



**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS DE  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA CON  
DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA  
DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS DE USO  
VETERINARIO EN DIVERSAS MATRICES BIOLÓGICAS**

Presentada por: Francisco Moragues Ribes

Dirigida por: Dña. Victoria Villagrasa Sebastián

Dña. Alicia C. López Castellano

VALENCIA 2008





La Memoria del trabajo de investigación para la obtención del grado de Doctor realizada por Francisco Moragues Ribes titulada: “Desarrollo y validación de métodos analíticos de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas para la determinación de residuos de medicamentos de uso veterinario en diversas matrices biológicas” ha sido realizada bajo la dirección de Dña. Victoria Villagrasa Sebastián y Dña. Alicia C. López Castellano, Profesoras del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Moncada, a 10 de junio de 2008.

Dña. Victoria Villagrasa Sebastián

Dña. Alicia C. López Castellano



## **AGRADECIMIENTOS**



Me gustaría expresar mi agradecimiento a las personas que científica o personalmente han participado en esta tesis doctoral.

A mis directoras de tesis, la Dra. Victoria Villagrasa y la Dra. Alicia C. López Castellano por animarme, sin descanso, para realizar esta investigación y continuar en ella y por la confianza que han depositado en mí.

Esta tesis ha sido realizada gracias a la colaboración de la unidad de residuos de medicamentos veterinarios del Laboratorio de Salud Pública de Valencia, gracias a ellos se ha podido realizar algo muy difícil en el ámbito de los laboratorios de análisis de rutina, poder compaginar una investigación y el análisis del elevado número de muestras que llegan todos los días a este laboratorio.

Quisiera hacer una mención especial a la persona que me introdujo en este “mundo de los residuos” y que sin ella mis conocimientos en este campo no serían los mismos. Gracias a la Jefa de Negociado del área de Bioquímica del Laboratorio de Salud Pública de Valencia, Dña. Carmen Igualada, por haber confiado desde el primer momento en mí e integrarme en su equipo. Carmen no solo profesionalmente debo darte las gracias, sabes que por tí, hoy soy más persona.

A mis amigos/as por ayudarme cuando lo necesito, en especial July y Sara, sabéis hacerme recapacitar y pensar, ¡que paciencia tenéis y cómo me conocéis!. A Paula y Palo, mis veterinarias favoritas, gracias por estar siempre ahí. A Inma gracias por invitarme a la defensa de tu tesis, que me animó a que acabara la mía, sin tí no hubiera encontrado la motivación suficiente. A Mario, que además de primo, me ha demostrado ser amigo.

A mi familia; mi madre, mi hermana y Alejandro, sois lo mejor que tengo, gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme en todas las decisiones y por ilusionaros con mis ilusiones.

Muchas gracias a todos.





## ÍNDICE



---

<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
1. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS	3
1.1. Legislación y normativas	4
1.2. Análisis y control	8
2. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS ENSAYOS: LA ACREDITACIÓN, ENAC Y NORMA ISO 17025	14
2.1. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC)	15
2.2. Actividades de evaluación de la conformidad de los ensayos acreditables en el sector agroalimentario	16
2.3. Norma UNE EN-ISO/IEC 17025	17
3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA DE EFICACIA ASOCIADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. NUEVA HERRAMIENTA PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS.	22
3.1. Introducción a la espectrometría de masas	22
3.2. Acoplamiento HPLC-MS	28
3.3. Equipos de espectrometría de masas tipo MS <sup>n</sup> y MS/MS	32
4. AGONISTAS β-ADRENÉRGICOS	34
4.1. Legislación del Clenbuterol y del resto de agonistas β-adrenérgicos	36
4.2. Referencias bibliográficas para su análisis	37
5. ANTIBIÓTICOS: CLORANFENICOL.	39
5.1. El problema de la determinación de los residuos de antibióticos	40
5.2. Anfenicoles	41
5.3. Referencias bibliográficas para su análisis	43
6. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)	45
6.1. Fenilbutazona y Oxifenilbutazona	50
6.2. Meloxicam, flunixin meglumine, carprofeno y ácido tolfenámico	51
6.3. Referencias bibliográficas para su análisis	52

<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>57</b>
1. HIPÓTESIS	57
2. OBJETIVOS	57
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	
1. PROCEDIMIENTO PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	61
1.1. Introducción	61
1.2. Definiciones	62
1.3. Determinación y cálculo de los parámetros de validación	66
1.3.1. Métodos cualitativos para sustancias que no tienen LMR establecido	66
1.3.2. Métodos cuantitativos para sustancias con y sin LMR establecido	68
2. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE:	69
2.1. Agonistas $\beta$ -adrenérgicos en hígado y orina por HPLC-MS <sup>n</sup>	69
2.1.1. Alcance	73
2.1.2. Equipos, materiales y reactivos	73
2.1.3. Preparación	75
2.1.4. Realización	79
2.1.5. Tratamiento y expresión de los resultados	83
2.2. Cloranfenicol en miel y leche por HPLC-MS <sup>n</sup>	87
2.2.1. Alcance	87
2.2.2. Equipos, materiales y reactivos	87
2.2.3. Preparación	88
2.2.4. Realización	91
2.2.5. Tratamiento y expresión de los resultados	93
2.3. Cloranfenicol en tejido animal, huevos y ovoproductos por HPLC-MS <sup>n</sup>	96
2.3.1. Alcance	96
2.3.2. Equipos, materiales y reactivos	96
2.3.3. Preparación	97
2.3.4. Realización	98
2.4. Oxifenilbutazona y fenilbutazona en orina animal por HPLC-MS <sup>n</sup>	100
2.4.1. Alcance	100

---

2.4.2. Equipos, materiales y reactivos	100
2.4.3. Preparación	101
2.4.4. Realización	102
2.4.5. Tratamiento y expresión de los resultados	106
2.5. Meloxicam, flunixin meglumine, carprofeno y ácido tolfenámico en hígado por HPLC-MS <sup>n</sup>	108
2.5.1. Alcance	108
2.5.2. Equipos, materiales y reactivos	109
2.5.3. Preparación	110
2.5.4. Realización	112
2.5.5. Tratamiento y expresión de los resultados	116
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>121</b>
1. DETERMINACIÓN DE AGONISTAS $\beta$ -ADRENÉRGICOS EN HÍGADO Y ORINA POR HPLC-MS <sup>n</sup>	122
1.1. Selectividad/especificidad	130
1.2. Función de respuesta instrumental	131
1.3. Exactitud	133
1.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio	140
1.5. Límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ )	141
1.6. Capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ )	143
2. DETERMINACIÓN DE CLORANFENICOL POR HPLC-MS <sup>n</sup>	148
2.1. Determinación de cloranfenicol en leche y miel por HPLC-MS <sup>n</sup>	152
2.1.1. Selectividad/especificidad	156
2.1.2. Función de respuesta instrumental	157
2.1.3. Exactitud	158
2.1.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio	160
2.1.5. Límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ )	160
2.1.6. Capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ )	161
2.2. Determinación de cloranfenicol en tejido animal, huevos y ovoproductos por HPLC-MS <sup>n</sup>	165
2.2.1. Selectividad/especificidad	168
2.2.2. Función de respuesta instrumental	169
2.2.3. Exactitud	169

2.2.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio	171
2.2.5. Límite de decisión ( $CC\alpha$ )	172
2.2.6. Capacidad de detección ( $CC\beta$ )	172
<b>3. DETERMINACIÓN DE OXIFENILBUTAZONA Y FENILBUTAZONA EN ORINA ANIMAL POR HPLC-MS<sup>n</sup></b>	<b>176</b>
3.1. Selectividad/especificidad	180
3.2. Función de respuesta del método	181
3.3. Exactitud	182
3.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio	184
3.5. Límite de decisión ( $CC\alpha$ )	185
3.6. Capacidad de detección ( $CC\beta$ )	186
<b>4. DETERMINACIÓN DE MELOXICAM, FLUNIXIN MEGLUMINE, CARPROFENO Y ÁCIDO TOLFENÁMICO EN HIGADO POR HPLC-MS<sup>n</sup></b>	<b>189</b>
4.1. Selectividad/especificidad	196
4.2. Función de respuesta del método	197
4.3. Exactitud	199
4.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio	203
4.5. Límite de decisión ( $CC\alpha$ )	204
4.6. Capacidad de detección ( $CC\beta$ )	207
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>213</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>217</b>
<b>PUBLICACIONES</b>	
1. Artículos de investigación	229
2. Comunicaciones a congresos	230
<b>ANEXO 1</b>	<b>231</b>
<b>ANEXO 2</b>	<b>237</b>

## **INTRODUCCIÓN**





## 1. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

En los últimos tiempos, en los países desarrollados se ha intensificado, de forma gradual, el interés por los temas de alimentación humana. Esta atención denota la cobertura de las necesidades alimentarias de la población con productos de valor nutricional adecuado y en un rango de costes asumible. En una escala lógica de valores, dicha atención se ha orientado hacia una preocupación por la calidad, en todos sus aspectos y de manera prominente en la *seguridad alimentaria*. En este contexto, la Unión Europea (UE) considera que la seguridad alimentaria debe abordarse desde un planteamiento global e integrado, aplicándose a la totalidad de la cadena alimentaria, incluyendo la propia industria alimentaria, los plaguicidas agrícolas y la industria de alimentación animal (1).

Los peligros para la salud humana originados por los productos alimentarios pueden derivar de las materias primas utilizadas, de la manipulación y de todas las fases de elaboración, transporte, almacenamiento y venta de los alimentos. Entre los principales peligros figuran la contaminación microbiana, los aditivos alimenticios, los contaminantes ambientales y los residuos de plaguicidas y de medicamentos veterinarios.

