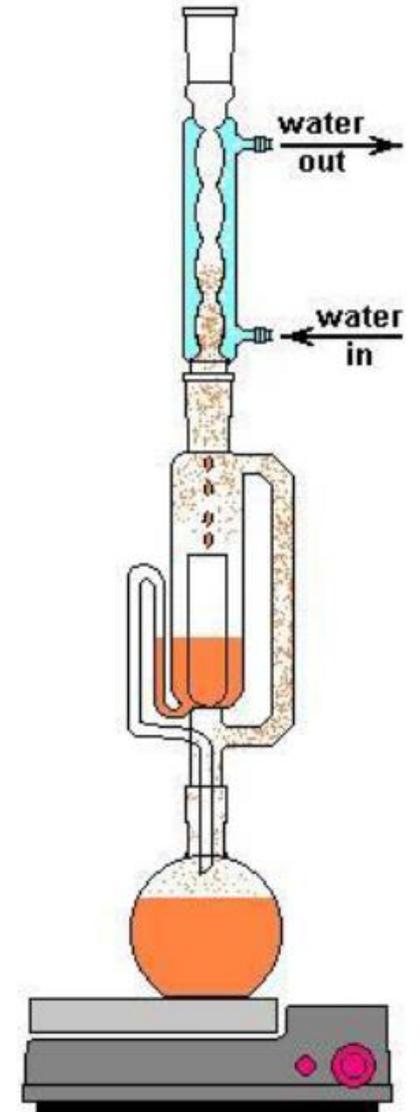
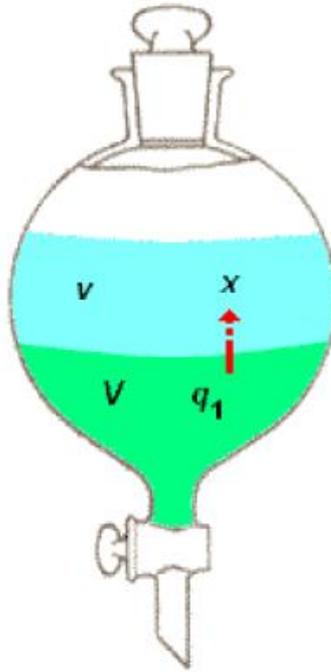
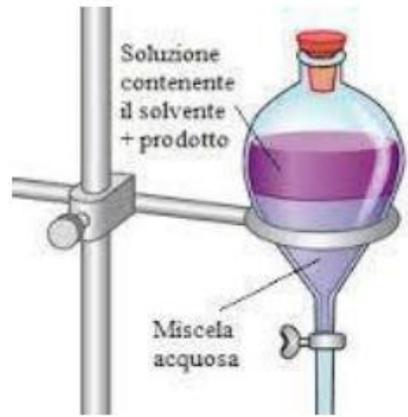


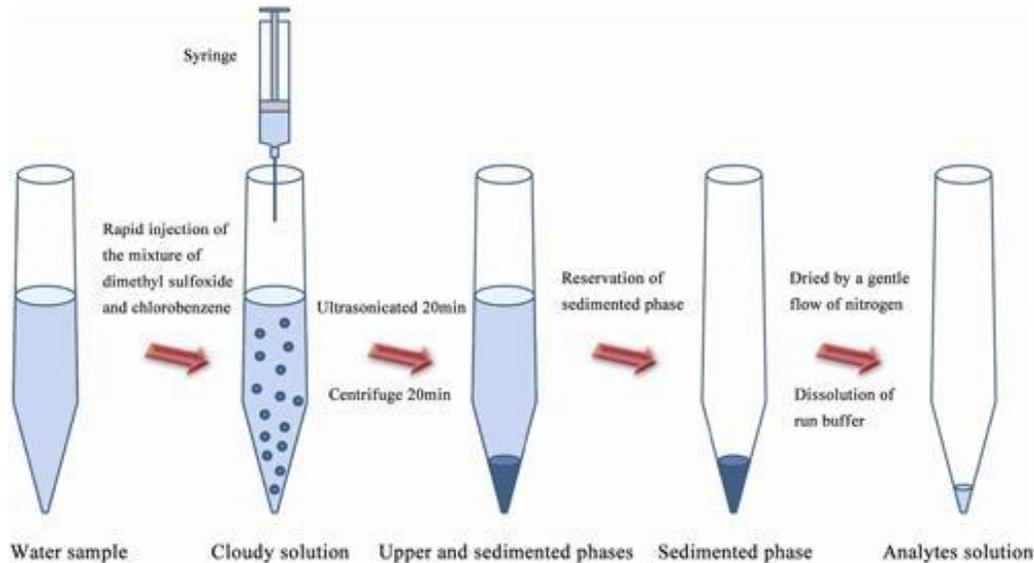
## Estrazione in fase liquida

Differente coefficiente di ripartizione tra due fasi immiscibili, va ripetuta più volte o automatizzata (Soxhlet)



# MICROESTRAZIONI

## dLLME – dispersive Liquid Liquid Micro Extraction



La dLLME è una tecnica di estrazione e pulizia introdotta nel 2006 da Rezaee et al., basato sugli stessi principi di LLE, ma miniaturizzata.

Questa tecnica permette di estrarre gli analiti con pochi microlitri di solvente estraente utilizzando un sistema **ternario di solventi**: una fase acquosa contenente il campione, una fase disperdente ed una fase organica estraente. La tecnica si basa sulla miscelazione delle 3 fasi; quando nel campione viene introdotta rapidamente una miscela di fasi estraenti e disperdenti, si producono microgoccioline che vengono disperse all'interno della fase acquosa, aumentando la superficie di contatto tra la fase inorganica e la fase organica.

L'equilibrio di distribuzione può essere spostato aumentando la forza ionica del solvente acquoso con sali o variando il pH con soluzioni tampone, per modificare la polarità degli analiti target (ad esempio acidi grassi).

# dLLME – dispersive Liquid Liquid Micro Extraction

## Vantaggi

- La tecnica permette di estrarre con pochi microlitri di solvente organico (50-100  $\mu\text{L}$ )
- La quantità di campione richiesta ha un range molto ampio dai 100  $\mu\text{L}$  ai 5 mL, a seconda della complessità del campione.
- Si ottiene la capacità di un **arricchimento** importante (fino a 50-100 volte).
- Tempi di estrazione molto brevi ( dai 5 al massimo 20 minuti).
- La tecnica è semplice e può essere utilizzata con strumenti e solventi comuni in tutti i laboratori.
- Può funzionare anche da **clean-up** del campione.
- Può essere accoppiata con altre tecniche estrattive (ad esempio SPE), per avere una pulizia del campione più efficiente e un alto fattore di arricchimento.

## Svantaggi

- Per matrici complesse come sangue e tessuti è richiesto un pre-trattamento del campione per allontanare le proteine e i resti del tessuto che potrebbero andare a rendere impossibile un'estrazione efficiente.
- Richiede uno studio di ottimizzazione dei vari parametri (scelta dei solventi, dei loro volumi e del pH), che può risultare molto dispendiosa in termini di tempo.
- La tecnica è piuttosto recente e mancano ancora molte applicazioni su alcune matrici e analiti.

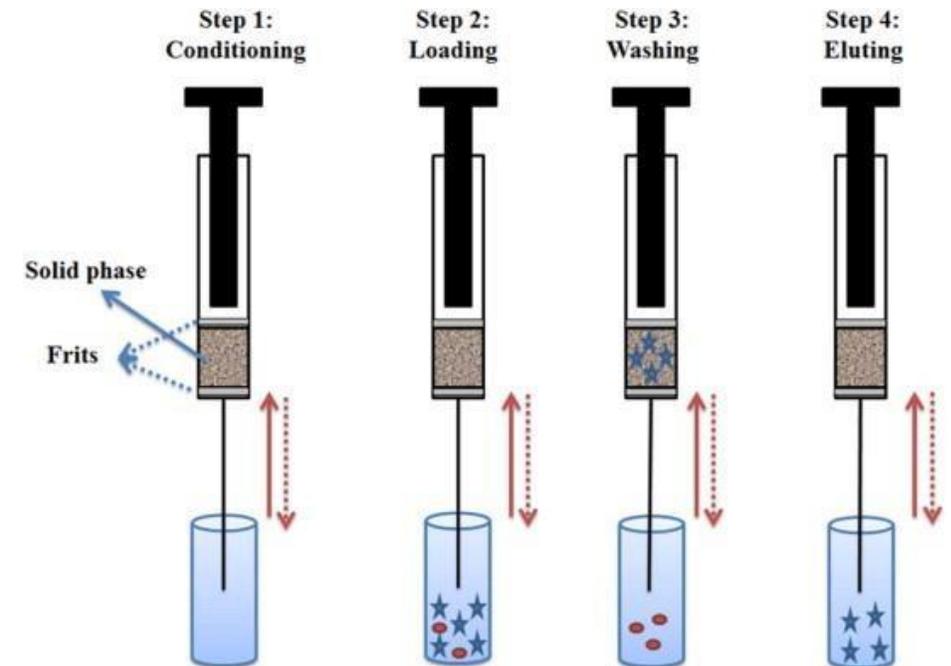
## MEPS – Micro extraction by Packed Sorbent

La tecnica MEPS costituisce una variante potenziata della tradizionale SPE. Il suo principale vantaggio è quello di impiegare piccoli volumi (da 10  $\mu\text{L}$  a 250  $\mu\text{L}$ ). Rispetto alla classica SPE, nella MEPS l'assorbente è integrato direttamente in una siringa che può essere interfacciata ad un sistema automatizzato.

