

**AISLAMIENTO DE ARSENOAZÚCARES A PARTIR DE ALGAS:
HPLC PREPARATIVA Y EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**

Alba Morales-Rodríguez^{1,2}, Àngels Sahuquillo¹, Dolores Barrón², José Fermín López-Sánchez¹

¹Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica, Universitat de Barcelona

²Departament de Nutrició, Ciències de l'Alimentació i Gastronomia, Campus de l'Alimentació de Torribera, Universitat de Barcelona

Introducción

Los seres humanos están expuestos al arsénico (As) presente en el medio ambiente, como es bien sabido principalmente a través de la ingesta de alimentos y agua (Chung et al., 2014; Panel de la EFSA sobre contaminantes en la cadena alimentaria (CONTAM), 2009). Debido a la diferente toxicidad de las especies de arsénico, la especiación del As en los productos alimenticios es de suma importancia. El arsénico inorgánico (iAs, arsenito y arseniato) se considera la forma más peligrosa debido a su disponibilidad biológica, así como a sus efectos fisiológicos y toxicológicos (iAs se clasifica como un carcinógeno humano sin umbral, clase 1) (Perfil toxicológico de la ATSDR para el arsénico, 2007). Más recientemente, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) también ha clasificado el ácido metilarsónico (MA) y el ácido dimetilarsónico (DMA) como posiblemente cancerígenos para los seres humanos (Grupo 2B), y a la arsenobetaína (AB) y otros compuestos orgánicos de arsénico, como no clasificables en cuanto a su carcinogenicidad para los seres humanos (Grupo 3) (IARC, 2012). Entre otros compuestos orgánicos de arsénico, los arsenoazúcares, que generalmente se encuentran en las algas comestibles como especies mayoritarias, son potencialmente tóxicos (Feldmann y Krupp, 2011; Herath et al., 2018). Por lo tanto, para establecer los posibles niveles máximos tolerados en las directivas alimentarias es imprescindible tener en cuenta las diferencias de toxicidad de las diferentes especies.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) evalúa periódicamente la exposición alimentaria a iAs en la población de la Unión Europea (EFSA 2009; EFSA, 2014; Arcella, 2021), principalmente sobre la base de la presencia de As en el agua potable, productos lácteos y cereales, siendo el arroz, una de las fuentes más importantes de exposición. Además, en Estados Unidos, los informes de evaluación del riesgo de arsénico involucraron únicamente especies de arsénico presentes en el arroz y productos de arroz como iAs, y formas metiladas, monometilarsénico (MMA) y DMA (USFDA, 2016). Las recomendaciones finales de estos informes incidían en la necesidad de metodología analítica robusta, sobre todo en matrices complejas como hongos y algas. Estos informes también destacan que los datos disponibles en la actualidad y los resultados de las investigaciones publicadas no están lo suficientemente desarrollados para ser útiles en la

evaluación cuantitativa del riesgo. Con el objetivo de mejorar la evaluación de riesgos es necesario producir datos de especiación para diferentes productos alimenticios y, con este propósito, se debe poder disponer de métodos analíticos robustos validados y materiales de referencia certificados (MRC) adecuados para la especiación de arsénico. La falta de información fiable ha imposibilitado el establecimiento de regulaciones específicas para las especies de As relevantes en los alimentos, excepto la relativa al arsénico inorgánico en el arroz (Reglamento de la Comisión UE 2015/1006, de 25 de junio de 2015).

Con respecto a otros productos alimenticios, el consumo de algas ha aumentado en los últimos años debido a sus beneficios funcionales y nutricionales (Wells et al., 2017; EFSA, 2019). La acuicultura está creciendo más rápido que otros sectores importantes de producción de alimentos, siendo la actividad principal la recolección de algas marinas con un volumen de producción total de algo más de 30 millones de toneladas en 2016 (informe de la FAO, 2018). También es bien sabido que las algas se utilizan como indicadores ambientales debido a su capacidad para acumular multitud de oligoelementos. Son capaces de acumular y metabolizar arsénico y se usan en estrategias de eliminación de arsénico en aguas (Al Mamun, 2019; Hussain et al., 2021) pero también se están convirtiendo en una fuente de arsénico contribuyendo a la exposición al arsénico debida a la dieta. Por ejemplo, hidratar o cocinar macroalgas disminuye su contenido total de As e iAs en más del 50% debido al proceso de lixiviación en el agua que se puede consumir en una comida como sopa (Ownsworth, 2019). En consecuencia, existe un gran interés en la evaluación de sus posibles efectos adversos en relación con la seguridad de los consumidores. En las algas predominan los derivados de la ribosa cuya estructura se presenta en la Figura 1 y que son comúnmente conocidos como arsenoazúcares (Sahuquillo et al., 2017).

