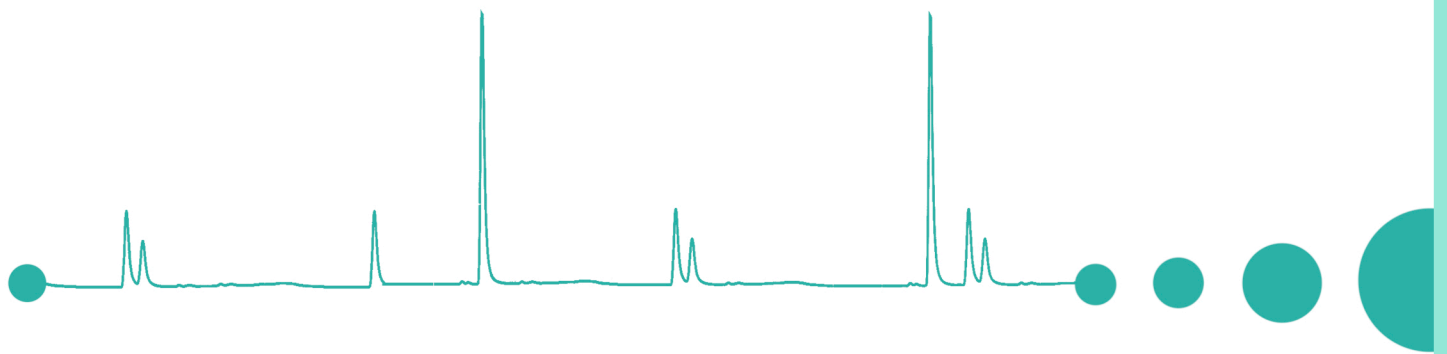
A novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:Eu,Tb nanocomposite has been synthesized for its use as sorbent in dispersive solid phase extraction, which has been applied to the determination of quinolone and tetracycline antibiotics in meat samples. These nanocomposites have been synthesized [1] in two simple steps, which consist in the formation of the magnetic core by a co-precipitation method and a further treatment with Eu(III) and Tb(III) salts obtaining magnetic nanomaterial with these lanthanide ions in its surface. The magnetic properties of these hybrid nanoparticles ease the performance of dispersive solid phase extraction and the presence of Eu(III) and Tb(III) in their composition allows a relatively selective interaction with antibiotics bearing  $\beta$ -diketonate and carboxylic acid groups, such as quinolones and tetracyclines, which have been chosen as model analytes. Oxolinic acid (OXO), nalidixic acid (NAL), flumequine (FLU), oxytetracycline (OTC), tetracycline (TET) and chlortetracycline (CTC) have been simultaneously determined using ultra high performance liquid chromatography with fluorometric determination in less than 5 min. Chromatograms were simultaneously detected at two excitation/emission pairs of wavelengths, which are 255/360 and 390/512 nm for quinolones and tetracyclines, respectively.

Under the optimum conditions, the dynamic ranges and detection limits for the analytes were 0.5 – 2000 and 0.25 ng mL<sup>-1</sup> for OXO; 1.5 – 2000 and 0.7 ng mL<sup>-1</sup> for NAL; 2.5 – 2000 and 1.2 ng mL<sup>-1</sup> for FLU; 2 – 7500 and 1 ng mL<sup>-1</sup> for OTC; 3 – 7500 and 1.5 ng mL<sup>-1</sup> for TET; and finally, 10 – 1000 and 3.8 ng mL<sup>-1</sup> for CTC. Intra- and inter-day precision data were assessed for retention times and areas at two concentration levels of each antibiotic, yielding values in the range of 0.07 – 0.21% and 2.6 – 9.1% for retention times and areas, respectively, in intra-assay precision experiments, and 0.5 – 1.8% and 4.2 – 14.4% for retention times and areas obtained after inter-assay experiments, respectively. The method was applied to the analysis of different meat samples, such as chicken and pork muscle, which were spiked at 50, 100 and 200  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>, giving mean recovery values for each analyte in the range of 79.1 – 91.8%. These results prove the usefulness of the developed method to the control of these antibiotic residues in meat samples.

**References**

[1] Ma, Z.Y.; Dosev, D.; Nichkova M.; Gee, S.J.; Hammock, B.D.; Kennedy, I.M. *J. Mat. Chem.*, **2009**, 19, 4695.