Nella MEPS il materiale adsorbente (1-4 mg) è inserito direttamente nel cilindro della siringa (100-250  $\mu\text{L}$ ) oppure tra il cilindro e l'ago come una cartuccia. Questa cartuccia può essere impaccata o rivestita per garantire adeguate condizioni di estrazione, a seconda degli analiti da determinare. Come adsorbente si può impiegare una vasta gamma di materiali, alcuni dei quali già comuni nella SPE. Ad esempio si hanno materiali a base di silice (C2, C8 e C18), scambiatori di cationi (SCX), copolimeri polistirene-divinilbenzene (PS-DVB) o altri polimeri.

La micro-estrazione tramite adsorbente impaccato, abbreviata in **MEPS** dall'acronimo inglese **Micro-Extraction by Packed Sorbent**, è una tecnica di estrazione in fase solida, utile in chimica analitica per l'esame di fluidi biologici. È chiamata anche micro-estrazione su siringa impaccata

La MEPS combina i tre passaggi cruciali, estrazione, pre-concentrazione e pulizia (clean-up) del campione, in un unico dispositivo, costituito da due parti: una siringa e una cartuccia



# MEPS – Micro extraction by Packed Sorbent

## Vantaggi

- Il campione è eluito completamente usando piccoli volumi di solvente (10 µL), consentendo un interfacciamento semplificato con le valvole di gas cromatografia o cromatografia liquida. Il consumo di limitate quantità di reagente rende la tecnica più economica e più ecologica di altre.
- La quantità di campione richiesta è 10-100 volte inferiore rispetto a quella necessaria per SPE.
- Tempi di estrazione inferiori a 5 minuti.
- La cartuccia può essere riutilizzata 50-100 volte, rispetto a 5-10 utilizzi di una cartuccia SPE, quando si studiano matrici complesse (es. sangue e urina).
- La tecnica è semplice e user-friendly, soprattutto se collegata ad un autocampionatore.
- **L'effetto matrice** è comune per matrici complesse come quelle biologiche, costituite da una moltitudine di composti, spesso con proprietà chimico-fisiche affini, che potrebbero coeluire o essere persi durante la preparazione del campione, diminuendo l'affidabilità della procedura.

## Svantaggi

- L'adsorbente all'interno del BIN può intasarsi facilmente e diventare inutilizzabile quando si estraggono campioni viscosi o poco diluiti. Questo comporta la necessità (con campioni biologici quali il sangue o la saliva) di rimuovere le proteine lavorando in metanolo e/o acetonitrile. In questo modo si può estendere la durata dell'adsorbente.
- Non si può lavorare con grandi volumi di campione da analizzare. Solo 500 µL di campione sono iniettabili alla volta, quindi se si dovessero analizzare ad esempio 10 mL di campione, ci vorrebbero 20 cicli, per un totale di almeno 2 ore di lavoro, rendendo la procedura troppo laboriosa con più rischi di errori e contaminazioni, anche con metodi (semi)automatici. Inoltre un eccessivo sforzo dell'adsorbente ne accorderebbe la durata nel tempo.
- La tecnica è piuttosto recente e per alcune applicazioni mancano dei materiali adsorbenti adatti.

## μSPE – Micro Solid Phase Extraction



La  $\mu$ SPE è una tecnica di estrazione che presenta le stesse caratteristiche della classica SPE ma in versione miniaturizzata.

La fase sorbente viene applicata sulla punta di un puntale per micropipette, permettendo di estrarre direttamente dal campione.

Ha diversi step così come la sua versione classica (attivazione, condizionamento, carico, lavaggio, ed eluizione), che permettono la fissazione e successiva eluizione delle molecole target. A differenza delle normali SPE, il campione viene fatto passare più volte attraverso la cartuccia permettendo quindi di arricchire il campione.

Il fattore di arricchimento è minore rispetto alla MEPS ma comunque è possibile lavorare con microvolumi di campione (50-200  $\mu$ L).

# μSPE – Micro Solid Phase Extraction

## Vantaggi

- Come per la MEPS il campione è eluito completamente usando piccoli volumi di solvente (10-100 μL), a seconda del tipo di puntale utilizzato.
- La quantità di campione richiesta è 5-100 volte inferiore rispetto a quella necessaria per SPE.
- Tempi di estrazione inferiori a 5 minuti.
- La tecnica è semplice e user-friendly, potendo essere utilizzata tramite una semplice gilson.
- L'effetto matrice è abbattuto notevolmente e comparabile ai risultati che si possono ottenere con una SPE classica.

## Svantaggi

- La varietà delle fasi adsorbenti non è comparabile a quella della SPE classica.
- Si può estrarre solo un campione alla volta per operatore
- L'efficacia dell' estrazione dipende molto dall'esperienza dell' operatore.
- La tecnica è piuttosto recente e per alcune applicazioni mancano dei materiali adsorbenti adatti.



## dLLME- $\mu$ SPE applicazione: Isoprostani

### dLLME Extraction

- 0.6 gr NaCl
- 250  $\mu$ L pH 5 25mM acetate buffer
- 1mL of sample
- H<sub>2</sub>O up to 5mL

+ 0.9mL of CHCl<sub>3</sub>  
+ 0.1mL of 2-propanol  
+ 1min in vortex

10 min of ultrasonic bath

Centrifugation at 8000 rpm for  
10 min at 4°C

### $\mu$ SPE Clean-UP

1. Activation: MeOH
2. Conditioning: 90:10 pH 5 H<sub>2</sub>O:MeOH
3. Charging: 90:10 pH 5 H<sub>2</sub>O:MeOH + dried sample
4. Washing: 80:20 pH 5 H<sub>2</sub>O:MeOH
5. Elution: 50:50 pH 5 H<sub>2</sub>O:MeOH

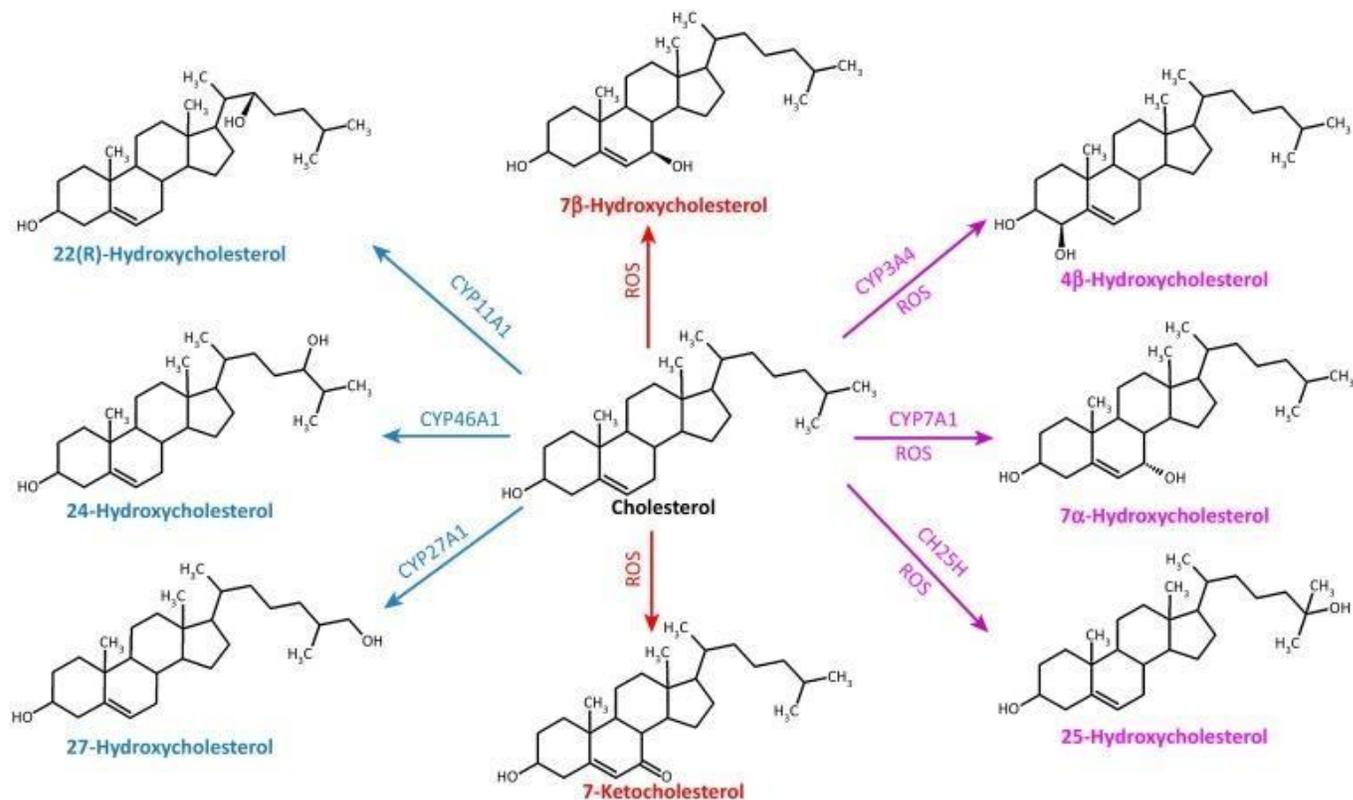
UHPLC-ESI-MS/MS

# μSPE applicazione: Ossisteroli

Sono derivati ossidati del colesterolo, marcatori secondari di ossidazione

Vengono chiamati anche Cholesterol Oxydated Products (COPs)