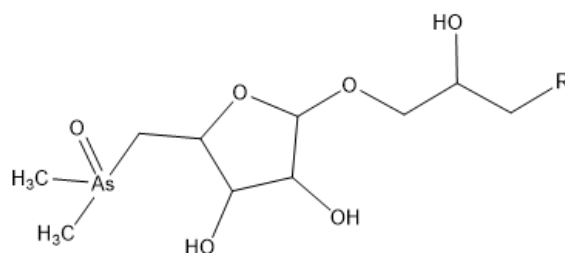


Figura 1. Estructura de los arsenoazúcares:
 $PO_4\text{-sug}$, $R = OPO_3CH_2CH(OH)CH_2OH$
 $SO_3\text{-sug}$, $R = SO_3H$
 $SO_4\text{-sug}$, $R = OSO_3H$

Si bien parece que los arsenozúcares no son agudamente tóxicos, existe la posibilidad de presentar una leve toxicidad crónica y, debido al alto consumo de algas marinas, es necesaria la valoración de la exposición a los arsenozúcares (Andrewes, 2004) y, hasta ahora, la información fiable sobre su potencial toxicidad es escasa y controvertida (Ardini et al., 2020). El análisis de estos compuestos se ve dificultado por sus similares propiedades físico-químicas y por la dificultad de obtención de patrones de calibración que permitan su correcta identificación y cuantificación (Luvonga et al., 2020).

Tanto la obtención de datos fiables de especiación para evaluar la exposición alimentaria como el aumento de la comprensión de la bioquímica del arsénico en las algas se ven obstaculizados por la escasa disponibilidad de estándares adecuados que deben obtenerse para cada estudio a pequeña escala (Glabonjat et al., 2018). Se han publicado síntesis químicas de algunos arsenozúcares, pero son complejas y tediosas. Como ejemplo, las rutas sintéticas descritas para el azúcar As-sulfonato ($\text{SO}_3\text{-sug}$) y el azúcar As-sulfato ($\text{SO}_4\text{-sug}$) proporcionaron un rendimiento general del 5% e involucraron 10 pasos (Traar, 2006). También se han descrito algunos intentos de preparar soluciones de una única especie de arsénico mediante la extracción de diferentes algas, seguidas de pasos de purificación y limpieza que permiten obtener soluciones cromatográficamente puras (Niegel y Matysik, 2010). En la actualidad, no existen estándares de calibración de arsenozúcares disponibles comercialmente. Además, la disponibilidad de materiales de referencia certificados con fines de validación de métodos es escasa y los datos publicados solo se pueden encontrar con respecto a algunos contenidos de arsenozúcares As-fosfato ($\text{PO}_4\text{-sug}$) y $\text{SO}_3\text{-sug}$ en un suplemento dietético de algas marinas (*Thallus laminariae*) (SRM 3232) de NIST (Yu et al., 2017, 2018) y, recientemente se han publicado resultados preliminares sobre un nuevo candidato a material de referencia (algas marinas Hijiki) para arsenozúcares (Narukawa et al., 2020). Además, algunas revisiones recientes destacan que la disponibilidad de estándares y materiales de referencia para compuestos de arsénico orgánico es crucial para llenar la brecha de datos necesaria para abordar el riesgo para la salud humana de la exposición al arsénico orgánico (Taylor, 2017; Luvonga et al., 2020; Ardini et al., 2020; Clough et al., 2021).