## *ANEXO C: Posters*







### Comparative study of the sensitized luminescence of terbium(III) ions and Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> nanoparticles as derivatising reagents in ultrafast liquid chromatography

M.L. Castillo-García<sup>1</sup>, M.P. Aguilar-Caballos<sup>1</sup>, A. Gómez-Hens<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry (IQFN), Campus of Rabanales, Marie Curie Building (Annex), University of Córdoba, 14071-Córdoba, Spain



#### 1. INTRODUCTION

- A new systematic study on the interaction of either Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> nanoparticles (NPs) and Tb(III) with lasalocid (LAS) and salicylic acid (SAL), used as model compounds in order to be determined by terbium-sensitized luminescence is reported
- This study constitutes the first attempt to use Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs as analytical reagents, which has not been described up to date, whereas terbium (III) ions have been already used as derivatisation reagents in conventional LC [1]
- There have been developed three different methodologies for LAS and SAL determination, which features have been compared to those obtained by using terbium(III) ions
- The application of these methodologies to the development of derivatization reactions in ultrafast liquid chromatography has been investigated

#### 2. EXPERIMENTAL

Neutral medium

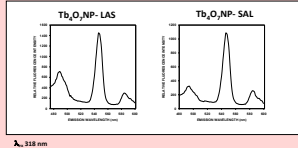
Alkaline medium

|  |                    |  |  |
|--|--------------------|--|--|
| Tb(III) ions + LAS                       | TOPO, Triton X-100 | Tb(III)-LAS                            | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |
| Tb(III) ions + SAL                       | TOPO, Triton X-100 | Tb(III)-SAL                            | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |
| Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs + LAS | TOPO, Triton X-100 | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs-LAS | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |
| Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs + SAL | TOPO, Triton X-100 | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs-SAL | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |

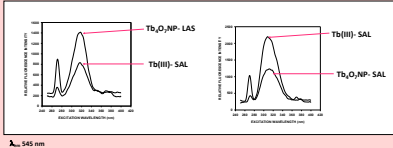
|  |            |  |  |
|--|------------|--|--|
| Tb(III) ions + LAS                       | EDTA, CTAB | Tb(III)-LAS                            | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |
| Tb(III) ions + SAL                       | EDTA, CTAB | Tb(III)-SAL                            | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |
| Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs + LAS | EDTA, CTAB | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs-LAS | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |
| Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs + SAL | EDTA, CTAB | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> NPs-SAL | (λ <sub>ex</sub> 318 nm, λ <sub>em</sub> 545 nm) |

#### 3. RESULTS AND DISCUSSION

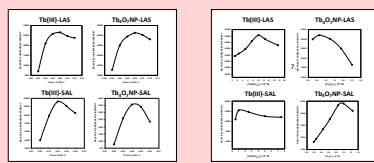
##### EMISSION SPECTRA WITH Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs AS REAGENTS



##### COMPARED LUMINESCENCE WITH Tb(III) AND WITH Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> NPs

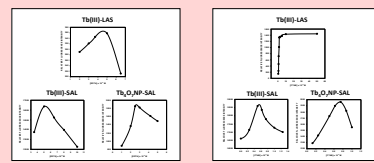


##### OPTIMIZATION OF VARIABLES IN NEUTRAL MEDIUM



pH: 6.0 [Tb(III)]: 10<sup>-6</sup> M [LAS/SAL]: 3.25 x 10<sup>-4</sup> M [TOPO]: 4.5 x 10<sup>-4</sup> - 6.5 x 10<sup>-4</sup> M

##### OPTIMIZATION OF VARIABLES IN ALKALINE MEDIUM



[NaOH]: 0.08 M [Tb(III)]: 0.5 mM [LAS/SAL]: 0.055 M [TOPO]: 0.88 mM

##### CALIBRATION PARAMETERS AND LODS

| System                              | Tb(III)-LAS | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -LAS | Tb(III)-SAL | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Linear range (ng mL <sup>-1</sup> ) | 5 - 3000    | 5 - 100                             | 5 - 200     | 50 - 1000                           |
| Slope ± SD                          | 142 ± 2     | 44.0 ± 0.8                          | 79 ± 2      | 9.7 ± 0.8                           |
| r <sup>2</sup> (intercept)          | 0.9999      | 0.9999                              | 0.9999      | 0.9999                              |
| LOD (ng mL <sup>-1</sup> )          | 1.8         | 1                                   | 1           | 4                                   |