En la industria vinculada con la alimentación animal, el objetivo es minimizar su presunto impacto negativo en la salud humana, estableciendo prohibiciones o restricciones en el uso de determinadas materias y aditivos utilizados en la fabricación de piensos y reduciendo al mínimo el efecto de las sustancias o productos indeseados cuya presencia en los piensos es imposible eliminar por completo. En la producción de animales de abasto se utiliza una gran variedad de medicamentos veterinarios, ya sea con un fin terapéutico, zootécnico o como promotores de crecimiento. La gran mayoría de estos productos son susceptibles de dejar residuos en los alimentos procedentes de los animales que han sido tratados, bien del principio activo en su forma original o bien de sus metabolitos. La administración de estas sustancias con fines terapéuticos es en muchos casos necesaria, pero cuando se utilizan de forma fraudulenta, indiscriminada y abusiva sin atender a los principios de la buena práctica veterinaria, la presencia de residuos en los alimentos puede suponer un grave riesgo para la salud de los consumidores (2).

Los residuos de medicamentos veterinarios se encuentran como consecuencia del uso legal, ilegal o alegal de antibióticos, antihelmínticos y otros medicamentos veterinarios que se utilizan para prevenir y tratar las enfermedades de los animales o como promotores del crecimiento y de anabolizantes que favorecen el aumento de la masa proteica, como los  $\beta$ -agonistas. A modo de ejemplo se puede citar el clenbuterol y el salbutamol, que aceleran la lipólisis e incrementan la síntesis proteica, los antitiroideos o finalizadores cárnicos que producen retención de agua en tejidos y favorecen el fraude además de resultar cancerígenos y la utilización de tranquilizantes para facilitar el transporte y manejo de los animales hasta el matadero, entre otros (3).

### **1.1. Legislación y normativas**

La regulación del sector de medicamentos veterinarios, en particular la normativa legal vigente que regula el medicamento veterinario, en todos sus apartados, desde su fabricación, importación, exportación, distribución, comercialización y uso se ha revelado como un asunto complejo y difícil de abordar, quizás no tan sencillo como los promotores de la legislación al respecto pensaban que resultaría. La base de la normativa sobre el medicamento de uso humano y de uso veterinario en particular se encuentra en la Ley 29/2006, de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (4) donde se define “medicamento de uso veterinario” como “toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario. También se considerarán «medicamentos veterinarios» las premezclas para piensos medicamentosos elaboradas para ser incorporadas a un pienso.”

Con el fin de proteger la salud del consumidor de los productos alimenticios de origen animal, uno de los principales principios en que se apoya la legislación es que los productos alimenticios obtenidos de animales tratados con medicamentos veterinarios no deben contener residuos o metabolitos de los mismos que podrían constituir un peligro para la salud del consumidor. Para facilitar la aplicación

uniforme de este principio a través de la UE y con el fin de asegurar que las diferencias en los ensayos de los efectos de estos residuos por países miembros no cree barreras para el libre movimiento de productos alimenticios de origen animal, el 26 de junio de 1990 el Consejo adoptó el Reglamento (CEE) nº 2377/90 apoyado en un proceso comunitario destinado al establecimiento de los límites máximos de residuos (LMRs) para los medicamentos veterinarios en productos alimenticios de origen animal (5, 6). Para ello definen:

- **Residuos de medicamentos veterinarios** como *todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate;*

- **Límite máximo de residuos** como *el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario, expresado en mg/Kg (ppm) o en µg/Kg (ppb) sobre la base del peso en fresco autorizada en la Comunidad Europea o reconocida como admisible en un producto alimenticio. Esta definición es prácticamente la misma que adopta la FAO/OMS del Comité del Codex Alimentarius para residuos de medicamentos veterinarios en alimentos (7).*

Este Reglamento ha clasificado a las sustancias farmacológicamente activas utilizadas en los medicamentos veterinarios en cuatro categorías:

I.- Sustancias para las que se han establecido LMRs.

II.- Sustancias para las que no es necesario, por razones de salud pública, fijar un LMR.

III.- Sustancias para las que se puede fijar límites máximos provisionales de residuos.

IV.- Sustancias para las que no cabe establecer un LMR, ya que su presencia en los productos alimenticios de origen animal, sea cual sea su concentración, constituye un riesgo para la salud del consumidor.

En la Tabla 1.1 se observa la clasificación de los compuestos inspeccionados en los productos alimentarios de origen animal.

Tabla 1.1.- Clasificación de compuestos inspeccionados en los productos alimenticios de origen animal.

---

**Grupo A. Compuestos anabolizantes y sustancias no autorizadas.**

---

1. Estilbenos, sus derivados, sales y esterés.
  2. Compuestos antitiroideos.
  3. Hormonas esteroides.
  4. Lactonas del ácido resorcílico (incluido el zeranol).
  5. Agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.
  6. Las sustancias que debido a su peligrosidad, como los nitrofuranos y el cloranfenicol, no se les puede asignar un número máximo de residuos en los alimentos de origen animal. Se incluyen en el Anexo IV del reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo del 26 de Junio de 1990.
- 

**Grupo B. Medicamentos veterinarios, contaminantes ambientales y otras sustancias.**

---

1. Fármacos antibacterianos (sulfamidas y quinolonas).
  2. Otros medicamentos veterinarios:
    - Antihelmínticos.
    - Anticoccidianos incluyendo nitroimidazoles.
    - Carbamatos y piretroides.
    - Tranquilizantes.
    - Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).
    - Otras sustancias con actividad farmacológica.
  3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales.
    - Compuestos organoclorados.
    - Compuestos organofosforados.
    - Elementos químicos.
    - Micotoxinas.
    - Colorantes.
    - Otros.
-

Dicho Reglamento se modifica continuamente con el fin de introducir valores de LMRs para sustancias usadas en medicamentos veterinarios en los anexos del mismo, y para adaptar la legislación al progreso científico-técnico. Desde el 1 de enero de 2000 en adelante, no se permite la utilización de ningún tipo de sustancia activa para la alimentación o producción animal a menos que dicha sustancia se encuentre incluida en los anexos I, II o III de dicho reglamento.

El Real Decreto 109/1995, de 27 de enero de 1995, sobre medicamentos veterinarios (9), presenta en su artículo 4 acerca del control general sobre medicamentos veterinarios: “Nadie podrá poseer o tener bajo su control con fines industriales o comerciales, medicamentos veterinarios o sustancias que posean propiedades anabolizantes, antiinfecciosas, antiparasitarias, antiinflamatorias, hormonales o psicotropas que pueda utilizarse como medicamento veterinario, a menos que tenga una autorización expresa expedida por los órganos competentes de las Comunidades Autónomas, o esté amparado en las normas de esta disposición”.

Por otro lado, el Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio de 1998, establece las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos, estableciendo en sus primeros artículos las definiciones y planes de vigilancia y refiriendo las obligaciones específicas del veterinario de anotar en un registro la fecha y la naturaleza de los tratamientos prescritos o administrados, incluyendo dosis y duración de los mismos, la identificación de los animales tratados, así como los plazos de espera correspondientes (10).

Existen diferencias específicas entre la evaluación de la seguridad de los residuos de medicamentos veterinarios y la evaluación de otros residuos de aditivos alimentos o contaminantes. Debido a las propiedades de los principios activos de los medicamentos veterinarios resulta importante evaluar no sólo las propiedades toxicológicas de las sustancias en el sentido estricto del término, tales como efectos carcinogénicos, teratogénicos o mutagénicos, sino también las propiedades farmacológicas y su posible potencial inmunotóxico. Además en caso de los antibióticos, la posibilidad de un riesgo microbiológico relativo al desarrollo de

resistencia bacteriana en la flora intestinal humana debe ser considerada. A su vez, es importante el hecho de que estos residuos a los que el consumidor está expuesto pueden no ser necesariamente iguales a los medicamentos administrados debido a que pueden haber sido metabolizados.

La utilización de sustancias de acción hormonal y tirostática se encuentra prohibida en la UE para la cría animal (11). En cambio, EEUU y Canadá sí permiten la utilización de estas sustancias lo que obligó a la UE desde 1999 a cerrar sus fronteras a importaciones de carne procedente de estos países, con las consiguientes sanciones comerciales a Europa. Así, las hormonas esteroideas, que favorecen la síntesis de proteínas, presentan su uso prohibido desde 1977, permitiéndose únicamente en animales individuales con el fin de sincronizar el celo (11). Las hormonas del crecimiento, que producen aumentos de peso en los animales, se prohibieron en 1998 debido a que inducen la aparición de tumores de mama y de próstata a los consumidores (12). El clenbuterol y análogos son fármacos que se utilizan para inducir un aumento de peso, siendo las intoxicaciones muy frecuentes por utilizarlos en dosis muy elevadas, por lo que hoy en día están prohibidos (11).

## **1.2. Análisis y control**

El objetivo principal de la vigilancia de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos es evitar que lleguen al consumidor alimentos con residuos de sustancias que puedan tener consecuencias negativas para la salud. Por esta razón y con el objetivo adicional de armonizar las medidas de control, el Consejo de las Comunidades Europeas ya adoptó en 1986 la Directiva 86/469 relativa a la investigación de residuos en los animales y carnes frescas (13). En ella se estableció que todos los Estados Miembros someterían cada año a la Comisión un plan que recogiera las medidas de control que se aplicarían en su territorio para la vigilancia de este tipo de residuos. La citada Directiva se traspuso al ordenamiento jurídico español en 1989 por Real Decreto 1262/1989 (14).

Históricamente, en muchos países miembros, el control de estos residuos se basaba en el concepto de tolerancia de residuo cero. Cuando un residuo era detectado usando los métodos analíticos disponibles se procedía a la retirada del

alimento responsable. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas analíticas hicieron posible la detección de residuos a niveles traza, permitiendo el establecimiento de los LMRs para estas sustancias farmacológicamente activas usadas en farmacia veterinaria para todos aquellos productos alimenticios de origen animal incluyendo carne de mamíferos, animales de corral, pescado, leche, huevos o miel. El primer propósito del establecimiento de los LMRs es asegurar la protección del consumidor contra los posibles efectos nocivos resultantes de la exposición a estos residuos (15).

El estudio de los residuos de medicamentos de uso veterinario tendrá por objeto evaluar si persisten en los productos alimenticios procedentes de animales tratados, y en caso afirmativo en qué condiciones y en qué grado, así como los períodos de supresión que habrán de respetarse para excluir cualquier riesgo para la salud humana al igual que los inconvenientes para la transformación industrial de los productos alimenticios.