En esta comunicación se abordan dos aproximaciones para conseguir el aislamiento de los arsenozúcares, la primera basada en la utilización de la cromatografía preparativa de alta resolución (Yu et al., 2020) y la segunda basada en la extracción en fase sólida (Morales-Rodríguez et al., 2022).

Las muestras de algas utilizadas en estos estudios se compraron en tiendas locales especializadas en Barcelona (España). Las muestras se venden como suplementos alimenticios. Todas las muestras son de la

especie *Fucus vesiculosus* que se presentan en dos formas diferentes: granulados o porciones secadas a baja temperatura. Los gránulos se pulverizaron finamente en un mortero de vidrio. Las porciones secas son muy duras y requirieron el uso de un molino de anillos de carburo de tungsteno. Los polvos finos resultantes se homogeneizaron manualmente y se almacenaron en recipientes de polietileno a temperatura ambiente hasta su análisis.

Cromatografía preparativa

Los experimentos se centraron en probar la capacidad de la cromatografía preparativa para aislar arsenozúcares mediante fraccionamiento. Estudios preliminares realizados por el grupo de investigación mostraron que se podría lograr una buena separación utilizando una disolución de bicarbonato amónico como fase móvil. Se escogió el hidrógeno carbonato de amonio para la cromatografía preparativa con el objetivo de que las fracciones aisladas fueran más compatibles con detectores de espectrometría de masas molecular con fines de caracterización.

El fraccionamiento de los extractos acuosos de una muestra seleccionada y de una disolución estándar que contenía las especies de arsénico disponibles se llevó a cabo con una columna de intercambio aniónico preparativa (Hamilton PRP-X100, 250 mm de longitud, 21.5 mm de diámetro interno y tamaño de partícula del relleno de 12-20 μm), se recogieron sesenta fracciones durante una hora de elución (una fracción de 5 mL cada minuto) y se analizaron para determinar su contenido de arsénico total. Los resultados de dos experimentos replicados se muestran en la Figura 2.

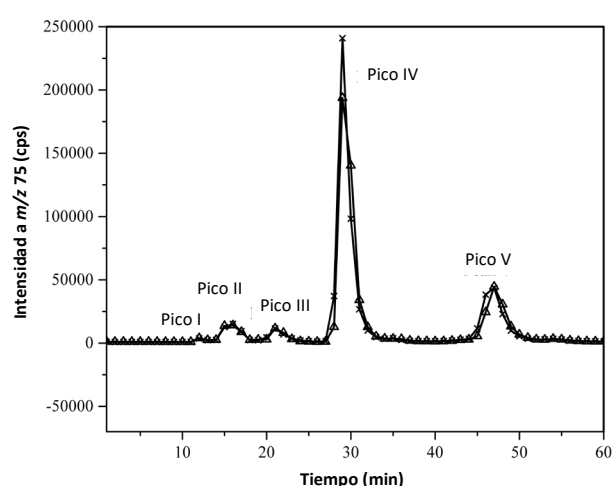


Figura 2. Contenido de arsénico en las fracciones recolectadas con cromatografía preparativa de alta resolución.

Se puede ver que el arsénico presente en el extracto de alga eluyó en cinco picos principales: Pico I correspondiente a la fracción recolectada a los 12 min ($0.34 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), Pico II correspondiente a fracciones

recolectadas del minuto 15 al minuto 17 (3.79 mg·kg⁻¹), Pico III correspondiente a fracciones de 20 a 23 min (2.72 mg·kg⁻¹), Pico IV correspondiente a fracciones recolectadas de 28 a 33 min (43.0 mg·kg⁻¹), y Pico V correspondiente a fracciones de 45 a 50 min (13,6 mg·kg⁻¹). Ambos experimentos arrojaron resultados altamente reproducibles y, en todos los casos, la recuperación de la columna preparativa fue superior al 85% con respecto al contenido total de arsénico en el extracto acuoso.