##### PRECISION

| System                          | Tb(III)-LAS | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -LAS | Tb(III)-SAL | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|---------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Relative standard deviation (%) | 0.2         | 0.2                                 | 0.2         | 0.2                                 |

\*Units: ng mL<sup>-1</sup>

##### CALIBRATION PARAMETERS AND LODS

| System                              | Tb(III)-LAS | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -LAS | Tb(III)-SAL | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Linear range (ng mL <sup>-1</sup> ) | 500 - 5000  | 5 - 100                             | 500 - 4000  | 500 - 4000                          |
| Slope ± SD                          | 8.7 ± 0.2   | 0.12 ± 0.02                         | 2.8 ± 0.1   | 4.1 ± 0.1                           |
| r <sup>2</sup> (intercept)          | 0.9999      | 0.9999                              | 0.9999      | 0.9999                              |
| LOD (ng mL <sup>-1</sup> )          | 30          | 1.1                                 | 12          | 12                                  |

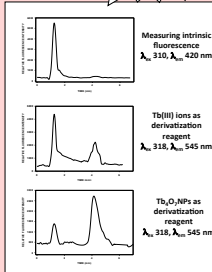
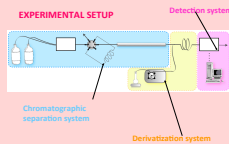
##### PRECISION

| System                          | Tb(III)-LAS | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -LAS | Tb(III)-SAL | Tb <sub>4</sub> O <sub>7</sub> -SAL |
|---------------------------------|-------------|-------------------------------------|-------------|-------------------------------------|
| Relative standard deviation (%) | 0.2         | 0.2                                 | 0.2         | 0.2                                 |

\*Units: ng mL<sup>-1</sup>

#### 4. APPLICATION TO UPLC

The potential usefulness is shown in these chromatograms after some preliminary assays using post-column derivatization



#### 5. CONCLUSIONS


- The present work has demonstrated for the first time the usefulness of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub>NPs to be sensitized by two model analytes, LAS and SAL, which have proven their ability to produce sensitized luminescence
- The features of these systems have been compared to those obtained by using Tb(III) ions as reagents in order to know their analytical possibilities
- The results obtained show that the usefulness of Tb<sub>4</sub>O<sub>7</sub> is more limited at alkaline pH than at neutral medium. However, they are suitable alternative reagents in this last medium, which can be applied to the development of individual batch and simultaneous chromatographic determinations
- These NPs are commercially available, thus there is no need to synthesize them, which considerably speeds up the analysis and the potential irregularities between different batches, typical for homemade synthesis are avoided

##### References


[1] A. Gómez-Hens, M.P. Aguilar-Caballos, Trends Anal. Chem., 21 (2002) 131.

MAF-12<sup>+</sup> MAF-12, Strasbourg, France, 11<sup>th</sup> - 14<sup>th</sup> september, 2011





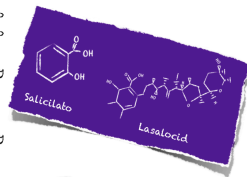
## APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> PARA LA DETERMINACIÓN DE LASALOCID Y SALICILATO EN MUESTRAS DE ALIMENTOS



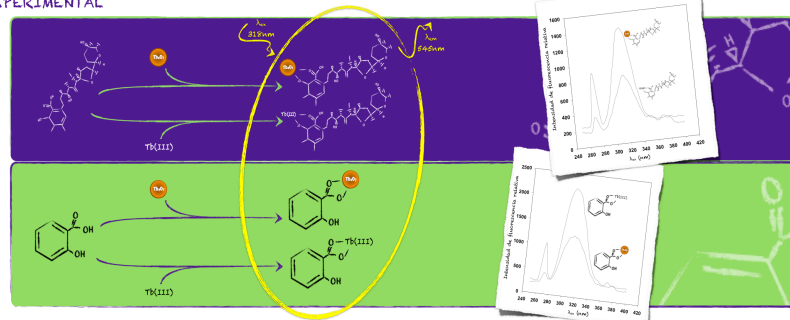
**María Luisa Castillo-García, María Paz Aguilar Caballos, \*Agustina Gómez-Hens**  
 Departamento de Química Analítica. Instituto de Química Fina y Nanoquímica. Campus de Rabanales. Anexo al Edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba.  
 14071-Córdoba. España.  
 \*qalgohea@uco.es