La valoración del riesgo debido a los residuos incluirá pruebas para determinar si éstos se encuentran en los animales tratados en las condiciones de uso recomendadas, así como el estudio de sus efectos. La documentación relativa deberá poner de manifiesto en qué grado y cuánto tiempo persisten los residuos del medicamento veterinario o sus metabolitos en los tejidos del animal tratado o en los productos alimenticios procedentes de éste; de manera que sea posible establecer, con el fin de prevenir cualquier riesgo para la salud del consumidor, un período de supresión razonable que pueda respetarse en las condiciones prácticas de cría; y que existen métodos analíticos prácticos que permitan comprobar de forma sistemática el cumplimiento del período de supresión. La determinación del período de supresión se realiza midiendo la velocidad de eliminación de los residuos en el animal diana después de la última administración del medicamento. Se determina la cantidad de residuos presentes en el animal de experimentación en distintos momentos después de la última administración del medicamento, utilizando para ello métodos físicos, químicos o biológicos adecuados. A su vez se indicará el procedimiento técnico así como la fiabilidad y sensibilidad del método empleado. El método de análisis propuesto deberá poder realizarse durante los controles sistemáticos y tener un grado de sensibilidad que permita detectar con certeza la

presencia de residuos en cantidades superiores a los límites legalmente permitidos. Dicho método tendrá que estar validado y ser lo suficientemente sencillo para que pueda aplicarse en las condiciones normales de control sistemático de residuos (16).

La directiva 96/23/CE fija las medidas de control frente a las sustancias concretas y sus residuos en los animales vivos y los productos que de ellos se derivan. Esta directiva impone a los Estados miembros la puesta en marcha de un plan nacional para la detección de residuos (18). En el grupo A (Figura 1.1) se clasifican las sustancias con acción hormonal y las sustancias prohibidas incluidas en el anexo IV del reglamento CEE 2377/90 (6). En el grupo B (Figura 1.2) las sustancias empleadas en terapéutica veterinaria (antibióticos, antiparasitarios, etc.), los contaminantes medioambientales (plaguicidas, policlorobifenilos, dioxinas y metales pesados), los tóxicos naturales, etc.

Como consecuencia, y con el fin de garantizar la inocuidad de los alimentos y preservar la salud de los consumidores se deben llevar a cabo análisis de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal. El control de éstos se debe realizar principalmente a través de procedimientos microbiológicos y químicos, teniendo en cuenta la legislación pertinente y presente los LMRs establecidos (13).

Cualquier estrategia de detección de residuos puede conllevar dos fases:

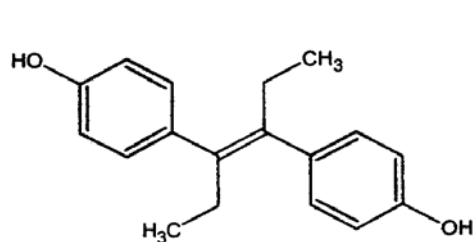
- Una fase de screening (opcional).
- Una fase de confirmación (obligatoria).

#### 1.2.1. Fase de screening

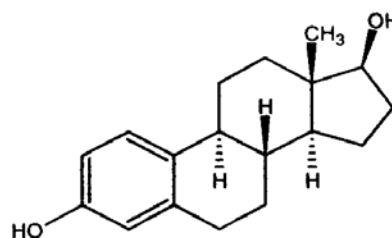
El método de análisis empleado en el screening debe permitir examinar un gran número de muestras, y para ello debe ser fácil de aplicar, rápido y relativamente económico. Además no debe producir falsos negativos, de manera que no deje sin descubrir muestras que puedan constituir un riesgo para la salud pública. Las muestras consideradas positivas en el screening deben ser objeto de un segundo examen por un método de análisis de confirmación, que puede ser más costoso pero a condición de ser altamente selectivo (3).



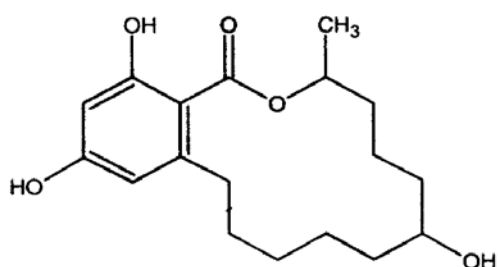
Figura 1.1.- Algunos ejemplos de los compuestos del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CEE.



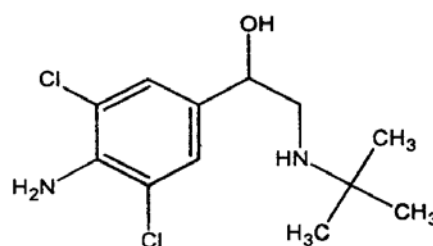
Dietilestilbestrol



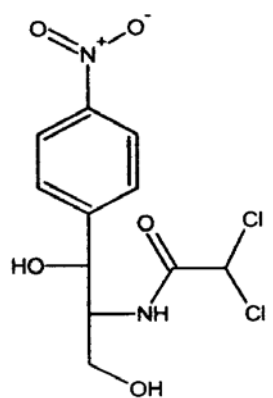
Estradiol



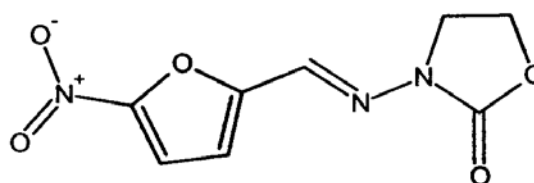
Zeranol



Clenbuterol

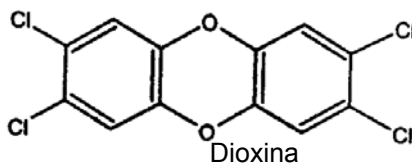
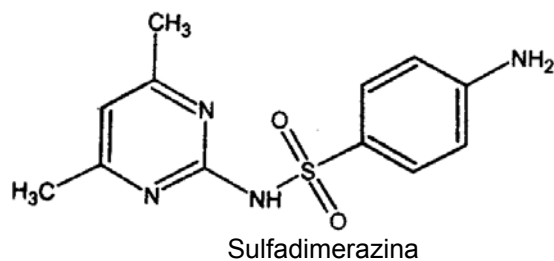
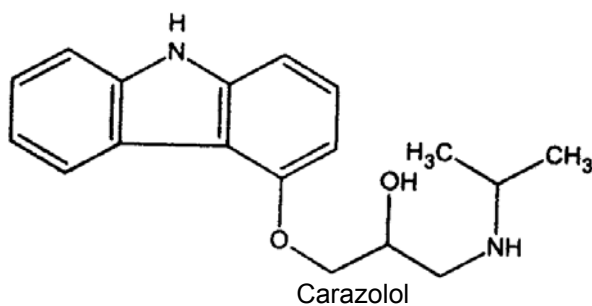
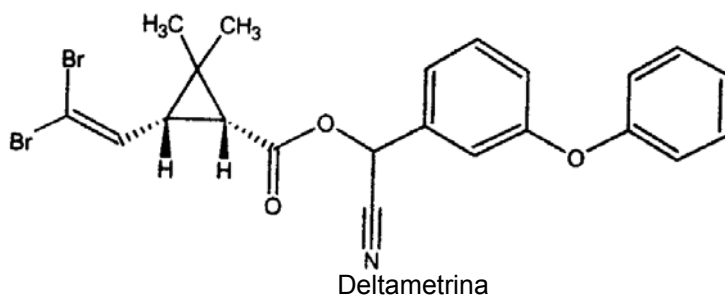
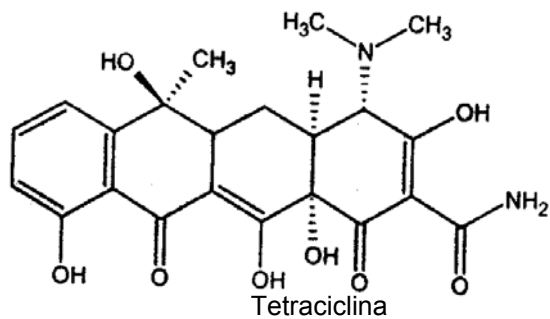


Cloranfenicol



Furazolidona

Figura 1.2.- Algunos ejemplos de compuestos del grupo B del anexo I de la Directiva 96/23/CEE.



### 1.2.2. Fase de confirmación

El 17 de agosto de 2002 se publicó la Decisión de la Comisión 2002/657/CEE de 12 de agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados. Con ella se derogan las Decisiones 90/515/CEE por la que se establecen los métodos de referencia para la investigación de residuos de metales pesados y arsénico, y las Decisiones 93/256/CEE y 93/257/CEE por las que se establecen los métodos de referencia y la lista de los Laboratorios Nacionales de Referencia para la detección de residuos.

En cualquier caso se establece un periodo de 2 años en que todavía serán válidos los criterios de las anteriores decisiones para las sustancias de grupo A y de 5 años para las del grupo B. En esta nueva Decisión se habla del concepto de límite mínimo de funcionamiento exigido (minimum required performance level) o MRPL, como el contenido mínimo de un analito que debe ser detectado y confirmado. Sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido.

En razón de la multiplicidad de sustancias a investigar, sería deseable disponer de métodos multiresiduos, que puedan poner en evidencia en un solo análisis la presencia de diversos analitos pertenecientes a una misma familia química. Por el contrario, los métodos específicos sólo deben ser utilizados en esta fase cuando se trate de buscar sustancias especialmente peligrosas, como cloranfenicol o dietilestilbestrol (DES).

El método de confirmación debe establecer la identidad del analito de manera inequívoca. La cuantificación debe permitir averiguar si la concentración de residuos excede o no el LMR fijado. Para ello los métodos analíticos deben detectar a la vez medicamento y metabolitos, especialmente si estos últimos son considerados también tóxicos (2, 16). Estos métodos incluyen información sobre la estructura química del analito. Los métodos basados exclusivamente en análisis cromatográficos que prescinden de la detección espectrométrica no convienen por sí solos como técnicas de confirmación. Si una técnica por si sola carece de la

especificidad necesaria, dicha especificidad se obtendrá por medio de procedimientos analíticos consistentes en combinaciones de limpieza, separación cromatográfica y detección espectrométrica.