Cada pico fue analizado por HPLC-ICP-MS (Hamilton PRP-X100; 250 x 4.1 mm, 10 μm) para determinar las posibles especies de arsénico presentes. La Figura 3 muestra los resultados de especiación obtenidos, comparados con el cromatograma de una mezcla de solución estándar de especies aniónicas, y con el cromatograma de un extracto de *Fucus serratus* que se empleó para la identificación de los arsenoazúcares. Puede verse que el Pico I contenía especies catiónicas y arsénico inorgánico, el Pico II contenía As(III), cationes y DMA, y no había arsenoazúcares en los picos correspondientes a tiempos de elución más altos. El pico III contenía principalmente el azúcar (PO₄-sug) con pequeñas cantidades de MMA y, por lo tanto, no se logró el aislamiento de PO₄-sug en las condiciones de trabajo adoptadas. En contraste, los picos IV y V presentaron una única especie de arsénico correspondiente a SO₃-sug y SO₄-sug, respectivamente

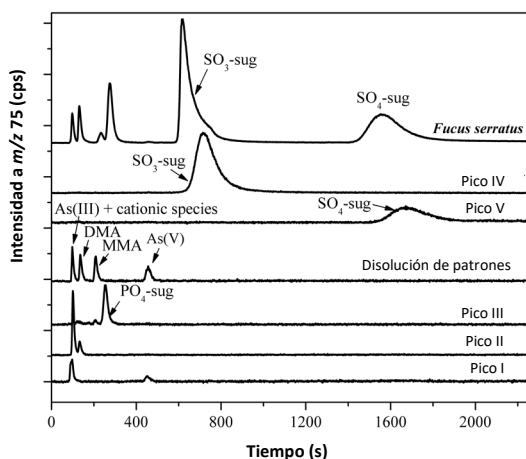


Figura 3. Análisis de especiación de las fracciones recolectadas con la cromatografía preparativa.

Para la caracterización de los arsenoazúcares aislados se empleó la espectrometría de masas de alta resolución ESI-TOF-MS (por infusión directa) que permite el cálculo de la masa exacta a partir de los datos obtenidos para el ion molecular. Para el Pico IV se propone que los iones correspondientes a m/z 393,0197 en modo positivo y m/z 391,0079 en negativo sean iones [M+H]⁺ y [M-H]⁻ de SO₃-sug. Los datos de masa experimental para estos picos de iones son consistentes con sus valores teóricos, ya que la fórmula química del compuesto C₁₀H₂₂AsO₉S obtenido coincide con el SO₃-sug. Los datos del patrón isotópico experimental del [M+H]⁺ coincidieron

exactamente con el patrón isotópico teórico que presenta un error de masa de -0,51 ppm. En ESI⁺ se observan iones de m/z de 184,0641 y m/z 130,0502, que pueden asignarse a fragmentos procedentes de SO₃-sug. Estos dos iones se producen a una intensidad relativa inferior que la del ion molecular. Se propone que el ion de m/z 130,0502 es el resultado de la escisión del anillo de ribosa y que mantiene el átomo de As. El espectro de masas con ESI⁻ muestra menos fragmentación que en ESI⁺. Los espectros de masas que se registraron para el Pico V permiten observar el ión de m/z 409,0145 en modo positivo y el ión de m/z 407,0013 en modo negativo que corresponden a los iones [M+H]⁺ y [M-H]⁻ de SO₄-sug, respectivamente. Además, la comparación de la masa obtenida con la masa teórica arroja un error de -0,17 ppm considerando que la composición elemental es C₁₀H₂₂AsO₁₀S, y los datos del patrón isotópico experimental del ion [M+H]⁺ coinciden exactamente con el teórico. En ESI⁺ se observan diferentes fragmentos entre los que destacan el ion de m/z 184,0641 que corresponde al pico base y los iones producto a m/z 329,0578 y 206,0459 mientras que en ESI⁻ se observan iones de m/z 182,0495 (pico base) y los iones a m/z 255,2339 y 309,9961 que son consistentes con la fragmentación de la estructura propuesta. Estos análisis permitieron la identificación de SO₃-sug y SO₄-sug como las únicas especies presentes en las fracciones recolectadas que contienen arsénico.