### 1. INTRODUCCIÓN

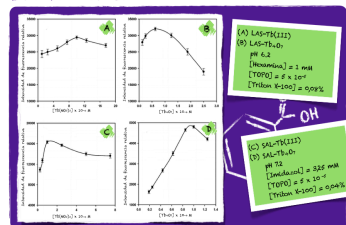
- Se ha investigado por primera vez la utilidad de nanopartículas (NPs) de Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como reactivo analítico, usando luminiscencia sensibilizada como sistema de detección. Los resultados se han comparado con los obtenidos utilizando iones Tb(III)
- El estudio se ha realizado tomando como analitos modelo dos medicamentos de uso veterinario: lasalocid (LAS) y salicilato (SAL)
- Se han comparado las características de cuatro sistemas: LAS-Tb(III), LAS-NPs Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SAL-Tb(III) y SAL-NPs Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>
- El método propuesto se ha aplicado a la determinación de LAS en agua de grifo, pre-mezcla de pienso para aves y huevos



### 2. EXPERIMENTAL



### 3. OPTIMIZACIÓN



### 4. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

| Sistema                                 | LAS-Tb(III)                   | LAS-Tb <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | SAL-Tb(III)                   | SAL-Tb <sub>2</sub> O <sub>3</sub> |
|---|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|
| Intervalo lineal (ng mL <sup>-1</sup> ) | 200 - 8000                    | 3 - 700                            | 3 - 250                       | 20 - 1250                          |
| Pendiente ± DE                          | 144 ± 2                       | 44.0 ± 0.2                         | 97 ± 2                        | 9.7 ± 0.2                          |
| Ordenada en el origen ± DE              | (1.0 ± 0.2) × 10 <sup>3</sup> | (1.0 ± 0.3) × 10 <sup>1</sup>      | (2.0 ± 0.0) × 10 <sup>1</sup> | (5.0 ± 0.4) × 10 <sup>1</sup>      |
| Coefficiente de regresión (r)           | 0.9991                        | 0.9992                             | 0.996                         | 0.998                              |
| LD (ng mL <sup>-1</sup> )               | 1.8                           | 1                                  | 1                             | 4                                  |
| Precisión (% DER)                       | 6.5 (100.0)                   | 2.8 (5.0)                          | 4.4 (5.0)                     | 2.6 (50.0)                         |

\*Concentración de analito ensayada en ng mL<sup>-1</sup> (n = 10)

La selectividad del sistema LAS-NPs Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se ha estudiado ensayando distintas concentraciones de antibióticos de diferentes familias. La menor relación analito: interferente tolerada fue 1:4

### 5. APLICACIONES

El tratamiento de muestra utilizado en cada caso depende de la complejidad de la matriz

| Muestra              | Contenido <sup>a,b</sup> | Concentración LAS    |                           | Recuperado (%) |
|----------------------|--------------------------|----------------------|---------------------------|----------------|
|                      |                          | Añadido <sup>a</sup> | Encontrado <sup>a,b</sup> |                |
| Agua de grifo        | —                        | 40                   | 42 ± 3                    | 105.0          |
|                      |                          | 60                   | 57 ± 4                    | 95.0           |
|                      |                          | 90                   | 78 ± 4                    | 97.5           |
| Pre-mezcla de pienso | 13.9 ± 0.5               | 2                    | 2.00 ± 0.09               | 100.0          |
|                      |                          | 4                    | 3.9 ± 0.1                 | 97.5           |
|                      |                          | 6                    | 6.1 ± 0.2                 | 101.7          |
| Huevos               | —                        | 75                   | 60 ± 4                    | 90.0           |
|                      |                          | 100                  | 91 ± 7                    | 91.9           |
|                      |                          | 150                  | 144 ± 5                   | 96.0           |

<sup>a</sup>Unidades: Muestra de agua (ng mL<sup>-1</sup>), pre-mezcla de pienso para aves (%) y muestra de huevo (mg kg<sup>-1</sup>). <sup>b</sup>Media ± DE (n = 3).