COPs possono essere prodotti sia per via **enzimatica**, **non-enzimatica**, o **mista** ma possono essere anche assunti con la dieta



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Talanta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/talanta](https://www.elsevier.com/locate/talanta)

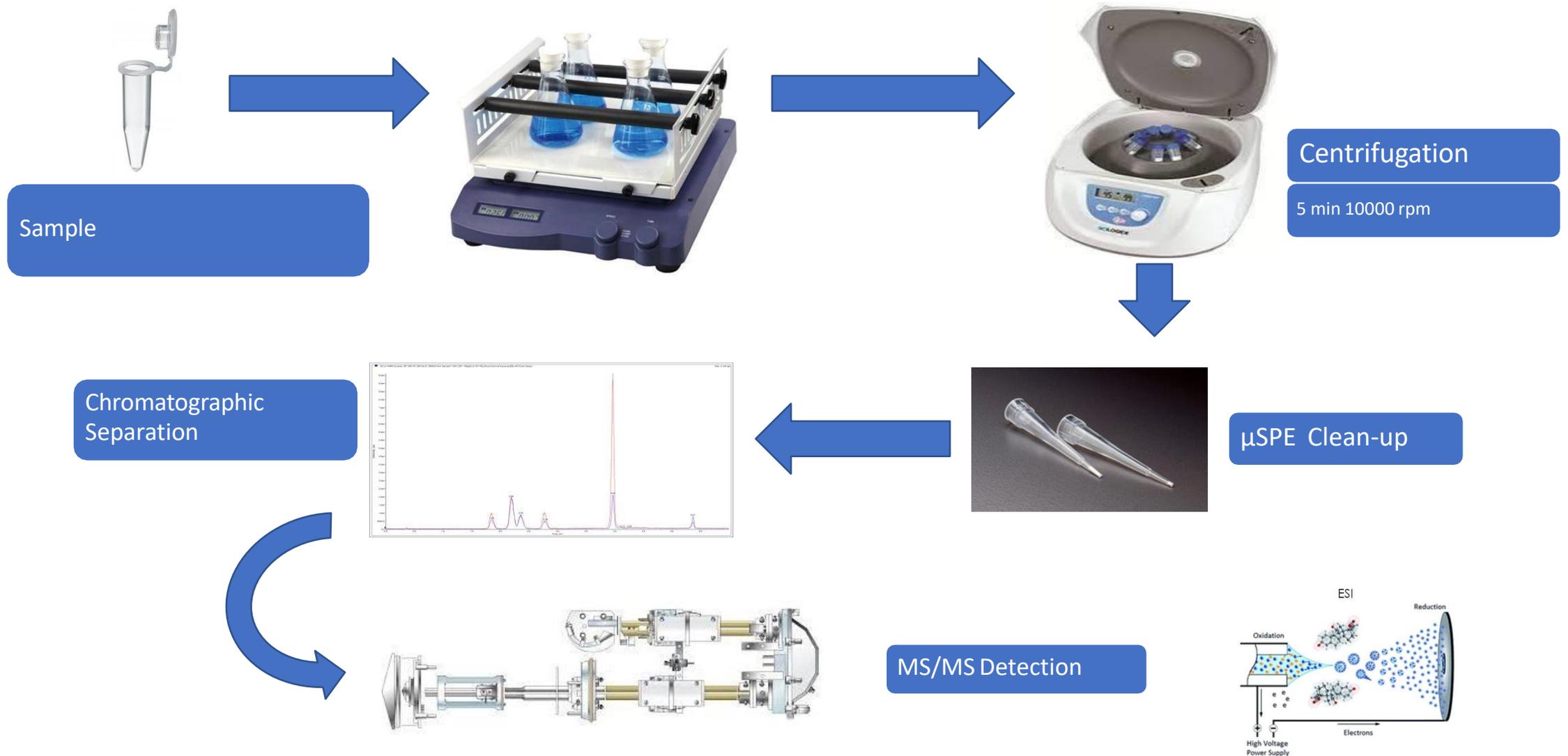


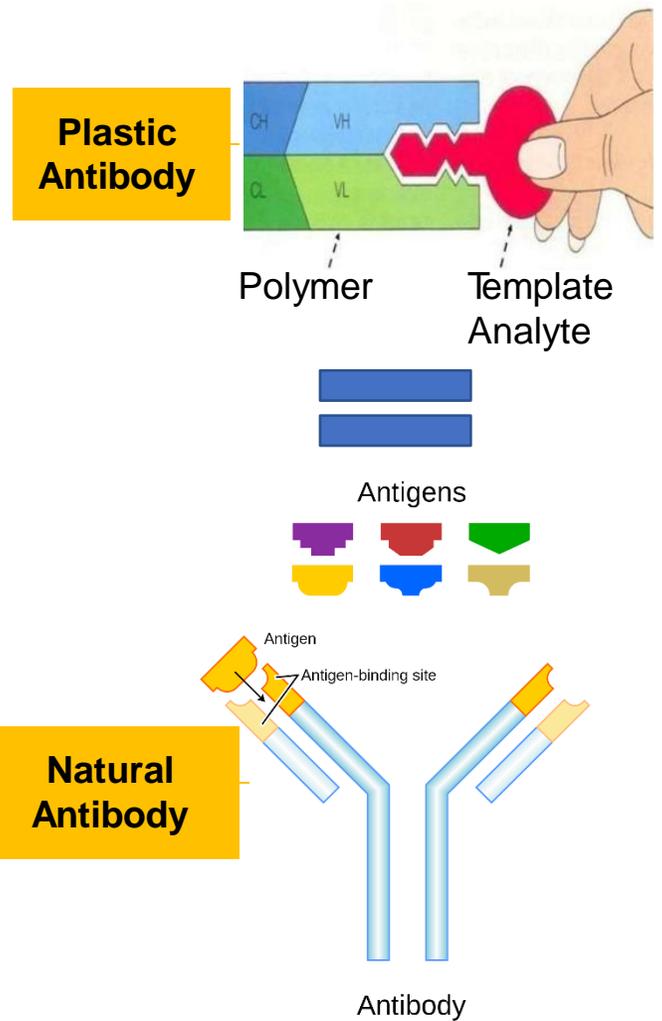
Quantitative analysis of oxysterols in zebrafish embryos by HPLC-MS/MS

F. Fanti, C. Merola, A. Vremere, E. Oliva, M. Perugini, M. Amorena, D. Compagnone, M. Sergi\*

University of Teramo, Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, 64100 TE, Italy

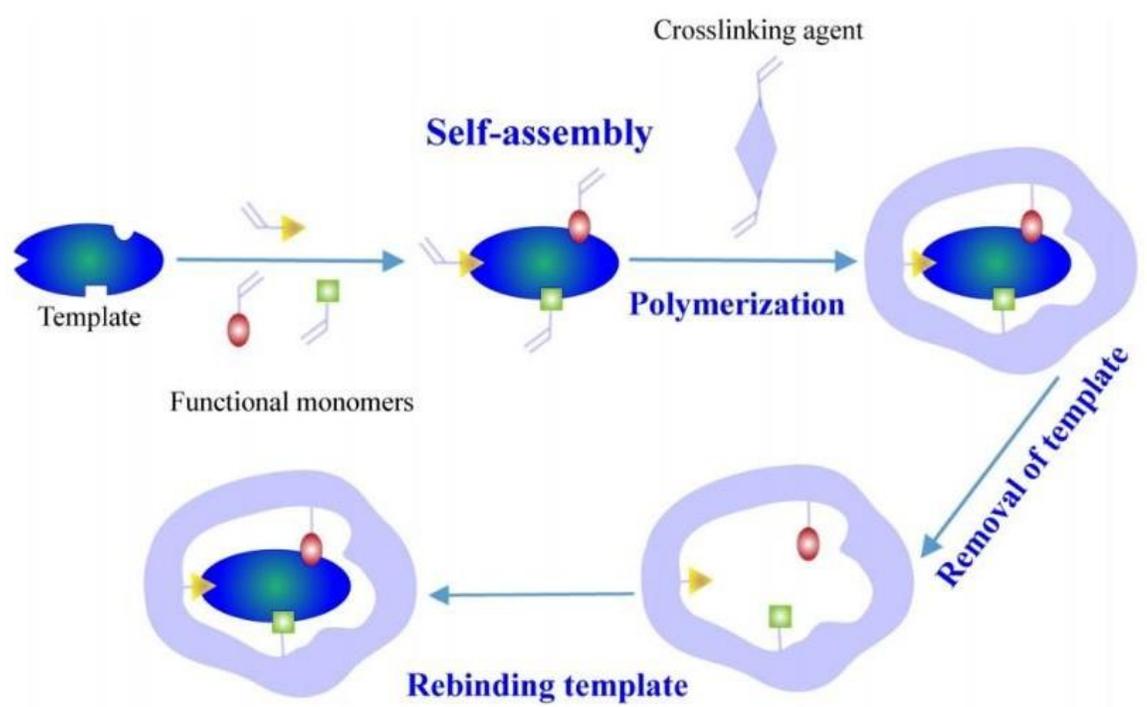
# μSPE applicazione: Ossisteroli





Molecularly imprinted polymers (MIPs) are synthetic receptors for a targeted molecule. As such, they are analogues of the natural antibody–antigen systems

DOI: 10.1021/acs.chemrev.8b00171 Chem. Rev. 2019, 119, 94–119



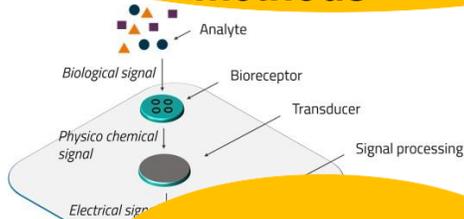
Scheme 1. Schematic representation of the synthesis of molecularly imprinted polymers (MIPs).