## **2. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS ENSAYOS: LA ACREDITACIÓN, ENAC Y NORMA ISO 17025.**

Como se ha indicado, en los últimos años, la preocupación de los españoles en relación con la seguridad de los alimentos que consume ha ido en aumento, debido, entre otras razones, a una mayor información sobre el impacto que la alimentación tiene en su salud, a la aparición de fenómenos como los alimentos transgénicos y el tratamiento hormonal del ganado y a los diversos casos de alarmas alimentarias ocurridos en diferentes países de la UE. Todo ello ha hecho que el mercado exija, tanto de los sectores productivos como de las administraciones competentes, mayores y más eficaces controles que garanticen dicha seguridad en toda la cadena alimentaria.

Por otro lado, el aumento tanto en el poder adquisitivo como en la cultura gastronómica de los consumidores, hace que estén dispuestos a pagar un precio mayor por los alimentos siempre que se les asegure un mayor nivel de calidad de éstos.

Para responder a ambas exigencias y aportar la adecuada confianza al mercado, en muchos casos es precisa la actuación de Organismos de Evaluación de la Conformidad que analicen, inspeccionen y certifiquen que los alimentos son conformes con los requisitos que les sean de aplicación, ya sean de carácter obligatorio en el campo de la seguridad, o voluntario en el terreno de la calidad.

Pero la cadena de confianza no termina en la realización de ciertos controles; de nada servirían si los Organismos de Evaluación de la Conformidad que los realizan no tienen la competencia técnica precisa para que los resultados de dichos controles sean fiables.

La tarea de evaluar dicha competencia técnica y realizar la eventual declaración pública del resultado la lleva a cabo en España ENAC (Entidad Nacional de Acreditación), mediante la comprobación del cumplimiento por parte de los Organismos de Evaluación de la Conformidad de requisitos concretos sobre estructura y organización, imparcialidad, personal, equipos, procedimientos técnicos, sistema de la calidad, etc, establecidos en normas internacionales. En definitiva, los criterios sobre los que se apoya la declaración de competencia técnica.

## **2.1. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC)**

La Entidad Nacional de Acreditación es una organización auspiciada y tutelada por la Administración que se constituye con arreglo a lo dispuesto en la Ley de Industria 21/1992 y al Real Decreto 2200/95 por el que se aprueba el Reglamento para la Infraestructura de la Calidad y Seguridad Industrial.

ENAC es una entidad privada, independiente y sin ánimo de lucro cuya función es coordinar y dirigir en el ámbito nacional un Sistema de Acreditación conforme a criterios y normas internacionales.

ENAC acredita organismos que realizan actividades de evaluación de la conformidad, sea cual sea el sector en que desarrolle su actividad, su tamaño, su carácter público o privado, o su pertenencia a asociaciones o empresas, universidades u organizaciones de investigación:

- Laboratorios.
- Entidades de Inspección.
- Entidades de Certificación.
- Verificadores Medioambientales.
- Proveedores de Programas de Intercomparación.

La Administración, tanto central como autonómica, utiliza las acreditaciones de ENAC en sus respectivos ámbitos de competencia en sectores tales como el industrial, agroalimentario, medioambiente, defensa, construcción, sanidad, telecomunicaciones, metrología, etc.

Además, ENAC ha sido designada por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, como la entidad encargada de la inspección del cumplimiento de los principios de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) de entidades de ensayo que realizan estudios de productos fitosanitarios, como plaguicidas, insecticidas, fungicidas, etc.

Los principios de BPL son exigidos en Europa en los ensayos que tienen como objetivo evaluar los riesgos potenciales de nuevos productos químicos en las personas, animales y el medio ambiente. Las inspecciones de ENAC abarcan no sólo la aplicación de los principios de BPL a laboratorios, sino también a entidades que realizan estudios de campo.

En el campo internacional, ENAC representa a España en IAF (International Accreditation Forum), ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) y EA (European Cooperation for Accreditation) y participa en los acuerdos internacionales de reconocimiento mutuo (MLA) establecidos en el seno de estas organizaciones, en virtud de los cuales las acreditaciones de ENAC son reconocidas internacionalmente. Estas organizaciones sirven además de foro de discusión e intercambio de experiencias entre los distintos organismos de acreditación y, en su seno, se elabora la documentación técnica precisa para garantizar la adecuada homogeneidad en las actuaciones de los mismos.

## **2.2. Actividades de evaluación de la conformidad de los ensayos acreditables en el sector agroalimentario**

La correcta realización de los ensayos es una pieza clave en cualquier esquema de evaluación de la conformidad, especialmente en el campo agroalimentario. Esto es así ya que la gran mayoría de las características que se asignan a un alimento, y que son evaluadas, son propiedades químicas, microbiológicas u organolépticas, que deben ser determinadas mediante un ensayo. Por ello, si los resultados obtenidos por los laboratorios no son fiables, el resto de actividades que puedan realizarse pueden ser cuestionables.

En el campo voluntario, los laboratorios de ensayo actúan realizando análisis, generalmente físico-químicos y microbiológicos, ya sea para la propia

industria o para otros evaluadores de la conformidad. Mención especial tienen aquí, por su importancia en el sector, los ensayos sensoriales (paneles de cata), para los que existe una guía específica de aplicación de la norma de acreditación.

En el campo reglamentario la actividad de los laboratorios se concreta principalmente en el control oficial de productos alimenticios. En este sentido, el Real Decreto 1397/1995 plantea la acreditación de los laboratorios públicos o privados que realicen esta actividad. Los laboratorios de ensayo, para ser acreditados, deben demostrar el cumplimiento de los requisitos establecidos en la norma UNE EN-ISO/IEC 17025.

## **2.3. Norma UNE EN-ISO/IEC 17025**

### **2.3.1. Introducción**

Esta norma contiene todos los requisitos que los laboratorios de ensayo y calibración tienen que cumplir si desean demostrar que disponen de un sistema de gestión de la calidad, que son técnicamente competentes y que son capaces de producir resultados técnicamente válidos.

Los organismos de acreditación que reconocen la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración pueden utilizar esta norma internacional como base para su acreditación. En el capítulo 4 de la citada norma se especifican los requisitos para una correcta gestión y en el capítulo 5 se especifican los requisitos para la competencia técnica en el tipo de ensayos y/o calibraciones que realice el laboratorio.

### **2.3.2. Requisitos de gestión**

a) El laboratorio debe disponer de personal directivo y técnico con la autoridad y los recursos necesarios para desempeñar sus obligaciones y detectar la existencia de desviaciones frente al sistema de gestión de la calidad o frente a los procedimientos de ensayo o calibración.

Debe definir la organización y la estructura directiva del laboratorio y realizar una supervisión adecuada del personal que realiza ensayos y calibraciones, así como designar a un responsable de calidad.

b) El laboratorio debe establecer, implantar y mantener un sistema de gestión de la calidad apropiado para el ámbito de sus actividades.

c) El laboratorio debe establecer y mantener procedimientos para controlar todos los documentos que forman parte de su sistema de gestión de la calidad. Todos los documentos entregados al personal del laboratorio como parte del sistema de gestión de la calidad deben ser revisados y aprobados para su uso, por el personal autorizado antes de su distribución. Existirá una lista que indique el estado de revisión y distribución de los documentos del sistema para evitar el uso de documentos no válidos u obsoletos.

d) El laboratorio establecerá un control de proveedores, deberá poseer procedimientos para la adquisición, recepción, y almacenamiento de reactivos y materiales consumibles utilizados en los ensayos y calibraciones.

e) El laboratorio debe poseer un servicio al cliente que coopere con sus clientes, con objeto de aclarar sus solicitudes y para supervisar la actuación del laboratorio con relación al trabajo realizado.

f) El laboratorio debe disponer de una política y un procedimiento para la resolución de las reclamaciones recibidas de clientes u otras partes, y mantener un registro de todas ellas.

g) El laboratorio debe disponer de una política y procedimientos que deben aplicarse en caso de que algún aspecto de su trabajo de ensayo y/o calibración, o los resultados de este trabajo, no se ajusten a sus propios procedimientos o a los requisitos acordados por el cliente.

h) El laboratorio debe establecer una política y un procedimiento y debe designar a los responsables de emprender acciones correctivas cuando se haya identificado trabajo no conforme o desviaciones frente a las políticas y procedimientos del sistema de gestión de la calidad o las operaciones técnicas. Establecerá también un seguimiento de las acciones correctivas y auditorías internas adicionales.

i) El laboratorio debe identificar oportunidades de mejora y posibles fuentes de no conformidades, ya sean técnicas o relativas al sistema de gestión de la calidad.

j) El laboratorio establecerá procedimientos para el control de todos los registros tanto técnicos como de calidad.



K) El laboratorio debe realizar periódicamente, y según un calendario y un procedimiento predeterminado, auditorías internas para comprobar que siguen cumpliendo los requisitos del sistema de gestión de la calidad y de esta norma internacional.

l) La dirección ejecutiva del laboratorio debe realizar revisiones periódicas del sistema de gestión de la calidad del laboratorio y de las actividades de ensayo y/o calibración para comprobar que siguen siendo idóneos y eficaces, y para introducir los cambios o mejoras que considere oportunos.