Extracción en fase sólida

Los materiales empleados en SPE comprenden desde la sílice ligada químicamente (con grupos orgánicos C8 o C18, entre otros) y los materiales de carbono o de intercambio iónico hasta los poliméricos a base de estireno-divinilbenceno. La SPE basada en resinas poliméricas permite obtener buenos resultados para extraer compuestos polares de muestras acuosas, siendo la principal desventaja de usar adsorbentes altamente reticulados su hidrofobicidad, la cual, en la extracción de los compuestos más polares, conduce a una pobre retención. Este podría ser el caso de los arsenoazúcares como se puede deducir de los valores de log P_{o/w} recogidos en la Tabla 1. Además, los arsenoazúcares son aniones en la mayoría de los valores de pH como se deduce de los valores de pK_a también recogidos en la misma tabla.

Tabla 1. Propiedades de interés de los arsenoazúcares de carácter aniónico

Arsenoazúcar	log P _{o/w}	pK _{a1}
PO ₄ -sug	-2,95	1,2 ± 0,4
SO ₃ -sug	-3,00	1,1 ± 0,4
SO ₄ -Sug	-1,82	- 3,3 ± 0,4

Por todo ello, se seleccionaron cartuchos de intercambio aniónico (DSC-SAX y DSC-NH2) como la mejor opción considerando que los compuestos de interés estarán presentes como aniones con una alta hidrofilia.

Para estudiar la interacción con los cartuchos seleccionados se utilizaron las fracciones que contenían $\text{SO}_4\text{-sug}$, $\text{SO}_3\text{-sug}$ debido a la muy baja concentración de $\text{PO}_4\text{-sug}$ en las fracciones correspondientes del alga empleada. En primer lugar, se estudió la retención de ambos arsenozúcares mediante diferentes cartuchos de SPE a base de sílice (DSC-SAX y DSC-NH2) con diferentes capacidades (0,5 y 1 g). Se observó que los cartuchos con 1 g de sorbente retenían de 4 a 6 veces más que los de 0,5 g de sorbente. Además, se estudió el efecto del pH entre valores de 6 a 10, obteniéndose que la retención de arsenozúcares fue más eficiente a pH 8. De los resultados se concluyó que los cartuchos DSC-SAX son más efectivos para los arsenozúcares estudiados. Seguidamente se ensayaron diversas disoluciones para su elución: 2 mL de NH_4Cl 2% seguido de 2 mL de NH_4Cl 5%; 4 mL de NH_4Cl 5% y 4 mL de NH_4HCOO 5%. Empleando una disolución que contiene ambos arsenozúcares, no se observaron diferencias notables en el comportamiento de los dos compuestos con el cartucho DSC-SAX con NH_4HCOO 5% para su elución. Sin embargo, la alta concentración de sal en el eluyente (NH_4HCOO 5%) genera algunos problemas cuando se analizan las especies presentes mediante IC-ICP-MS. En consecuencia, también se ensayaron diferentes concentraciones de NH_4HCOO (5, 1 y 0,5%) en el solvente de elución.

Para observar el comportamiento de los arsenozúcares, la elución se realizó en dos etapas, utilizando 2 mL de NH_4HCOO en cada una de ellas. Al variar la concentración de NH_4HCOO no existe una diferencia significativa entre los porcentajes de arsénico eluido considerando ambas etapas de elución juntas. Sin embargo, cuando se utiliza NH_4HCOO 5%, los arsenozúcares eluyen casi exclusivamente con el primer volumen de elución, mientras que con NH_4HCOO 1%, los arsenozúcares eluidos se distribuyen entre las dos etapas de elución (38% y 47% para la primera y segunda elución, respectivamente). Por el contrario, cuando se utiliza NH_4HCOO al 0,5 % como eluyente, la mayoría de los arsenozúcares eluyen en el segundo paso de elución. También se ensayó la adición de metanol con la finalidad de obtener disoluciones que se pudieran preconcentrar por evaporación a baja temperatura. Los resultados de recuperación de los diferentes procedimientos ensayados no mostraron diferencias significativas obteniéndose buenas recuperaciones para $\text{SO}_3\text{-sug}$ y $\text{SO}_4\text{-sug}$, siendo del 77-91 % y del 84-94 %, respectivamente. Para $\text{PO}_4\text{-sug}$ las recuperaciones oscilaron alrededor del 45% en todos los casos.