### 6. CONCLUSIONES

- Este trabajo ha demostrado la utilidad de NPs Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para la sensibilización de dos analitos modelo, LAS y SAL
- Las características analíticas obtenidas, similares en ambos casos, demuestran que las NPs Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pueden usarse como reactivos alternativos al Tb(III) para la determinación de LAS y SAL mediante luminiscencia sensibilizada
- Se ha demostrado la aplicabilidad de NPs de Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como reactivos para el control analítico de alimentos derivados de aves de granja después de su tratamiento con LAS
- El uso de NPs Tb<sub>2</sub>O<sub>3</sub> reduce el coste del análisis ya que la cantidad requerida es menor que la necesaria de la sal de Tb(III)
- Estas NPs están disponibles comercialmente, lo que facilita su uso como reactivo analítico





## DETERMINATION OF ACETYSALICYLIC ACID AND ITS MAJOR METABOLITES IN BOVINE URINE USING ULTRA PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY



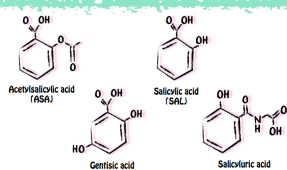
María Luisa Castillo-García, María Paz Aguilar Caballos, \*Agustina Gómez-Hens  
Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba, Campus de Rabanales, 14071-Córdoba (†galgohea@uco.es)

### Introduction

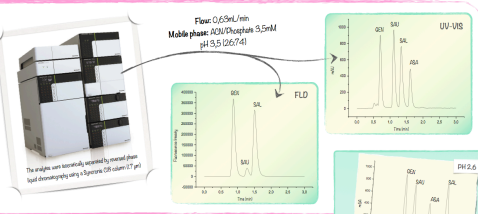
A new method based on ultra high performance liquid chromatography (UPLC) with photometric and fluorimetric detection for the determination of acetylsalicylic acid and its main metabolites, namely gentisic, salicylic and salicylicuric acids, in bovine urine samples is reported. The chromatographic separation was performed under isocratic conditions, where the retention times of the four compounds determined were lower than 2 min.

Acetylsalicylic acid was determined by photometric detection, whereas fluorescence detection was used to monitor the native fluorescence of the three main metabolites.

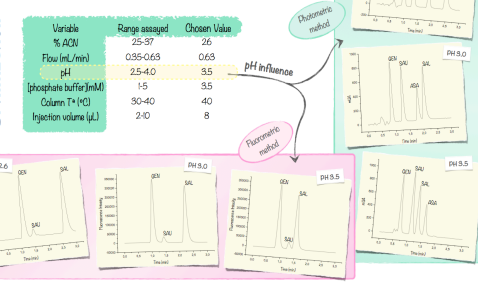
The method has been applied to the analysis of bovine urine samples, which only required a simple clean up step of the samples prior to injection in the UPLC system.



### Experimental



### Optimization



### Applications

The method has been applied to the analysis of bovine urine samples, which only required a simple clean up step and the further dilution of the samples prior to injection in the UPLC system.

| Urine sample | Gentisic acid                |                              |              | Salicylic acid               |                              |              |
|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
|              | Added (μg mL <sup>-1</sup> ) | Found (μg mL <sup>-1</sup> ) | Recovery (%) | Added (μg mL <sup>-1</sup> ) | Found (μg mL <sup>-1</sup> ) | Recovery (%) |
| Sample 1     | 15                           | 15.0 ± 0.7                   | 86.7         | 15                           | 14.9 ± 0.5                   | 99.3         |
|              | 20                           | 19.9 ± 0.7                   | 99.5         | 25                           | 24.9 ± 0.7                   | 99.4         |
|              | 25                           | 20.2 ± 0.4                   | 80.8         | 15                           | 14.9 ± 0.6                   | 99.3         |
| Sample 2     | 15                           | 15.1 ± 1                     | 86.6         | 15                           | 14.9 ± 0.6                   | 99.3         |
|              | 20                           | 15.0 ± 0.5                   | 80.0         | 20                           | 19.1 ± 1                     | 95.0         |
|              | 25                           | 20.5 ± 0.6                   | 82.1         | 25                           | 22.2 ± 0.5                   | 88.8         |
| Sample 3     | 15                           | 14.7 ± 0.5                   | 98.0         | 15                           | 14.5 ± 0.4                   | 96.7         |
|              | 20                           | 19.6 ± 0.6                   | 98.0         | 20                           | 19.6 ± 0.3                   | 98.0         |
|              | 25                           | 25.1 ± 1                     | 84.0         | 25                           | 22.3 ± 0.8                   | 89.6         |
| Sample 4     | 15                           | 14.5 ± 0.5                   | 95.3         | 15                           | 14.8 ± 0.4                   | 98.7         |
|              | 20                           | 19.1 ± 1                     | 95.0         | 20                           | 19.5 ± 0.9                   | 97.5         |
|              | 25                           | 24 ± 1                       | 96.0         | 25                           | 24.0 ± 0.6                   | 96.0         |