### 2.3.3. Requisitos técnicos

a) Los factores que influyen en la validez y fiabilidad de los ensayos y/o calibraciones realizados por un laboratorio son: factores humanos (personal), locales y condiciones ambientales, métodos de ensayo y calibración y validación de métodos, equipos, trazabilidad de las medidas, muestreos y manipulación de las muestras de ensayos y calibraciones.

b) El laboratorio debe utilizar métodos de ensayo y/o calibración que cumplan los requisitos de los clientes y que sean apropiados para los ensayos o calibraciones realizados. Se podrán usar tanto métodos normalizados (normas internacionales, nacionales o regionales) o bien métodos desarrollados por el laboratorio.

c) En el caso de usar métodos no normalizados, éstos deben ser acordados con el cliente y deben incluir una clara especificación de los requisitos del cliente y la finalidad del ensayo y/o calibración. El método desarrollado debe haber sido debidamente validado antes de su uso. El procedimiento de ensayo debe contener al menos la siguiente información:

- ◆ identificación apropiada;
- ◆ campo de aplicación;
- ◆ descripción del tipo de objeto sometido a ensayo o calibración;
- ◆ parámetros o magnitudes y rangos por determinar;
- ◆ aparatos y equipos, incluyendo las especificaciones técnicas;
- ◆ patrones de referencia y materiales de referencia necesarios;
- ◆ condiciones ambientales requeridas y cualquier periodo de estabilización necesario;

- ◆ descripción del procedimiento, incluyendo los siguientes puntos:
  - colocación de marcas de identificación,
  - controles previos al inicio del trabajo,
  - control del correcto funcionamiento de los equipos y cuando proceda ajuste y calibración de éstos.
  - método de registro de observaciones y resultados,
  - medidas de seguridad que tengan que adoptarse;
- ◆ criterios y/o requisitos de aceptación/rechazo;
- ◆ datos que deban registrarse y método de análisis y presentación;
- ◆ incertidumbre o procedimiento para estimar la incertidumbre.

d) La validación de un método es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que demuestren el cumplimiento de ciertos requisitos para el uso específico previsto. La validación debe ser todo lo extensa que sea necesario para atender las necesidades de la aplicación o campo de aplicación en cuestión. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento de validación utilizado y una declaración sobre la idoneidad del método para el uso que se pretende hacer del mismo.

El rango y la exactitud de los valores que se pueden obtener con métodos validados (por ejemplo: incertidumbre, límite de detección, selectividad del método, linealidad, límite de repetibilidad y/o reproducibilidad, robustez, sensibilidad cruzada frente a interferencias de la matriz, etc.), evaluados para su uso previsto, deben ser los adecuados para satisfacer las necesidades de los clientes.

e) En la estimación de la incertidumbre de medida, se tendrán en cuenta todos los componentes de la incertidumbre que tengan importancia para la situación en cuestión, utilizando los métodos de análisis adecuados.

f) El laboratorio establecerá un control sobre los datos técnicos, así como de los equipos que determinan esos datos.

g) Todos los equipos utilizados para ensayos y/o calibraciones, que tengan un efecto significativo en la exactitud o validez de los resultados de ensayos, calibraciones o muestreos, deben ser calibrados antes de ponerse en funcionamiento para asegurar la trazabilidad de las medidas.

h) El laboratorio debe disponer de procedimientos de control de calidad para comprobar la validez de los ensayos y calibraciones realizados. Pueden incluirse, pero sin limitarse a, los siguientes:

- ◆ uso de materiales de referencia certificados;
- ◆ participación en programas de intercomparación de laboratorios;
- ◆ repetición de ensayos/calibraciones usando los mismos o distintos métodos;
- ◆ repetición de ensayos/calibraciones de objetos almacenados;
- ◆ coherencia de resultados para diferentes características de un objeto.

i) Los informes de resultados de cada ensayo, calibración o series de ensayos o calibraciones deben ser claros, exactos, sin ambigüedades, objetivamente y de acuerdo con las instrucciones específicas contenidas en los métodos de ensayo o calibración. Deberán incluir al menos la siguiente información:

- ◆ un título;
- ◆ el nombre y la dirección del laboratorio,
- ◆ una identificación única del informe (como por ejemplo el número de serie),
- ◆ el nombre y dirección del cliente;
- ◆ la identificación del método utilizado;
- ◆ la descripción, el estado y la identificación sin ambigüedades del objeto u objetos sometidos a ensayo o calibración;
- ◆ la fecha de la recepción del objeto u objetos de ensayo o calibración cuando ésta sea crítica para la validez y aplicación de los resultados, y la fecha de la realización de cada ensayo o calibración,
- ◆ los resultados del ensayo o de la calibración, junto con las unidades de medida cuando proceda;
- ◆ nombre, cargo y firma o identificación equivalente de la persona autorizada;
- ◆ cuando proceda, una declaración de que los resultados se refieren únicamente a los objetos sometidos a ensayo o calibración.

Las modificaciones de informes de ensayo o certificados de calibración después de su emisión sólo deben realizarse mediante un nuevo documento, o una transferencia de datos, que incluya la declaración: “suplemento del informe de ensayo (o calibración), número de serie...(o según se identifique)”.

### **3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA DE EFICACIA ASOCIADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS. NUEVA HERRAMIENTA PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS.**

#### **3.1. Introducción a la espectrometría de masas**

La espectrometría de masas nació de la mano del físico inglés J.J. Thomson 1899, cuando descubrió la desviación en la trayectoria que sufre un haz de átomos cargados positivamente (rayos positivos) cuando pasan a través de campos eléctricos y magnéticos (experiencia que le valió el descubrimiento de los isótopos). A partir de ese momento, la evolución de esta técnica ha sido vertiginosa y enfocada en dos vertientes fundamentalmente: la elucidación estructural de compuestos (de los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas es posible extraer información acerca de la masa molecular del compuesto analizado, así como obtener información estructural del mismo) y el análisis cualitativo y cuantitativo con carácter confirmatorio.

Las diferentes aplicaciones analíticas de la espectrometría de masas han ido forzosamente a remolque del avance tecnológico; así, el acoplamiento de la espectrometría de masas a técnicas separativas no pudo llevarse a cabo hasta el año 1956 cuando se empezó a usar el primer cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas (GC-MS). El acoplamiento a la cromatografía líquida tuvo que esperar un poco más debido a la dificultad de ionizar a vacío una molécula que se encontraba en el seno de un disolvente. Fue en los años 70-80 cuando, gracias al desarrollo de la ionización química a presión atmosférica junto con el "Electrospray" (desarrollado en 1917 con otros fines), se comenzó a trabajar en HPLC-MS.

#### Fundamento teórico

La espectrometría de masas (MS) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga. De esta manera la espectrometría de masas es una técnica analítica por medio de la cual las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos por la

desviación que sufren en presencia de campos eléctricos y magnéticos. Los instrumentos usados en estos estudios se llaman espectrómetros de masas.

Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes básicas:

- ❖ un sistema de introducción de la muestra en el equipo,
- ❖ una fuente de ionización, en la cual se produce un haz de partículas proveniente de la muestra,
- ❖ un analizador que separa partículas de acuerdo a la masa,
- ❖ y un detector, en el cual los iones separados son recogidos y caracterizados.

El espectrómetro requiere un trayecto de colisión libre para los iones y por lo tanto funciona al vacío o en condiciones casi al vacío. El sistema de entrada de la muestra está diseñado para una mínima pérdida de vacío. La fuente de ionización crea fragmentos de iones gaseosos de la muestra.

Con respecto a las fuentes de ionización, hay dos clases: *fuentes en fase gaseosa* y *fuentes de desorción*.

- *Fuentes en fase gaseosa*: la muestra se volatiliza fuera de la fuente de energía antes de ionizar los componentes gaseosos. Los ejemplos de este método son la ionización química, ionización por impacto de electrones e ionización por campo.
  - Ionización química: una pequeña cantidad de átomos gaseosos es ionizada por colisión con átomos producidos por el bombardeo del gas reactivo. Algunos gases reactivos más comunes son metano, oxígeno, amoníaco e hidrógeno.
  - Ionización por impacto de electrones: es el método de ionización mas usado. Adecuado para moléculas volátiles de naturaleza no polar. El intervalo de medida en rutina es de 50 a 900 umas. Este ensayo no es adecuado para moléculas termolábiles. Un haz generado por la lámpara de tungsteno o de filamento de renio se utiliza para ionizar a los átomos

o moléculas en fase gaseosa. Se forman iones del tipo  $M^+$  (no es habitual con esta técnica de ionización la producción de iones negativos) y produce fragmentación generando iones fragmento que proporcionan información estructural del compuesto. Los iones positivos son acelerados por un campo eléctrico y transportados al campo magnético. Al cambiar el voltaje de aceleración, o sea la velocidad de la partícula o la fuerza del campo magnético, los iones de diferentes proporciones masa/carga pueden ser recolectados y medidos. El espectro obtenido es una huella dactilar del producto lo que permite ser comparado con una librería de espectros para poder identificar el compuesto.

- Ionización por campo: las moléculas pueden perder un electrón cuando se las coloca en un campo eléctrico muy alto, los cuales pueden crearse en una fuente de ionización aplicando alto voltaje entre el cátodo y el ánodo, lo que se llama emisor de campo. Un emisor de campo consiste en un cable cubierto por dendritas de carbono microscópicas, los cuales generalmente amplifican el campo efectivo de los puntos de carbono. La muestra gaseosa en el sistema de entrada pasa al área de campo alto alrededor de los microtips del emisor, los cuales extraen los electrones del analito. Hay poca o ninguna fragmentación de iones.
  
- *Fuentes de desorción:* en las fuentes de desorción, los iones se forman en la fase condensada. Una gran ventaja de la ionización por desorción es que permite el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente inestables. Ejemplos de fuentes de desorción son desorción por campo, bombardeo de átomos acelerados, MALDI y electrospray.
  
- Desorción por campo: la desorción por campo es una técnica valiosa para el estudio de fenómenos como especies de desorción y los resultados de reacciones químicas en superficies. También es un método útil para las moléculas polares lipofílicas. El electrodo se monta sobre una sonda que puede ser removida del compartimento de la muestra y recubierta con una solución de la muestra. La ionización se

lleva a cabo aplicando alta potencia al electrodo. A veces es necesario calentar el emisor con corriente eléctrica.