Teniendo en cuenta que todas las condiciones de SPE ensayadas tienen comportamientos similares, era importante comprobar la pureza de las fracciones teniendo en cuenta la obtención de una solución limpia que contuviera los tres arsenozúcares aislados de otras especies de arsénico. Una inspección cuidadosa de los cromatogramas obtenidos muestra que las soluciones

más limpias se obtienen cuando se utiliza como eluyente NH_4HCOO 0,5% en H_2O .

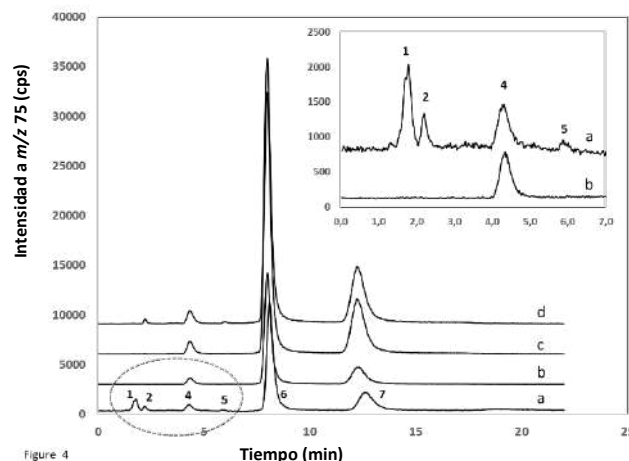


Figura 4. Análisis de especiación de las fracciones obtenidas mediante extracción en fase sólida. (a) cromatograma del extracto no tratado con SPE; (b) fracción SPE obtenida utilizando 2 mL de eluyente; (c) fracción SPE obtenida utilizando 4 mL de eluyente; (d) fracción SPE obtenida usando 6 mL de eluyente. Orden de elución: 1. Arsenito + Cationes; 2. DMA; 4. $\text{PO}_4\text{-sug}$; 5. Arseniato; 6. $\text{SO}_3\text{-sug}$; 7. $\text{SO}_4\text{-sug}$.

La Figura 4 muestra los cromatogramas obtenidos en tales condiciones recolectando diferentes volúmenes de elución (2, 4 y 6 mL) para mostrar la limpieza lograda. Con fines comparativos, también se incluye un cromatograma de la muestra extraída directamente (sin limpieza SPE). Cabe señalar que el extracto acuoso del cromatograma de muestra (a) estaba más diluido (1/10) que las soluciones obtenidas de SPE (3/10). Por tanto, la comparación directa entre el cromatograma (a) y los demás cromatogramas (b, c, d) con fines cuantitativos no es posible. El inserto muestra una ampliación de los cromatogramas del extracto directo (a) y de la disolución eluida con 2 mL (b). Como se puede observar la primera parte del cromatograma (hasta 7 minutos) está libre de otras especies de arsénico como arsenito, arseniato, formas metiladas o cationes. Este también es el caso cuando se eluye con 4 ml, pero cuando se usan 6 ml se pueden detectar pequeñas cantidades de formas dimetiladas.

Conclusión

Los resultados obtenidos en estos trabajos muestran que es posible aislar los arsenozúcares de carácter aniónico mediante técnicas preparativa y representan los primeros pasos para avanzar en la obtención de los estándares analíticos de arsenozúcares que se reclaman en la bibliografía desde diferentes ámbitos de investigación, como son la toxicología, el medio ambiente o las ciencias de la alimentación.