| Urine sample | Salicylic acid               |                              |              | Acetylsalicylic acid         |                              |              |
|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
|              | Added (μg mL <sup>-1</sup> ) | Found (μg mL <sup>-1</sup> ) | Recovery (%) | Added (μg mL <sup>-1</sup> ) | Found (μg mL <sup>-1</sup> ) | Recovery (%) |
| Sample 1     | 15                           | 15 ± 0.5                     | 80.7         | 30                           | 27 ± 1                       | 90.0         |
|              | 20                           | 18.8 ± 0.3                   | 94.0         | 40                           | 39 ± 1                       | 97.5         |
|              | 25                           | 20.1 ± 0.3                   | 80.4         | 50                           | 44 ± 1                       | 88.0         |
| Sample 2     | 15                           | 14 ± 2                       | 93.3         | 30                           | 27 ± 1                       | 90.7         |
|              | 20                           | 18 ± 2                       | 90.0         | 40                           | 37 ± 1                       | 92.5         |
|              | 25                           | 21.5 ± 0.4                   | 86.0         | 50                           | 48 ± 2                       | 96.0         |
| Sample 3     | 15                           | 14.5 ± 0.5                   | 95.3         | 30                           | 27.1 ± 0.9                   | 90.3         |
|              | 20                           | 18.6 ± 0.2                   | 98.0         | 40                           | 39.0 ± 0.7                   | 97.5         |
|              | 25                           | 22.5 ± 0.4                   | 90.0         | 50                           | 48.9 ± 0.5                   | 97.8         |
| Sample 4     | 15                           | 15.5 ± 0.4                   | 85.3         | 30                           | 30 ± 1                       | 100          |
|              | 20                           | 17.0 ± 0.4                   | 85.0         | 40                           | 39.2 ± 0.7                   | 98.0         |
|              | 25                           | 22.1 ± 0.2                   | 88.4         | 50                           | 49.6 ± 0.7                   | 99.2         |

#### Photometric method

| Compound | Retention time (min) | Linear range (μg mL <sup>-1</sup> ) | Slope ± SD   | y-intercept ± SD             | Regression coefficient (r) | LOD (μg mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------|-------------------------------------|--------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| GEN      | 0.7                  | 25-2500                             | 8.7 ± 0.1    | 1.9 ± 0.9 × 10 <sup>-2</sup> | 0.9997                     | 9                          |
| SAU      | 1.2                  | 30-30000                            | 89.2 ± 0.1   | 0 ± 1.1 × 10 <sup>-2</sup>   | 0.9995                     | 15                         |
| SAL      | 1.54                 | 25-2000                             | 36.7 ± 0.3   | 0 ± 1.1 × 10 <sup>-2</sup>   | 0.99979                    | 12                         |
| ASA      | 1.61                 | 10-25000                            | 20.30 ± 0.03 | 3.57 ± 1.51                  | 0.99972                    | 2.2                        |

|           | % RSD (Retention time) |      |      |      | % RSD (Area) |     |     |     |
|-----------|------------------------|------|------|------|--------------|-----|-----|-----|
|           | GEN                    | SAU  | SAL  | ASA  | GEN          | SAU | SAL | ASA |
| Intra-day | 0.09                   | 0.07 | 0.06 | 0.06 | 5.0          | 6.5 | 2.1 | 5.0 |
| Inter-day | 0.15                   | 0.1  | 0.2  | 0.09 | 1.4          | 1.3 | 5.6 | 1.3 |
| Intra-day | 0.3                    | 0.2  | 0.6  | 0.3  | 7.0          | 9.2 | 1.4 | 6.7 |
| Inter-day | 0.7                    | 0.3  | 0.5  | 0.3  | 6.3          | 8.4 | 3.3 | 6.4 |