- Bombardeo de átomos rápidos: adecuado para moléculas de naturaleza polar o polaridad intermedia y moléculas termolábiles (muy recomendable para moléculas biológicas grandes difícilmente volatilizables). El intervalo de medida en rutina es de 50 a 2.500 umas. Consiste en el bombardeo con un haz de átomos rápidos sobre una muestra sólida provocando la desorción e ionización de las moléculas de ésta. El haz atómico se produce acelerando los iones desde una fuente a través de una celda de carga. Los iones levantan un electrón en colisión con átomos neutrales (comúnmente xenón o argón) para formar un rayo de átomos de alta energía. La técnica de FAB (Fast Atom Bombardement) es una técnica de ionización blanda y no induce mucha fragmentación en la molécula aunque en algunas ocasiones sí puede existir abundancia de iones fragmento. Se pueden detectar iones positivos y negativos del tipo  $M+H^+$  ó  $M-H^-$ , aunque en algunas ocasiones puedan verse iones del tipo  $M^+$  ó  $M^-$ . La detección en modo positivo o negativo dependerá de la naturaleza de la muestra (moléculas con carácter básico se ionizarán preferentemente en modo positivo y las de carácter ácido en modo negativo).
- MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption): adecuado para moléculas de naturaleza polar o polaridad intermedia con una masa molecular hasta 100.000 umas. La muestra se mezcla con una matriz que absorbe la energía procedente de un láser. Se pueden detectar iones positivos y negativos y generalmente son monocargados (aspecto deseable en la espectrometría de masas). Mediante un proceso complejo se transfiere normalmente un protón al compuesto generando un ion  $M+H^+$  que se detecta en modo positivo. En algunas ocasiones la molécula ioniza directamente perdiendo un electrón dando lugar a un ion  $M^+$ . También es posible la abstracción de un protón generando un ion  $M-H^-$  cargado negativamente. Esta técnica, puesto que viene acoplada al analizador de tiempo de vuelo, permite abordar el estudio de moléculas con elevado peso molecular, muy indicada para el análisis de compuestos polímeros. Moléculas con masa molecular de 300 umas o inferior y de naturaleza

polar, ionizan también por MALDI pero su espectro de masas suele estar muy contaminado con las señales de la matriz, que también ioniza. La técnica MALDI es una técnica de ionización blanda y normalmente no induce fragmentación, por lo que en principio resulta adecuada para el análisis directo de mezcla de compuestos.

- **Electrospray:** permite el análisis de moléculas de naturaleza polar que puedan cargarse positiva o negativamente en disolución como aminas o ácidos respectivamente. Moléculas con carga en su estructura interna son muy adecuadas para ser analizadas mediante ésta técnica. En el caso de que la molécula no posea carga en su estructura, se recurre normalmente a la adición de un ácido o base volátil con el fin de generarlas. No es posible analizar muestras insolubles. Con esta técnica se pueden generar iones múltiplemente cargados ( $z > 1$ ) lo que permite abordar el estudio de moléculas con una masa molecular por encima del límite del analizador, siempre y cuando se produzca el proceso de multicarga. La presencia de sales en la muestra puede inhibir la ionización del producto. Permite ser acoplada a un HPLC para analizar mezclas de productos polares. Es una técnica de ionización muy blanda que no produce apenas fragmentación. Se produce normalmente el ion  $M+H^+$  en positivo y el ion  $M-H^-$  en modo negativo. Los iones observados proceden de la muestra en disolución y no existen iones procedentes de la matriz como en el caso de la técnica FAB ó MALDI.

Con respecto al analizador de masas, su objetivo es separar los iones que se producen en la fuente de acuerdo a las diferentes relaciones de masa/carga. Los diseños de analizador más comunes incluyen los analizadores de sector magnético, por tiempo de vuelo, por trampa de iones y de cuadrupolo.

- *Analizador de sector magnético:* el analizador de sector magnético emplea un campo magnético que hace que los iones viajen en un trayecto circular de 180, 90 ó 60 grados. Inicialmente los iones son acelerados a través de la ranura de entrada al tubo de metal del analizador. Los iones de diferentes



masas pueden ser barridos a través de la ranura de salida variando la fuerza del campo del magneto o el potencial de aceleración entre ambas ranuras. Los iones que pasan a través de la ranura de salida caen en un electrodo colector, resultando en la corriente que luego es amplificada y registrada.

- *Analizador por tiempo de vuelo:* un espectrómetro de masas por tiempo de vuelo usa las diferencias de tiempo que tardan los iones generados y acelerados en llegar a un electrodo colector debido a su diferente relación masa/carga. Los iones de la fuente son acelerados por un pulso de campo eléctrico. Las partículas aceleradas luego pasan a través de un tubo de vuelo de un metro de largo.
- *Analizador por trampa de iones:* el ion es focalizado y mantenido dentro de la trampa de iones usando un sistema de lentes electrostáticas que generan pulsos de apertura y de cierre. El tiempo durante el cual el ion se mantiene dentro de la trampa de iones, denominado "periodo de ionización", se selecciona para maximizar la señal y minimizar los efectos "espacio-carga". Estos efectos resultan de una concentración excesiva de iones dentro de la trampa causando distorsiones en los campos eléctricos, llevando a una reducción global del rendimiento. La trampa se llena generalmente con Helio a una presión de 1 mtorr. Las colisiones de los iones con las moléculas de Helio disminuyen la energía cinética de estos contrayendo su trayectoria rápidamente hacia el centro de la trampa, permitiendo el almacenamiento de estos. Los iones atrapados son así focalizados en el centro de la trampa usando un potencial oscilante (rf fundamental), aplicado al electrodo de anillo.
- *Analizador de cuadrupolo:* un campo cuadrupolo está formado por cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua que afecta la trayectoria de los iones viajando por el trayecto centralizado entre los 4 rodillos. Para los voltajes dados, solamente los iones de una relación masa/carga determinada pueden pasar a través del filtro del cuadrupolo,

mientras los otros son barridos como moléculas descargadas. Al variar las señales eléctricas a un cuadrupolo es posible variar el rango de la relación masa/carga transmitido. Esto hace posible el barrido espectral.

Para la obtención de espectros de masas de forma rutinaria, se trabaja en condiciones de baja resolución obteniendo espectros de masas en los que se representan las relaciones  $m/z$  de los iones obtenidos con una precisión en la primera cifra decimal. Cuando se requiere determinar la masa exacta de los iones detectados, se trabajará en alta resolución, condición de trabajo que permiten las técnicas de impacto electrónico, FAB y MALDI.

Las técnicas de ionización blandas como MALDI y Electrospray inducen fragmentación escasa en la molécula aportando poca información estructural de la misma. En técnicas de MS/MS y  $MS^n$  (acopladas tanto a MALDI como a electrospray) es preciso seleccionar el ion a fragmentar, por lo que es necesario un estudio previo de la muestra en modo normal (MS) con el fin de observar los iones a fragmentar.

De las diferentes formas de ionizar y seleccionar moléculas, en el campo del análisis cualitativo y cuantitativo de especies de interés farmacológico, las más comunes son la fuente de ionización electrospray y por impacto electrónico con un analizador de masas de simple o triple cuadrupolo o trampa de iones.

### **3.2. Acoplamiento HPLC-MS**

La espectrometría de masas combinada con el poder de separación de la cromatografía ha revolucionado la química analítica de nuestros tiempos. La asociación entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas se hizo posible gracias al desarrollo de técnicas de ionización a presión atmosférica (API). Las técnicas de API usadas en HPLC-MS son electrospray y APCI (ionización química a presión atmosférica). Ambas son técnicas que utilizan voltajes altos y nebulización mecánica para producir iones en fase gaseosa. Producen iones

quasimoleculares ( $M+H^+$  ó  $M-H^-$ ). Producen poca fragmentación y son técnicas muy sensibles.

Las diferencias entre ellas radican en la forma que tiene cada una de generar los iones:

- APCI ioniza en fase gaseosa, por lo que está más recomendado a compuestos menos polares y más pequeños con cierta volatilidad. Tiene la ventaja de que permite trabajar con flujos de trabajo más altos (hasta 2 mL/min).
- Electrospray ioniza en disolución, por lo que está muy indicada para compuestos polares y biomoléculas (poco volátiles y termolábiles). Debido a esto, el flujo de trabajo no debe superar 1 mL/min.

### 3.2.1. APCI

El eluyente del LC entra en la interfase a través de la sonda. Aplicando un flujo coaxial de nitrógeno (gas de nebulización) y calentando (300-600 °C), el eluyente se convierte en vapor. El flujo líquido se fuerza a través de un tubo estrecho para darle velocidad lineal alta. A pesar de la elevada temperatura que se aplica en la sonda, la mayor parte del calor se invierte en la evaporación del disolvente, por lo que la molécula solo sufre un pequeño efecto de calor gracias a la protección del disolvente. Aun así, en algunos casos puede producir degradación en compuestos termolábiles. Este vapor sale por la punta de la sonda y pasa entre el cono de muestra y el electrodo de descarga de corona, en el que se aplica un voltaje entre 2-5 KV. Los iones generados por la descarga de corona reaccionan rápidamente con moléculas de la fase móvil para producir iones secundarios estables o reactivos. Las moléculas de analito reaccionan con los iones reactivos y habitualmente se protonan (modo positivo) o desprotonan (modo negativo).

Una pequeña cantidad del gas es arrastrado a través del orificio del cono de muestra; el resto va a parar al deshecho. Diferencias de presión y voltaje dirigen los iones a través del cono de muestra, cono de extracción y las lentes RF (octopolo) hasta el analizador.

### 3.2.2. Electrospray

El efluente del LC entra en la interfase a través de la sonda capilar. Aplicando un voltaje alto (2-4 KV) y con un flujo coaxial de nitrógeno (gas de nebulización) el efluente se convierte en un aerosol cargado positiva o negativamente (en función del potencial aplicado al capilar). Un flujo de nitrógeno calentado (gas de desolvatación) ayuda a la evaporación del disolvente a través de la fuente. Las gotas emitidas por el capilar de electrospray disminuyen su tamaño como consecuencia de la evaporación del disolvente mientras la carga de la gota permanece constante. La disminución del radio de la gota a carga constante supone un aumento de la repulsión de cargas en la superficie de la gota. Para un radio dado, esta repulsión supera la tensión superficial de la gota, lo que produce la ruptura de ésta. Esta secuencia se repite muchas veces formando gotas muy pequeñas. No se conoce exactamente el fenómeno por el que se consigue la volatilización iónica definitiva, pero se proponen dos modelos:

- Modelo de evaporación iónica: a partir de gotas con un radio inferior a 10 nm, debido a repulsiones electrostáticas, prima la evaporación iónica en la superficie de la gota que la fisión de la misma, es decir, los iones pasan de la solución a fase gaseosa.
- Disgregación electrodinámica o modelo de carga residual: la fisión de la gota tiene lugar hasta la formación de gotas "hijas" extremadamente pequeñas que contienen un solo ion. La evaporación del disolvente en estas gotas produce iones en fase gaseosa.