Bibliografía

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (2007). Toxicological profile for arsenic. United States: Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Al Mamun M.A., Omori, Y., Miki, O., Rahman, I.M.M., Mashio, A.S., Maki, T., Hasegawa, H., *Chemosphere* (2019), 228, 117-127.
- Andrewes, P., Demarini, D.M., Funasaka, K., *Environmental Science & Technology* (2004), 38, 4140-4148.
- Ardini, F., Dan, G., Grotti, M., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, (2020), 35, 215-237.
- Arcella, D., Cascio, C., Gómez-Ruiz, J.A., *EFSA Journal* (2021) 19, 6380.
- Chung, J.Y., Yu, S.D., Hong, Y.S., *Journal of Preventive Medicine and Public Health* (2014), 47, 253-257.
- Clough, R., Harrington, C.F., Hill, S.C., Madrid, Y., Tyson, J.F. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* (2021) 36, 1326-1373.
- Commission Regulation (EU) 2015/1006 of 25 June 2015 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of inorganic arsenic in foodstuffs. Official Journal of the European Union, 26.6.2015, L 161/14-16.
- European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on arsenic in food. EFSA Panel in Contaminants in the Food Chain (CONTAM), (2009), 7, 1351.
- European Food Safety Authority (EFSA). Dietary exposure to inorganic arsenic in the European population. *EFSA Journal*, (2014), 12, 3597-3665.
- European Food Safety Authority (EFSA). Analysis and Risk Assessment of Seaweed. *EFSA Journal*, (2019), 17 (S2):e170915.
- FAO report, The state of world fisheries and aquaculture (2018) ISBN 978-92-5-130562-1
- Feldmann, J., Krupp, E. M., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2011), 399, 1735-1741.
- Glabonjat, R.A., Ehgartner, J., Duncan, E.G., Raber, G., Jensen, K.B., Krikowa, F., Maher, W.A., Francesconi, K.A., *Metallomics* (2018), 10, 145-153.
- Hussain, M.M., Wang, J., Bibi, I., Shahid, M., Niazi, N.K., Iqbal, J., Mian I.H., Shaheen, S.M., Bashi, S., Shah, K.S., Hina, K., Rinklebe, J., *Journal of Hazardous Materials* (2021), 403, 124027.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts, (2012), 100C. Lyon, France, 41-93.
- Luvonga, C., Rimmer, C.A., Yu, L.L., Lee, S.B., *Journal of Agricultural Food Chemistry* (2020), 68, 1910-1934.
- Morales-Rodríguez, A., Pérez-López, M., Puigpelat, E., Sahuquillo, A., Barrón, D., López-Sánchez, J.F., *Journal of Chromatography A* (2022), 1684, 463549.
- Narukawa, T., Raber G., Itoh, N., Inagaki, K., *Analytical Sciences* (2020), 36, 233-239.
- Niegel, C., and Matysik, F.M., *Analytica Chimica Acta* (2010), 657, 83-99.
- Ownsworth, E., Selby, D., Ottley, C.J., Unsworth E., Raab, A., Feldmann, J., Sproson, A.D., Kuroda, J., Faidutti, C., Bücker, P., *Science of the Total Environment* (2019), 685, 259-272.
- Sahuquillo, A., López-Sánchez, J.F., Llorente-Mirandes, A., Pell-Lorente, A., Rubio, R., Ruiz-Chancho, M.J., *Environmental Problems in Marine Biology: Methodological Aspects and Applications* (2017), Chapter 5, 85-102. CRC Press.
- Taylor, V., Goodale, B., Raab, A., Schwerdtle, T., Reimer, K., Conklin, S., Karagas, M. R., Francesconi, K. A., *Science of the Total Environment* (2017), 580, 266-282.
- Traar, P., Francesconi, K.A., *Tetrahedron Letters* (2006), 47, 5293-5296
- US Food and Drug Administration (USFDA). Center for Food Safety and Applied Nutrition. Arsenic in Rice and Rice products. Risk assessment report (2016).
- Wells, M.L., Potin, P., Craigie, J. S., *Journal of Applied Phycology* (2017), 29, 949-982.
- Yu, L.L., Stanoyevitch, R.C., Zeisler, R., *Analytical Methods* (2017), 9, 4267-4274.
- Yu, L.L., Browning, J.F., Burdette, C. Q., Caceres, G. C., Chieh K. D., Davis, W. C., Kassim, B. L., Long, S. E., Murphy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018), 410, 1265-1278.
- K. E., Oflaz, R., Paul, R. L., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2018), 410, 1265-1278.
- Yu, Y., Vivó-Navarro, A., Sahuquillo, A., Zhou, G., López-Sánchez, J.F., *Journal of Chromatography A* (2020), 1609, 460459.