#### Fluorimetric method

| Compound | Retention time (min) | Linear range (μg mL <sup>-1</sup> ) | Slope ± SD | y-intercept ± SD              | Regression coefficient (r) | LOD (μg mL <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| GEN      | 0.88                 | 0.2-2500                            | 17498 ± 8  | 15.5 ± 0.5 × 10 <sup>-3</sup> | 0.99995                    | 0.09                       |
| SAU      | 1.29                 | 2.5-5000                            | 2252 ± 2   | 0.3 ± 0.9 × 10 <sup>-3</sup>  | 0.99960                    | 11                         |
| SAL      | 1.52                 | 0.2-2500                            | 8679 ± 9   | 14.9 ± 0.5 × 10 <sup>-3</sup> | 0.99996                    | 0.08                       |

|           | % RSD (Retention time) |      |      |     | % RSD (Area) |     |     |     |
|-----------|------------------------|------|------|-----|--------------|-----|-----|-----|
|           | GEN                    | SAU  | SAL  | ASA | GEN          | SAU | SAL | ASA |
| Intra-day | 0.1                    | 0.09 | 0.13 | 3.3 | 3.4          | 2.4 | 2.4 | 2.4 |
| Inter-day | 0.6                    | 0.6  | 1.2  | 6.1 | 8.8          | 8.8 | 8.8 | 8.8 |
| Inter-day | 0.6                    | 0.5  | 1.4  | 5.1 | 6.4          | 4.0 | 4.0 | 4.0 |

#### Selectivity study

The selectivity of the method was checked by assaying different drugs of veterinary use showing that there was not interference of these compounds at the same concentration levels as those of analyses.

### Conclusions

The results obtained show that the use of UPLC allows the separation of ASA and its major metabolites GEN, SAU and SAL in less than 2 min, which is shorter than the time required for the separation of similar analyte mixtures.

The study carried out has demonstrated the usefulness of fluorimetric detection for the determination of ASA metabolites, reaching lower detection limits and better selectivity than those obtained using photometric detection.

The developed method has proven to be a useful analytical tool for the control of veterinary practice as it shows the suitable analytical properties, such as sensitivity, selectivity and precision, for its application to the analysis of bovine urine samples.


Only a simple clean up step and the further dilution of the samples are just required. The good results obtained in the recovery study contribute to demonstrate the practical usefulness of the developed method.

XIV REUNIÓN DEL GRUPO REGIONAL ANDALUZ DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE QUÍMICA ANALÍTICA  
Baeza 26-27 Junio 2014

### Analytical features



## DISPERSIVE SOLID-PHASE EXTRACTION WITH A NEW Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:Eu,Tb NANOCOMPOSITE AS SORBENT FOR ANTIBIOTIC DETERMINATION



IMAGINANDO  
2015

María Luisa Castillo-García, María Paz Aguilar-Caballos, Agustina Gómez-Hens  
Analytical Chemistry Department, Institute of Fine Chemistry and Nanochemistry, Faculty of Sciences, University of Córdoba,  
Campus Universitario de Rabanales, 14071-Córdoba (qa1goha@uco.es)

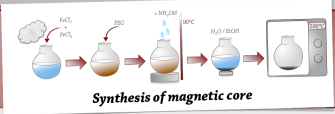
---

### 1 INTRODUCTION

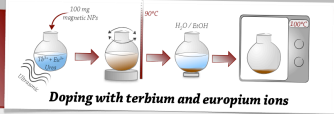
- A novel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:Eu,Tb nanocomposite has been synthesized to be used as sorbent in dispersive solid phase extraction, which has been applied as a previous step to the determination of six quinolone and tetracycline antibiotics as model analytes, using ultra high performance chromatography.
- This nanocomposite has been synthesized using a simple two-step synthesis, which consists in 1) the formation of the magnetic core by a co-precipitation method and 2) a treatment with Eu(III) and Tb(III) salts to coat its surface with these lanthanide ions.
- The magnetic properties of these hybrid nanoparticles ease the performance of dispersive solid phase extraction and the presence of Eu(III) and Tb(III) in their composition allows a relatively selective interaction with the analytes by complex formation.
- The method has been satisfactory applied to the determination of residues of these antibiotics in meat samples.