Una pequeña cantidad del spray es arrastrada a través del orificio del cono de muestra; el resto va a parar al deshecho. Diferencias de presión y voltaje dirigen los iones a través del cono de muestra, cono de extracción y las lentes RF (octopolo) hasta el analizador.

Los factores que afectan a la respuesta del analito en electrospray son:

- Concentración del analito: se produce una saturación en la señal debido al "apiñamiento" de moléculas en la gota, no permitiendo a algunas moléculas de analito alcanzar la superficie y siendo imposible, por tanto, la ionización de éstas.

- Contenido de la matriz: en general la respuesta para el analito disminuye con el aumento de la concentración de otros electrolitos. Esto se conoce como "supresión iónica". Se debe a la competencia entre el analito y el electrolito por la carga y la ocupación de la superficie de la gota.

- Actividad superficial del analito: la sensibilidad de un compuesto en la ionización electrospray es determinada por su actividad superficial; los iones que la favorecen son los que formarán iones en fase gaseosa con mayor probabilidad.

- Flujo: la respuesta del analito en electrospray disminuye con el aumento del flujo de fase móvil debido a que el tamaño de las gotas aumenta con éste.

En ocasiones nos encontramos con especies con múltiples cargas. Este fenómeno solo se da en electrospray, debido a la baja probabilidad de que un analito dado pueda sufrir múltiples reacciones de ionización en fase gaseosa (situación de la APCI). Además los analitos que presentan múltiples cargas suelen ser moléculas grandes poco volátiles con tendencia a la degradación térmica.

Las partes integrantes de una interfase API son las siguientes:

- *Sonda*: introduce el efluente del HPLC en la interfase volatilizado (en el caso de APCI) o nebulizado e ionizado (en el caso de electrospray).
- *Electrodo de descarga de corona*: sólo en APCI. Forma una zona de descarga de corona (plasma) debido a la alta temperatura y a la diferencia de potencial entre éste y el cono de muestra.
- *Cono de muestra*: dirige los iones a la primera zona de vacío. La expansión de estos provoca un enfriamiento que se puede traducir en la formación de "clusters" de los analitos con moléculas de disolvente. Para evitar esto se aplica calor a esta zona. Es el responsable de la ionización de las moléculas y de la fragmentación de las mismas: a mayor peso molecular, mayor voltaje requerido para la ionización. El aumento del voltaje produce fragmentación.

- *Cono de extracción*: dirige los iones aun segundo estadio de vacío donde se encuentran las lentes de enfoque del octopolo.
- *Lentes RF del octopolo*: dirige los iones hacia el centro del analizador de masas. Posee una combinación de voltajes de DC (corriente continua) y RF (radiofrecuencia, una frecuencia de corriente alterna). El voltaje se suele fijar a un offset fijo de DC mientras que el RF varía de forma sincronizada con el analizador de masas.
- *Analizador de masas*: tiempo de vuelo (TOF), simple o triple cuadrupolo y trampa de iones.
- *Detector*: el detector dinolito consiste en un fotomultiplicador ópticamente alineado con un fósforo emisor de luz y con un dínodo de conversión de alto voltaje para conseguir alta sensibilidad tanto en modo positivo como en modo negativo.

### 3.3. Equipos de espectrometría de masas tipo MS<sup>n</sup> y MS/MS

Si se tiene en cuenta que una vez volatilizada e ionizada la molécula de interés, va a ser filtrada en relación a su m/z, la detección de ésta se llevará a cabo aislada de cualquier otra especie no ionizada o ionizada con m/z diferente. Si sumado a este hecho, se tiene en cuenta que podemos fragmentarla obteniendo especies químicas derivadas de la molécula de interés, podremos decir que la espectrometría de masas es una técnica con un alto grado de especificidad.

Sin embargo, existen casos en los que se hace necesario un mayor grado de especificidad (análisis en los que la concentración en la que aparece la especie de interés es muy baja y en matrices muy "complejas"). Para ello hay que tratar de "limpiar" la muestra en el analizador antes de que llegue al detector. Esto es precisamente lo que hacen los equipos de MS<sup>n</sup>.

#### 3.3.1. Equipos de trampa iónica (MS<sup>n</sup>)

En el caso de los equipos de trampa iónica el funcionamiento consiste en:

1. En un primer paso el efluente previamente volatilizado e ionizado, pasa a la trampa de iones, formada por un espacio delimitado por tres electrodos (terminales y anillo) donde los iones son almacenados (con trayectorias estables).
2. En ese momento se elige un ion (llamado *ion precursor*) y mediante potenciales DC y RF se desestabilizan el resto de iones contenidos en la trampa, pudiendo aislarse (isolation) el ion precursor para su posterior fragmentación (aplicando diferentes voltajes) obteniéndose varios *iones producto* provenientes de la fragmentación del ion precursor. A esta forma de trabajar en MS-MS con la trampa se le denomina *product ion scan* (*barrido de iones producto*).
3. La trampa de iones ofrece la posibilidad de seleccionar de ese barrido de iones producto un nuevo ion, sobre el que se le puede aplicar de nuevo el paso anterior obteniendo en ese caso *iones nieto* del ion precursor. Se puede repetir este paso tantas veces lo permita la molécula a analizar y en función de la sensibilidad que se requiera para el análisis. Debido a esta particularidad de la trampa, cuando se nombra con siglas a la trampa como detector de un cromatógrafo de líquidos o gases se escribe: GC-MS<sup>n</sup> o HPLC-MS<sup>n</sup>.

### 3.3.2. Equipos de triple cuadrupolo (MS/MS)

En el caso de los equipos de triple cuadrupolo el funcionamiento consiste en tres etapas:

- 1<sup>a</sup>. En un primer paso el efluente previamente volatilizado e ionizado, pasa a través del primer cuadrupolo (Q1) donde se focaliza un ion en relación a su  $m/z$  (al igual que ocurría en la MS convencional).
- 2<sup>a</sup>. Este ion (llamado *ion precursor*) es transferido a un segundo cuadrupolo (Q2) que se comporta como una célula de colisión donde interacciona con un gas de colisión y se fragmenta.
- 3<sup>a</sup>. En un tercer cuadrupolo (Q3) se focaliza uno o varios de los *iones producto* proveniente de la fragmentación del ion precursor.

Existen diferentes formas de llevar a cabo una medida en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo:

- *Product ion scan*: el ion precursor es fijado en Q1 y transferido a Q2 donde se fragmenta. Los iones producto originados son medidos mediante el barrido en Q3. En este modo, se obtiene el típico espectro MS/MS. Este es el método más empleado para LC-MS y/o ionización por electrospray.
- *Precursor ion scan*: en este caso, en Q3 se fija la medida de un ion producto determinado y se hace el barrido en Q1. El resultado obtenido es el espectro del ion precursor del que proviene el ion producto fijado en Q3. Este método es especialmente útil para GC-MS y/o ionización química o por impacto electrónico.
- *Neutra loss scan*: se lleva a cabo un barrido tanto en Q1 como en Q3 con el objetivo de obtener el espectro del ion precursor que sufre la pérdida de una especie neutra. De nuevo está indicado para ionización química e impacto electrónico.

A continuación, se describen los aspectos más importantes para este estudio, de los medicamentos que se han analizado.

#### **4. AGONISTAS $\beta$ -ADRENÉRGICOS**

Los compuestos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (Figura 1.3) en un principio fueron desarrollados para el tratamiento de enfermedades pulmonares obstructivas crónicas. Recientemente han sido foco de atención debido a su empleo en la cría de animales, como promotores del crecimiento, ya que producen un incremento de la masa muscular junto con una disminución de la masa grasa (19). Debido a la actividad farmacológica de estos compuestos, los residuos en tejidos comestibles son potencialmente tóxicos y en consecuencia se ha prohibido su uso en los países de la Unión Europea. Sin embargo, se usan de forma ilegal como se ha puesto de manifiesto en diferentes laboratorios (20).



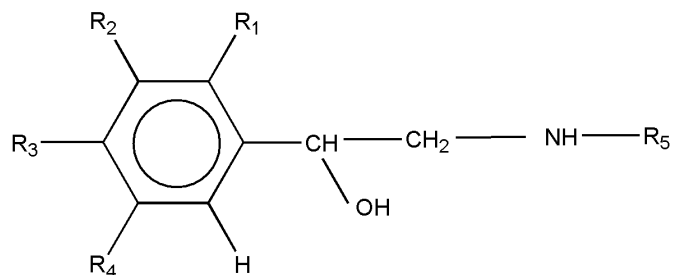
Los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos son sustancias de estructura análoga a la adrenalina y noradrenalina ( $\beta$ -feniletanolamina). Cabe citar numerosas variantes: clenbuterol, cimaterol, salbutamol, terbutalina, ractopamina, mabuterol, mapenterol, clempenterol, brombuterol, etc.

Anteriormente, los métodos de screening fueron los empleados para detectar la presencia de una sustancia o grupo de sustancias a una concentración mínima específica. Se caracterizan por ser capaces de analizar un elevado número de muestras en poco tiempo con el fin de detectar posibles positivos. Con ellos se trata de evitar falsos negativos proporcionando resultados cualitativos o semicuantitativos, con bajo coste requiriendo tan sólo pequeñas cantidades de muestra. Entre los métodos más usados para el análisis de *screening*, podemos citar los métodos cromatográficos (HPTLC, HPLC, GC) y los métodos inmunológicos (ELISA) (21).

Las pruebas inmunológicas como el radioinmunoensayo o el enzimoimmunoensayo, tienen una buena efectividad a nivel de pruebas de "*screening*", es decir, como metodologías rápidas y presuntivas, pero no tienen un alto valor legal a causa del relativamente alto número de falsos positivos (10-15%), por lo cual se precisan métodos de confirmación.

Actualmente se han publicado métodos de confirmación, para controlar el uso ilegal de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, (22) que permiten confirmar y determinar los residuos en diferentes matrices basados en técnicas cromatográficas, tanto cromatografía gaseosa (GC) (23-25) como cromatografía líquida (HPLC) (26) y electroforesis capilar (CE) (27, 28). Aunque es preferible emplear la cromatografía líquida pues estos compuestos no son volátiles y se requieren procesos de derivatización antes de intentar la separación por GC.