Abdellatif Ait Lahcen[a] and Aziz Amine\*[a], 2018

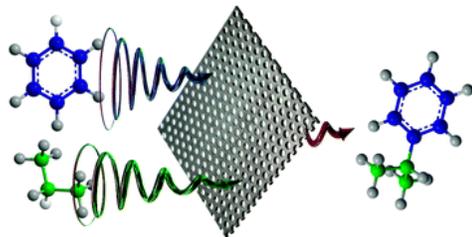
## MIPs Applications

MIPs are excellent materials with high selectivity and are widely used for:

Sample preparation in bio analytical methods

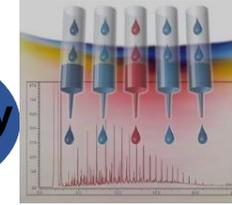


Sensors applications



Catalysis

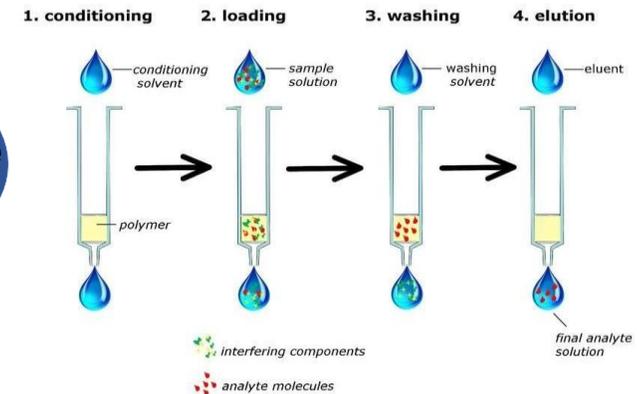
Chromatography



Drug delivery



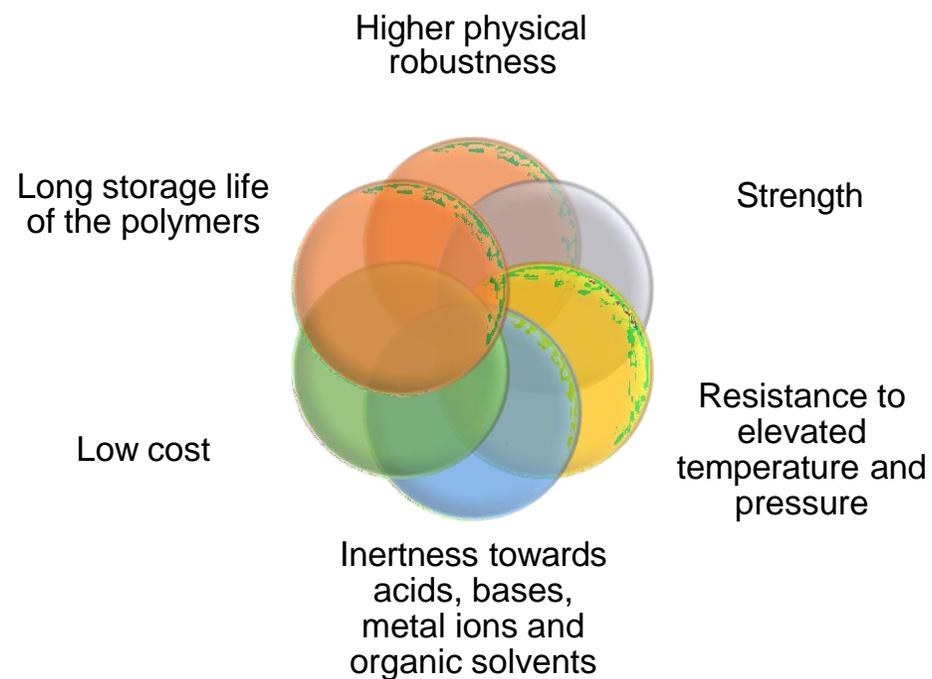
Solid phase extraction



## Advantages of MIPs

- ❖ High **selectivity** and **affinity** for the **target molecule** used in the imprinting procedure.

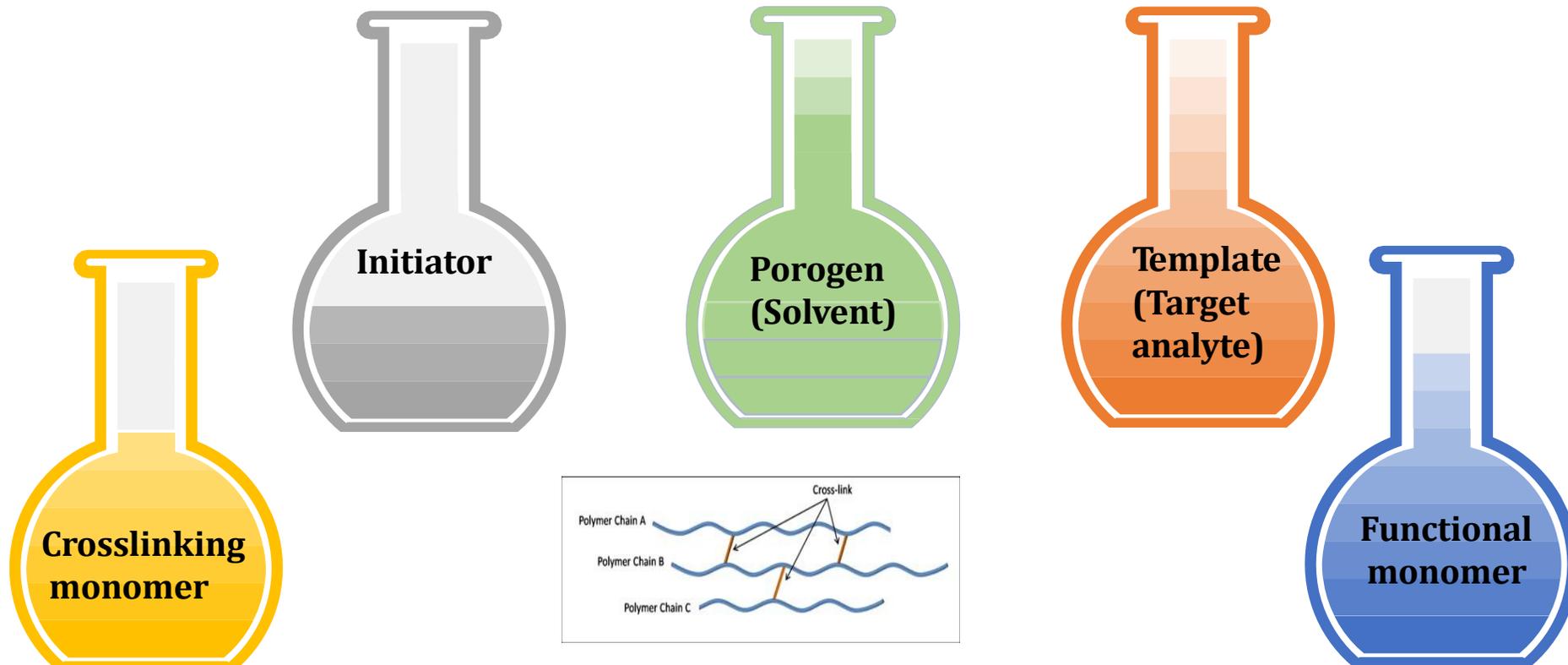
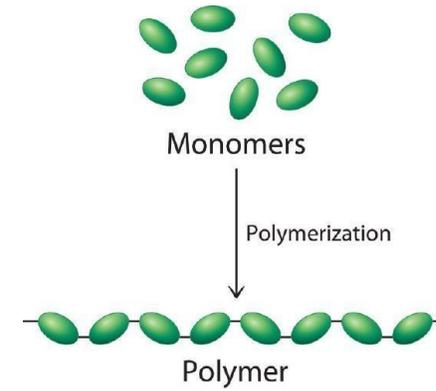
Compared to biological systems such as proteins and nucleic acids MIP has:



## 02 MIP-State of the art

MIPs Synthesis

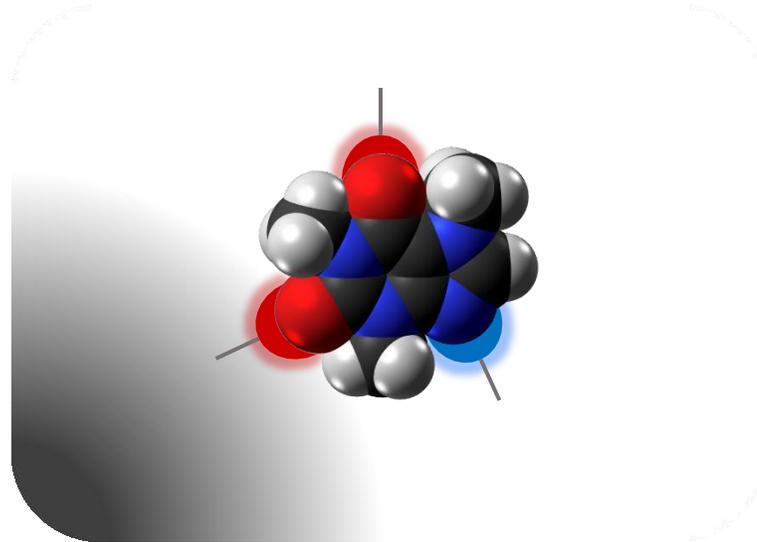
Components of MIP Mixture



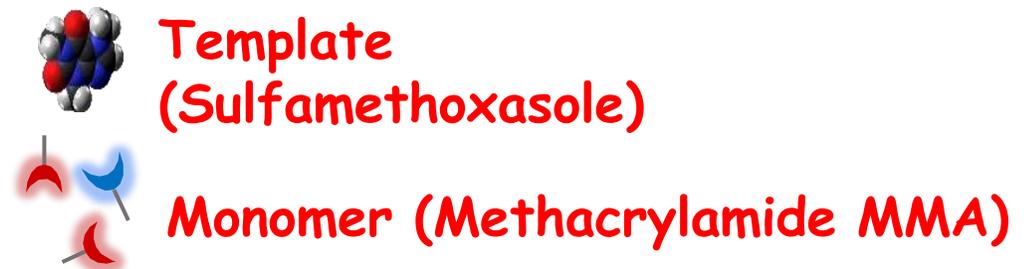


# MIP synthesis

*Sulfamethoxazole  
MIPs Synthesis*

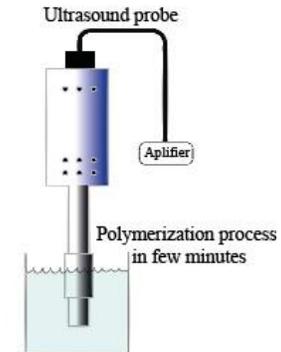
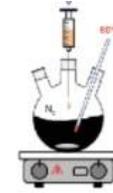
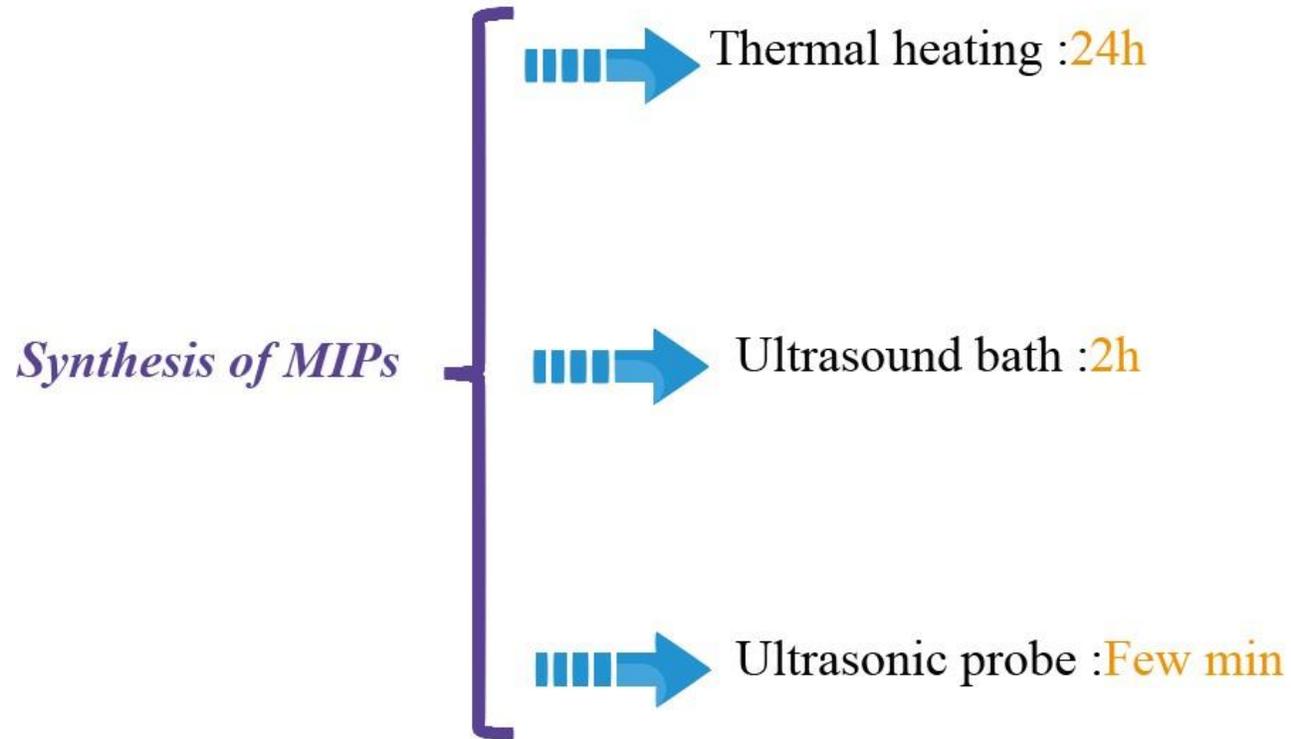


**Selective rebinding**



# MIP-Synthesis

*MIPs Synthesis*



## 03 MIP-Synthesis

*Theoretical optimizations prior to MIP s synthesis*

### *Selection of the functional monomer*

Prepolymer	E <sub>Monomer</sub> (Hartree)	E <sub>Complex</sub>	$\Delta E$ (kcal/mol)
<b>Sulfamethoxazole:SMX</b>	-1169.32	-	
SMX-Acrylamide	-245.92	-1415.29	-31.37
SMX- 4-vinyl pyridine	-323.88	-1493.25	-31.37
SMX-Methacrylic acid	-304.788	-1474.13	-13.80
<b>SMX-Methacrylamide</b>	<b>-285.03</b>	<b>-1454.41</b>	<b>-37.65</b>

### *Selection of the solvent*

Complexes monomer-template-solvent	E <sub>complex</sub> (Hartree)
SMX- Methacrylamide-ETOH	<u>-1608.60</u>
<b>SMX- Methacrylamide-DMSO</b>	<u><b>-2004.76</b></u>
SMX- Methacrylamide-DMF	<u>-1701.53</u>
SMX- Methacrylamide-ACETONE	<u>-1646.392</u>
SMX- Methacrylamide-ACETONITRILE	<u>-1586.45</u>
SMX- Methacrylamide-TOLUENE	<u>-1724.49</u>
SMX- Methacrylamide-WATER	<u>-1530.38</u>
SMX- Methacrylamide-METHANOL	<u>-1569.47</u>

Methacrylamide -SMX have highest interaction energy in DMSO solvent due to the formation of a more stable complex.

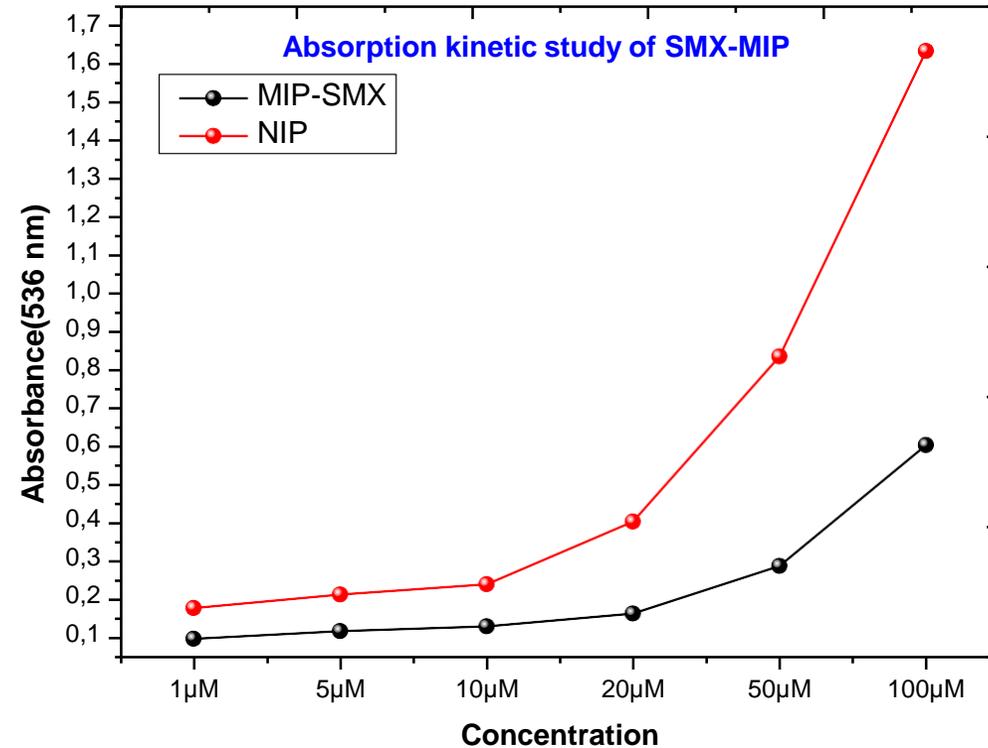
# MIPs synthesis optimizations

Optimization of time and amplitude of synthesis was done to select the best parameters for MIP-Ultrasound probe synthesis