### 2 EXPERIMENTAL

**Synthesis of magnetic nanocomposites**



**Synthesis of magnetic core**



**Doping with terbium and europium ions**

### Model analytes

C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C)C2=O  
Tetracycline (TET)

C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C)C2=O  
Oxytetracycline (OTC)

C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C)C2=O  
Chlortetracycline (CTC)


C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C)C2=O  
Flumequine (FLU)

C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C)C2=O  
Oxolinic acid (OXO)

C1=CC=C2C(=C1)C(=O)N(C)C2=O  
Nalidixic acid (NAL)

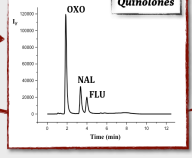
---

### Chromatographic separation



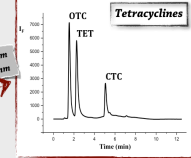
Flow: 0.5 mL/min  
Mobile phase: ACN/75mM NH<sub>4</sub>AcO pH 6.9 + 0.2 M Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>  
Elution gradient:  
2.00 88% B  
6.50 40% B  
7.50 88% B

### Quinolones



λ<sub>ex</sub> 255 nm  
λ<sub>em</sub> 360 nm

### Tetracyclines



λ<sub>ex</sub> 290 nm  
λ<sub>em</sub> 312 nm

---

### 3 OPTIMIZATION

| Variable            | Range assayed | Optimum value |
|---------------------|---------------|---------------|
| [Eu(III) amount]    | 50-125 nM     | 70 nM         |
| [Dg(III) amount]    | 25-300 nM     | 300 nM        |
| pH                  | 2.6-7.6       | 6.9           |
| Initial composition | 10-20% ACN    | 12% ACN       |
| Flow                | 0.4-0.55 mL   | 0.5 mL        |
| Column T°           | 20-42°C       | 32°C          |
| Injection volume    | 10-15 µL      | 15 µL         |

**Chromatographic separation**

### Dispersive solid phase extraction


| Variable         | Range assayed | Optimum value |
|------------------|---------------|---------------|
| Sorbent amount   | 5-20 mg       | 12 mg         |
| pH               | 7-9           | 8.3           |
| Interaction time | 5-30 min      | 10 min        |

| Variable                                | Range assayed | Optimum value |
|---|---------------|---------------|
| [Dg(III) amount]                        | 0.05-0.5 M    | 0.1 M         |
| pH [Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ] | 7-12          | 9.8           |
| [EDTA]                                  | 5-100 mM      | 75 mM         |
| Eluent volume                           | 250-2000 µL   | 500 µL        |
| Elution time                            | 5-60 min      | 30 min        |

**Elution**

---

### 5 APPLICATIONS



**Sample treatment**

### 4 ANALYTICAL FEATURES

| Compound | Retention time (min) | Linear range (ng mL <sup>-1</sup> ) | Slope ± SD | y-intercept ± SD               | Regression coefficient (r) | LOD (ng mL <sup>-1</sup> ) | LOQ (µg Kg <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------|-------------------------------------|------------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| OXO      | 1.87                 | 0.5-2000                            | 10940 ± 30 | (18.4 ± 0.9) × 10 <sup>3</sup> | 0.999991                   | 0.25                       | 1.2                        |
| NAL      | 3.39                 | 1.5-2000                            | 8826 ± 2   | (1.8 ± 0.9) × 10 <sup>4</sup>  | 0.999998                   | 0.7                        | 2.3                        |
| FLU      | 4.13                 | 2.5-2000                            | 2310 ± 2   | (2.3 ± 0.9) × 10 <sup>4</sup>  | 0.999994                   | 1.2                        | 4.0                        |
| OTC      | 1.56                 | 2-7500                              | 478 ± 1    | (9.4 ± 1.5) × 10 <sup>3</sup>  | 0.999991                   | 1.0                        | 3.3                        |
| TET      | 2.32                 | 3-7500                              | 609 ± 1    | (1.7 ± 0.3) × 10 <sup>4</sup>  | 0.999997                   | 1.5                        | 5                          |
| CTC      | 4.97                 | 10-1000                             | 397 ± 2    | (1.7 ± 0.5) × 10 <sup>4</sup>  | 0.999824                   | 3.8                        | 12.5                       |

---

### 6 CONCLUSIONS

The present work has demonstrated for the first time the usefulness of a magnetic nanomaterial doped with Tb and Eu for the extraction of quinolones and tetracyclines as model analytes

Analytes are retained owing to the formation of a complex and the elution is performed in the absence of organic solvents by sequential addition of salt

The magnetic core allows the use of multiple magnet devices for separating the supernatant from the nanomaterial, so several samples can be simultaneously extracted

A new method based on ultra high performance liquid chromatography (UPLC) with fluorometric detection has been developed for determination of six antibiotics in less than 6 min

The method has been applied to the analysis of meat samples, which provided satisfactory recovery values