	Parameters	Comment	Polymer quality
MMA -MIP 22-07-2020	10 MIN /20A	Polymer was formed	++
MMA -NIP 22-07-2020	10 MIN /20A	Polymer was formed	++
MMA -MIP 23-07-2020	7.5MIN /30A	Polymer was formed	+++
MAA-NIP 23-07-2020	7.5MIN /30A	Polymer was formed	+++
MMA-MIP 23-07-2020	5 MIN /20A	Polymer was formed	++++
MMA-NIP 23-07-2020	5 MIN /20A	Polymer was formed	++++

5 min as time of synthesis and 20 as pulse amplitude was selected

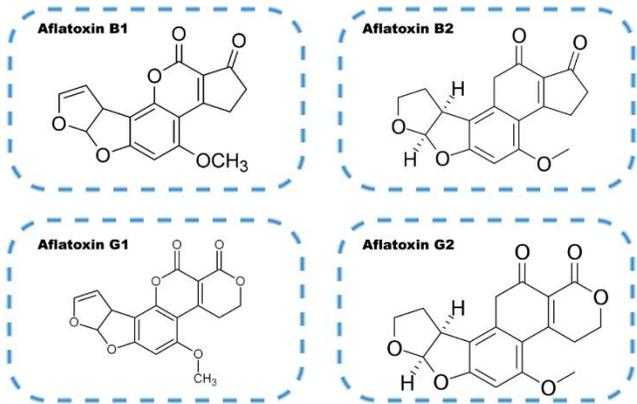
Graph of the un-retained template



MIP has higher capacity to capture the template compared to non imprinted polymer

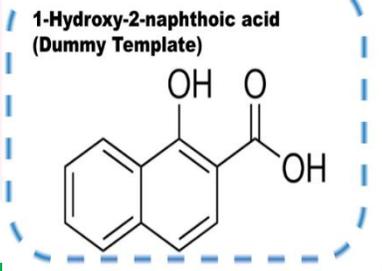
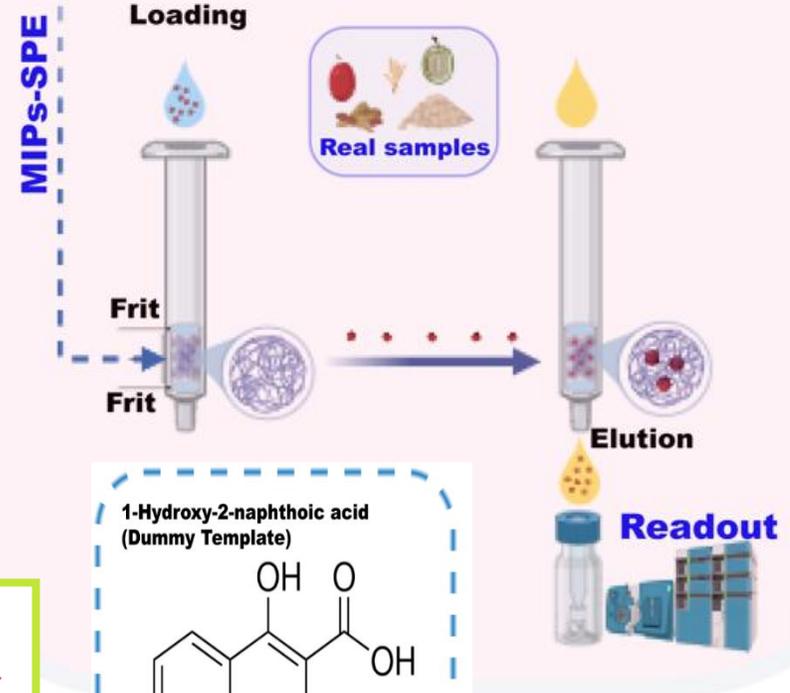
# MIP-Mycotoxins : Aflatoxins

Commercial immunoaffinity column  
for Aflatoxins



Vs

## MIPs-Aflatoxins synthesis

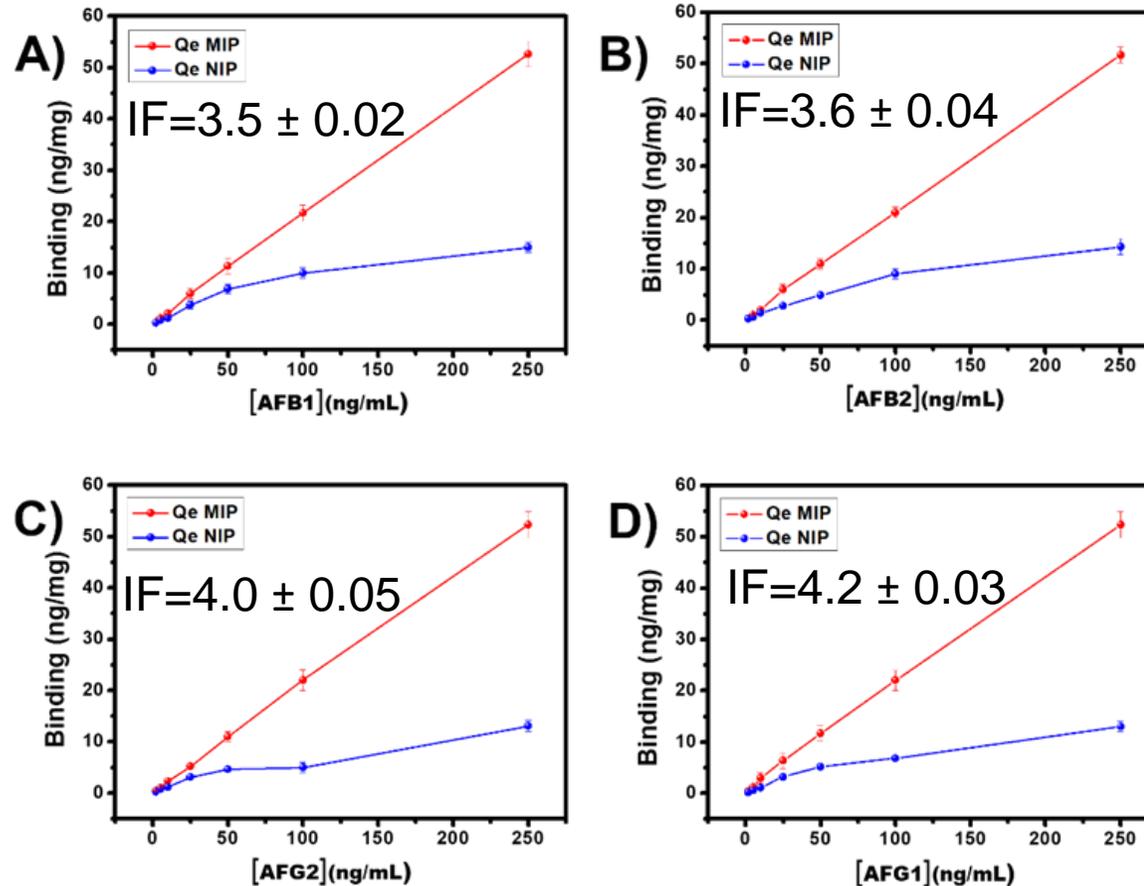


**Aflatoxins**

MRL of AFG1, AFG2, AFB1, and AFB2  
for processed food at **2 µg/kg**

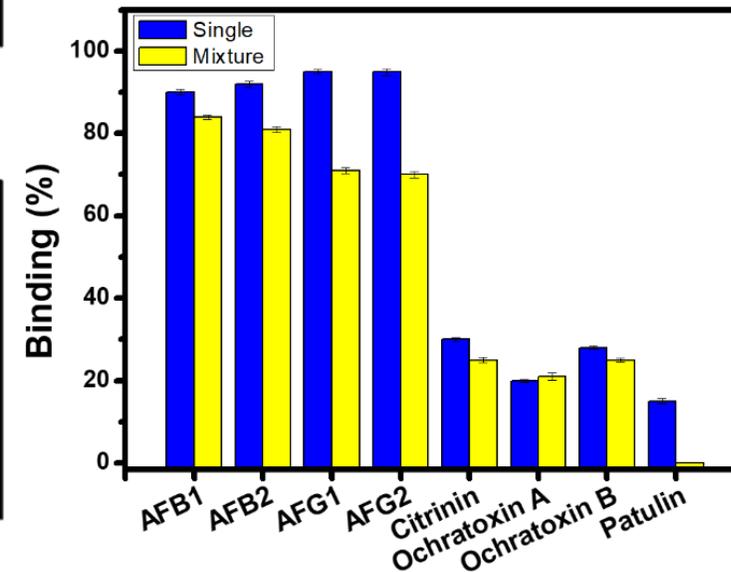
## 03 MIP-Mycotoxins : Aflatoxins

### ► Adsorption performance



**Figure.** Adsorption capacity (%) of the MIPs (red) and NIPs (blue) obtained analyzing different aflatoxin amounts (from 2 to 250 ng/mL). Graphs (A–D) correspond to aflatoxins B1, B2, G1, and G2, respectively.

### ► Selectivity



**Figure.** Selective adsorption of MIPs at a concentration of 5 ng/mL.

### 03 MIP-Mycotoxins : Aflatoxins

**Table.** Data obtained analyzing food samples using the MIPs-based and IAC-based procedures.

Sample	AFG1		AFG2		AFB1		AFB2									
	MIPs-SPE (%)		MIPs-SPE (%)		MIPs-SPE (%)		MIPs-SPE (%)									
	RC	ME	RC	ME	RC	ME	RC	ME								
Ginger	60	+9	50	-30	63	-6	48	+28	64	-1	50	+25	81	-14	52	+30
Echinacea purpurea	83	+9	73	+15	66	+10	75	+15	90	-1	80	+10	60	-8	72	+12
Ginseng	75	+16	66	-26	60	+1	46	-23	90	+7	67	-28	78	+15	61	-29
Hypericum	50	+15	50	27	60	+15	38	+30	53	+11	52	+25	72	+1	50	+30
Red elm	77	+10	64	+5	70	+7	63	+15	90	-4	80	+10	74	-6	80	+8
Saffron	61	+16	60	+12	69	+11	62	+20	60	+15	60	+17	68	+9	64	+15
Mango	67	+10	65	+15	65	+7	60	+15	65	+10	70	+15	65	+10	68	+12
Red rice	76	+11	50	+25	65	+15	55	+20	89	+3	65	+20	70	+9	66	+20
Parsley	60	+9	50	+30	60	+10	40	+30	76	+1	45	+28	60	+4	43	+19
Red fruits	60	+7	55	+20	60	+10	56	+21	79	+6	60	+18	60	+10	58	+22
Grapefruit	61	+11	65	+15	69	+11	70	+12	68	+12	70	+15	71	+4	68	+16
Magnolia	61	-7	50	+30	64	+12	50	+20	64	+15	50	+18	77	+8	54	+20
Tilia cordata	60	+1	50	+20	62	+12	45	+18	62%	+11	50	+19	72	+2	50	+20
Salsapariglia root	62	+3	55	+20	67	+6	52	+18	72	+15	50	+20	69	+14	70	+17
Hop	60	+2	50	+20	72	+12	51	+20	74	+15	60	+17	57	+12	67	+18
Verbena officinalis	72	+5	56	+18	60	+15	55	+21	69	-8	67	+18	65	+13	66	+16
Galega officinalis	78	+4	64	+15	77	+17	65	+20	73	+14	65	+20	75	+3	74	+20

**Appreciable recoveries  
(65–90%; RSD < 6%,  
n = 3)**

**low matrix effect  
(ME < 15%)**



**RC:**Recovery  
**ME:**Matrix effect  
**IAC:** Commercial immunoaffinity column

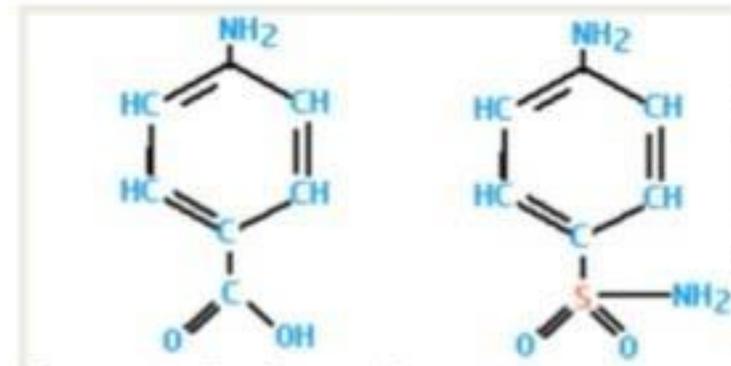
# Sulfonamides

## DESCRIPTION

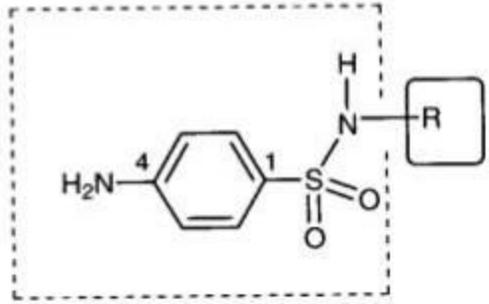
- One of the oldest antibacterial agents used for infections
- -Used for coccal infection in 1935
- -They are bacteriostatic because it inhibits bacterial synthesis of folic acid
- -Clinical usefulness has decreased because of the effectiveness of other antibiotics and penicillin

## Mechanism of action

- Structural analogs of para-aminobenzoic acid (PABA)
- Inhibit dihydropteroate synthase - needed for folic acid synthesis
- Prevent normal bacterial utilization of PABA for the synthesis of folic acid

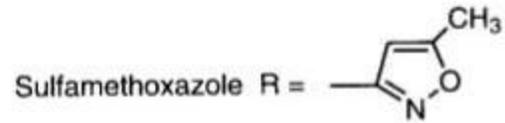
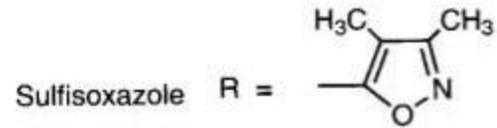


# Basic Structure of sulfonamide

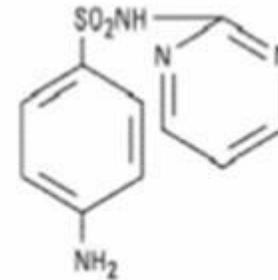


The chemical modification of this part of the molecule increases activity and modifies some pharmacological properties.

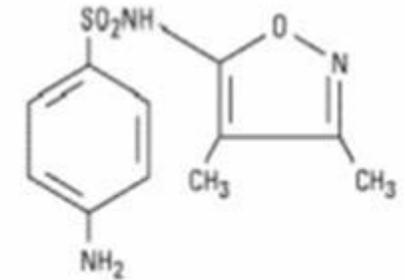
This part of the molecule cannot be modified chemically without loss of antibacterial activity.



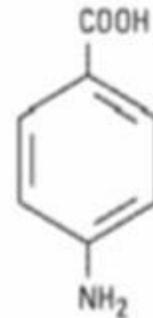
Sulfanilamide



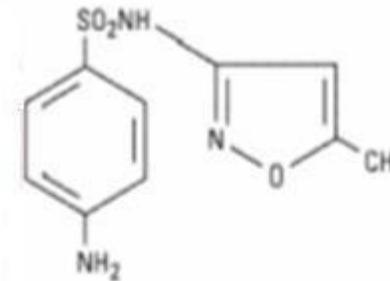
Sulfadiazine



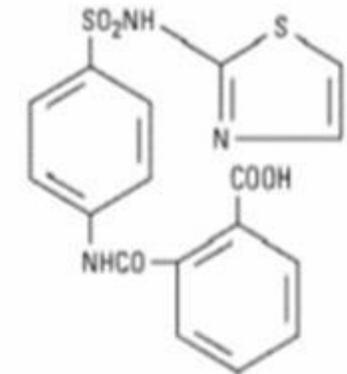
Sulfisoxazole



p-Aminobenzoic acid (PABA)



Sulfamethoxazole



Sulfathalidine  
(phthalylsulfathiazole)

## Pharmacokinetics

- Sulfonamides are
  - usually **not given topically**, because of the risk of sensitization and allergic reactions
  - **readily absorbed** in the G.I.T and reach maximum concentrations in the plasma in 4-6 h
  - **cross the placental and blood-brain barriers** and available free in inflammatory site
  - metabolised in liver by acetylation (**N-acetylation**)
  - excreted by the kidney through glomerular filtration (Metabolites are insoluble in urine, hence **crystalluria** can occur)



Falk, H. B., & Kelly, R. G. (1965). An automated method for the determination of sulfonamides in plasma. *Clinical chemistry*, 11(12), 1045-1050.

Bevill, R. F., Schemske, K. M., Luther, H. G., Dzierzak, E. A., Limpoka, M., & Felt, D. R. (1978). Determination of sulfonamides in swine plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(5), 1201-1203.

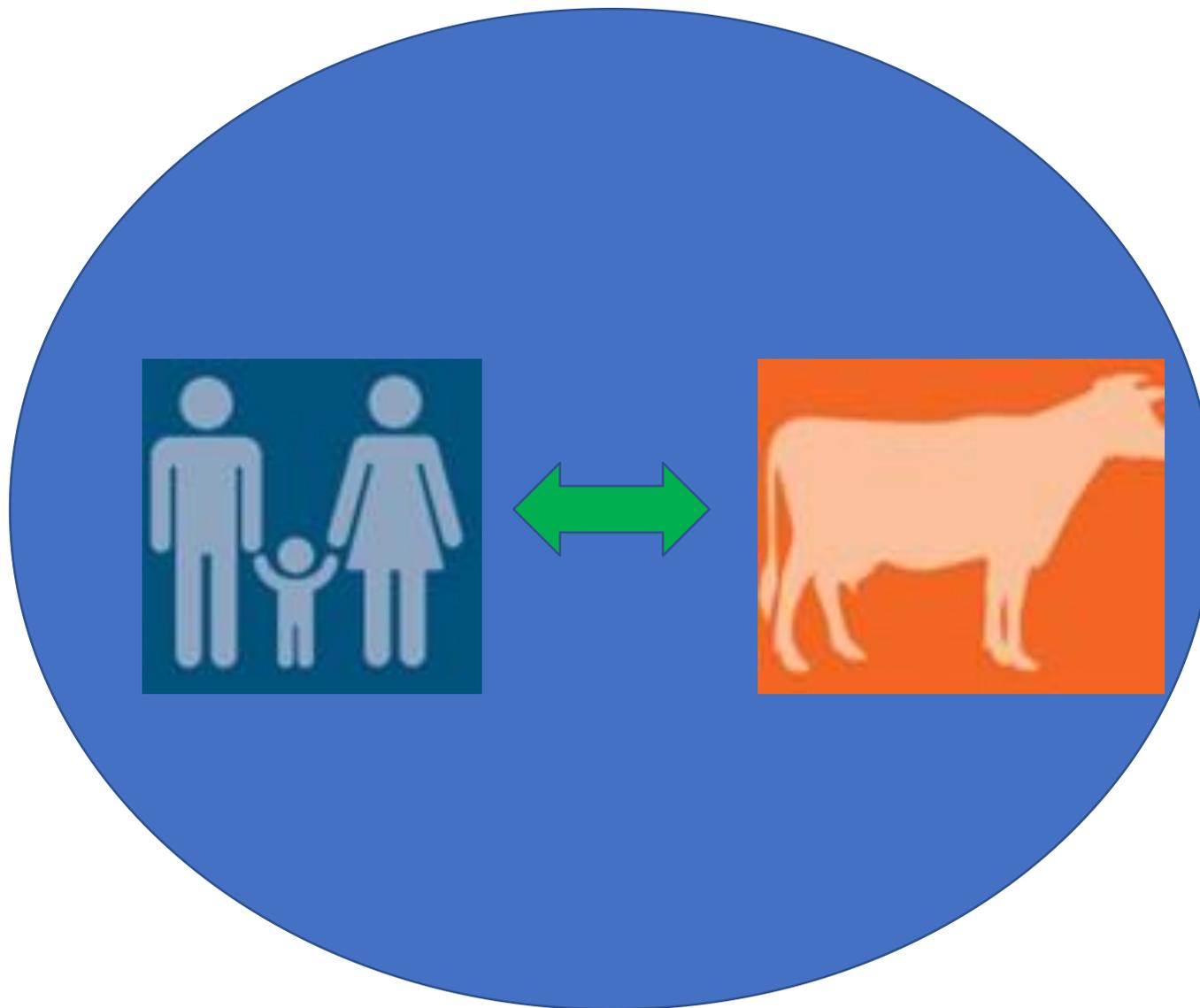
## ECOTOXICITY OF ANTIBIOTICS IN WASTEWATER



Sun, L., Chen, L., Sun, X., Du, X., Yue, Y., He, D., ... & Ding, L. (2009). Analysis of sulfonamides in environmental water samples based on magnetic mixed hemimicelles solid-phase extraction coupled with HPLC–UV detection. *Chemosphere*, 77(10), 1306-1312.

Luo, Y. B., Shi, Z. G., Gao, Q., & Feng, Y. Q. (2011). Magnetic retrieval of graphene: extraction of sulfonamide antibiotics from environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(10), 1353-1358.

# Human and Veterinary Drugs





## **LAB-EXPERIENCE INTRODUCTION**

## A) Sample Treatment



Unknown sample



## B) Sample Weight

## Sample Weight

5 mg



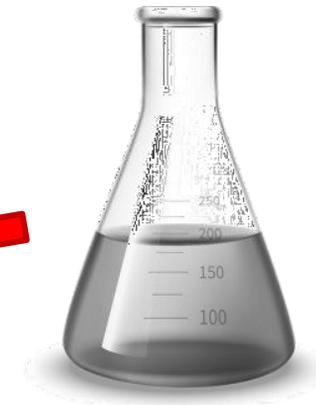
## C) Add Solvent

## Add Solvent

1 mL



Vortex



[C]=???  
mg/mL

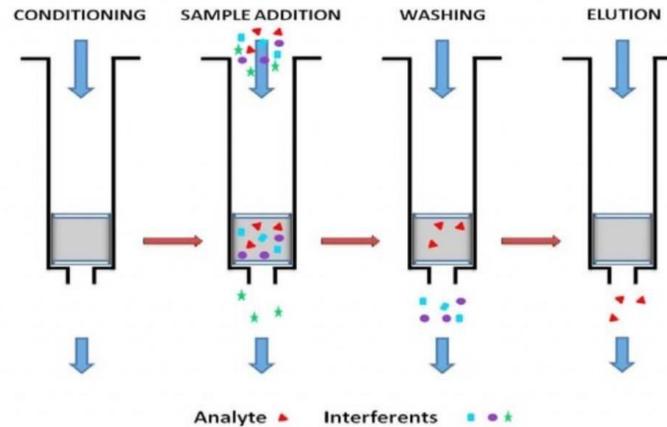
# Sample extraction: Solid Phase Extraction (SPE)

## Samples



The C18 solid phase extraction (SPE) cartridge uses octadecyl silica as a filler to retain non-polar compounds by strong hydrophobic interaction. The filler retains most of the organic matter and is widely used in fields of pharmaceutical, environment and food safety.

**MIP-SPE** consists of a solid phase extraction with a sorbent phase composed of MIP. The Mip was synthesized as molecule template, sulfamethoxazole with magnetic nanoparticles that increase the extraction capacity and the speed of extraction. The Mip is selective with the molecule template.



Schematic representation of SPE clean-up procedure



MIP (POWDER)



# Sulfonamides detection

## Colorimetric assay

Procedure:

-Add 300  $\mu\text{l}$  of SMX at 20 o 80  $\mu\text{M}$

-Add 167  $\mu\text{l}$  of HCl (1 M)

-Add 167  $\mu\text{l}$  of SN (Sodium nitrate) (1 M)

5 minutes

- Add 167  $\mu\text{l}$  of SA (2%)

-Add 167  $\mu\text{l}$  of NED (1M)

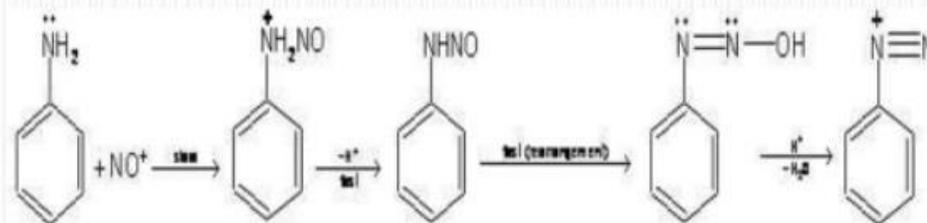


$\lambda_{\text{max}}$  of 536 nm

This method is based on the Bratton-Marshall reaction, which involves the diazotization of sulfonamides with sodium nitrite under acidic conditions, followed by coupling with N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) to form a pink colored compound.

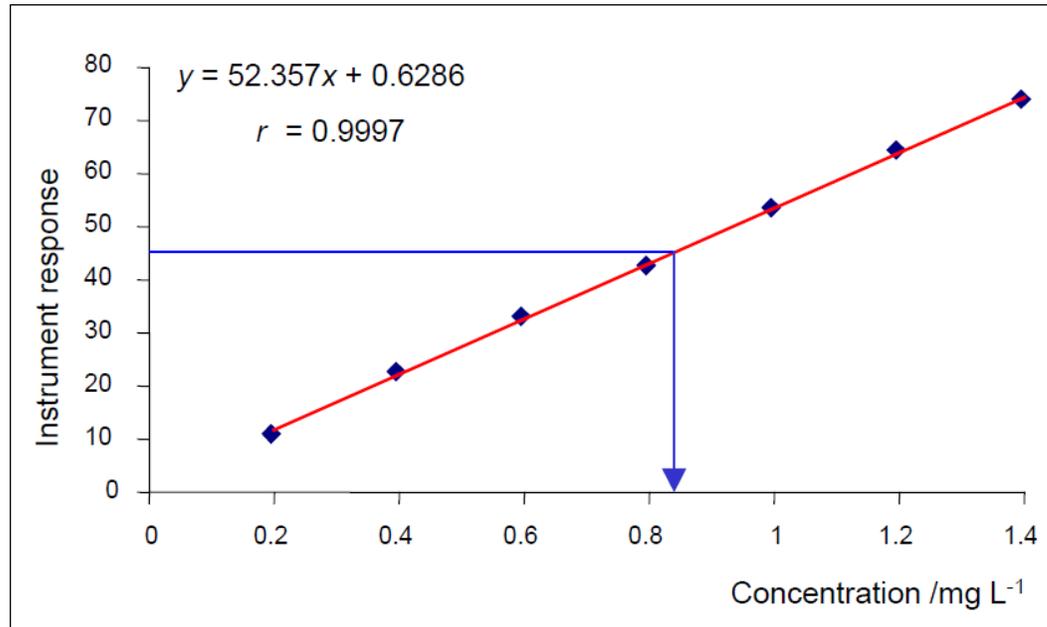
## Diazotization

- When aromatic primary amines with nuclear  $-\text{NH}_2$  groups can be determined quantitatively by standard sodium nitrite solution required to convert them into diazonium salts.



## Dose-response curve construction and sample evaluation

Dose-response curve  
Absorbance vs. [Standard]



● Unknown sample