También se ha propuesto la utilización de biosensores empleando polímeros basados en la huella molecular y detección por voltametría para la determinación de clenbuterol, salbutamol y terbutalina (29).

Figura 1.3.- Estructura general de los agonistas  $\beta_2$ - adrenérgicos:

Analito	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Mabuterol	H	Cl	NH <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Mapenterol	H	Cl	NH <sub>2</sub>	CF <sub>3</sub>	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Clembuterol	H	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Clempenterol	H	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
Brombuterol	H	Br	NH <sub>2</sub>	Br	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Tulobuterol	Cl	H	H	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Cimaterol	H	CN	NH <sub>2</sub>	H	C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Ractopamina	H	H	OH	H	CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -PhOH
Hidroxiclembuterol	H	Cl	NH <sub>2</sub>	Cl	CH(OH)CH <sub>2</sub> NHC(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CHOH

#### 4.1. Legislación del Clembuterol y del resto de agonistas $\beta$ -adrenérgicos

El clembuterol es el único de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos que posee límite máximo de residuo (LMR), según el anexo I del reglamento nº 2370/90/CEE, en especies de bovino y equino que por tocolisis o enfermedades pulmonares hayan sido tratados con este medicamento. En la tabla 1.2 se muestra dicho LMR en las diferentes matrices.

El LMR del clembuterol en las diferentes matrices y especies es muy bajo, por lo que se requieren métodos muy sensibles, como si de una sustancia prohibida se tratara, para su detección.

Tabla 1.2.- Límite máximo de residuo (LMR) del clenbuterol en las distintas especies y matrices.

<b>Analito</b>	<b>Especie</b>	<b>LMR (<math>\mu\text{g}/\text{kg}</math>)</b>	<b>Matrices</b>
Clenbuterol	Bovino	0,1	Músculo
		0,5	Hígado
		0,5	Riñón
		0,05	Leche
	Equino	0,1	Músculo
		0,5	Hígado
		0,5	Riñón

Cualquier otra sustancia con efecto agonista  $\beta$ -adrenérgico (grupo A5) se considera prohibida su presencia en animales con destino al consumo humano. Por tanto los métodos multiresiduo de detección de estas sustancias deberán poseer límites de decisión ( $CC\alpha$ ) lo más bajo posibles. Además, no existe aún ningún límite mínimo de funcionamiento (MRPL) publicado en ninguna Decisión para estas sustancias.

## **4.2. Referencias bibliográficas para su análisis**

### 4.2.1. Muestreo

El muestreo es una etapa que puede ser fuente de errores, sobre todo si se trata de piensos. En el caso de la elección de muestras de tejidos, la elección de varias partes funcionales de un órgano puede tener una gran influencia en la cantidad de analito encontrado, así puede ser diferente en los distintos lóbulos del hígado, en el córtex y médula del riñón. En caso de utilizar pelo, este debe ser negro. Las muestras se deben conservar a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar contaminaciones microbiológicas.

### 4.2.2. Pretratamiento

La homogenización es la etapa más importante para la exactitud de los resultados en el caso de muestras sólidas y la centrifugación o filtración para las muestras líquidas. La hidrólisis enzimática o química de los conjugados (glucurónidos y sulfatos) es también indispensable para el análisis de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en un análisis multiresiduo. La proteinización se puede llevar a cabo de forma enzimática o por precipitación ácida o de forma conjunta.

#### 4.2.3. Extracción/purificación

Esta etapa del análisis se puede llevar a cabo por extracción líquido líquido (ELL), extracción en fase sólida (EFS), dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), molecular imprinted polymers (MIPs), diálisis y extracción por fluidos supercríticos (EFS).

Se ha descrito la EFS con una mezcla de fases ( $C_8$  + SCX) como técnica para un análisis multiresiduo de muestras líquidas y la DMFS con  $C_{18}$  para muestras sólidas. La muestra de pelo se lava, seca y digiere con HCl 0,1 M. El sobrenadante se neutraliza con NaOH 1M y posteriormente se realiza una EFS (30).

Tras la hidrólisis enzimática, los extractos acuosos de hígado divididos en partes iguales se purifican con dos columnas de EFS iguales para impedir la saturación de las columnas (31).

También se ha publicado la utilización de extractos de hígado hidrolizados químicamente con ácido perclórico y purificados con dos procesos distintos de EFS, con  $C_{18}$  y SCX ha sido publicado (32).

Se han descrito procesos de purificación con MIPs, como herramientas para minimizar el efecto matriz de las muestras, para disminuir el efecto de la supresión iónica que ocurre en los equipos de HPLC asociados a detectores de masas (33 y 34). Su uso aún no es habitual en los laboratorios de control oficial de rutina por su alto coste frente a los beneficios que se obtienen (32).

#### 4.2.4. Determinación

Existen varias publicaciones con detección por espectrometría de masas asociada a cromatografía gaseosa (35-40), pero las técnicas que usan como sistema de detección la espectrometría de masas (MS) asociada a la cromatografía líquida permiten determinar de forma inequívoca compuestos polares como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos sin necesidad de derivatización y con una alta sensibilidad, por ello hay que considerarlas como las de elección. Aunque la bibliografía encontrada es todavía escasa (sólo 10 artículos), su empleo permitirá poner de manifiesto el uso abusivo de estos compuestos y proteger a los consumidores (31-34,41-45).

## 5. ANTIBIÓTICOS: CLORANFENICOL.

La ganadería ha sido durante miles de años una de las actividades humanas más importantes, junto con la agricultura, para el desarrollo de las sociedades y el mantenimiento de la calidad de vida. La ganadería permite la conversión de alimentos poco nutritivos y poco digeribles como son los vegetales, en productos de alto valor proteico como carne, huevos y leche. En la actual ganadería extensiva, el confinamiento de un gran número de animales en lugares pequeños y sin movilidad crea un ambiente propicio para la aparición de enfermedades y su rápida propagación.

El suministro de antibióticos vía parenteral, como aditivos de los piensos o en el agua de bebida, se ha convertido en una práctica imprescindible para la producción animal. Inicialmente su empleo va dirigido tanto al tratamiento de enfermedades infecciosas como en la prevención de estas, si bien también se utilizan fraudulentamente para estimular el crecimiento de los animales. Como consecuencia de su aplicación buscando estos beneficios, aparecen residuos de antibióticos en los alimentos que van a ser consumidos por el hombre. Como la seguridad de los alimentos destinados al consumo humano debe ir por delante de las consideraciones económicas, se han creado sistemas de control a nivel internacional para prevenir que alimentos contaminados con residuos entren en la cadena alimentaria humana.

Los posibles efectos nocivos que los residuos de los antibióticos empleados en la producción animal pueden tener sobre el consumidor son varios:

a) toxicidad aguda inherente. Si se sigue un empleo adecuado de los antibióticos en dosis y plazos de seguridad, las concentraciones que se deben encontrar son muy bajas, por ello se habla de “residuos”, y entonces el riesgo de toxicidad aguda para el hombre es remoto. Sin embargo es posible la alteración de la flora intestinal habitual del consumidor.

b) efectos tóxicos sin relación dosis/respuesta. En individuos susceptibles al cloranfenicol, se ha descrito anemia aplásica sin guardar una relación clara con la dosis ingerida. Las respuestas de tipo alérgico a otros antibióticos como los  $\beta$ -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas) son bien conocidas y bastante comunes.

- c) efectos mutágenos, carcinógenos y teratógenos.
- d) aparición de resistencias bacterianas.

La posibilidad de aparición de cualquiera de estos efectos no deseados no puede despreciarse, puesto que los alimentos van dirigidos a toda la población, y por lo tanto incluyen mujeres embarazadas, niños, ancianos, individuos malnutridos y enfermos con patologías muy distintas, con lo que la repercusión de estos residuos sobre la salud de la población general se hace difícilmente previsible.

### **5.1. El problema de la determinación de los residuos de antibióticos**

Los antibióticos, como moléculas xenobióticas que son en el organismo de los animales, sufren procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Cuando se habla de “*residuos*”, se entiende “*residuos totales*” y que incluyen por tanto, la molécula del antibiótico intacta y los metabolitos derivados de éste. La cuantificación del antibiótico intacto y de todos sus metabolitos en todos los tejidos es en la práctica imposible, por ello se introducen los conceptos de “*residuos marcadores*” y “*tejidos diana*”.

El “residuo marcador” es una molécula, bien el antibiótico intacto o bien un metabolito mayoritario, que es fiel reflejo de su presencia en el animal, mientras que el “tejido diana” es el/los lugar/es donde el residuo marcador se localiza preferentemente. Para los antibióticos que no se metabolizan significativamente, el residuo marcador es la molécula intacta del antibiótico y es una muy buena aproximación de los residuos totales, mientras que si sufre un metabolismo intenso, se elige como marcador a un metabolito mayoritario de fácil determinación, siendo su concentración en este caso una proporción conocida del total de los residuos. El tejido diana más utilizado para el análisis de residuos suele ser el hígado, y en menor medida, músculo, riñón y grasa.

Las razones que dificultan el análisis de los residuos de antibióticos son muchas, puesto que se encuentran a concentraciones muy bajas (del orden de  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) y en matrices biológicas muy complejas, existen un gran número de antibióticos de naturaleza química distinta y dentro de un mismo compuesto es posible que se encuentre bien no biotransformado o bien en forma de metabolitos,

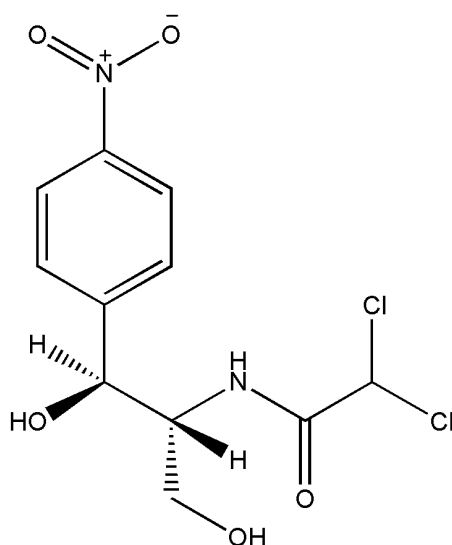
muchos metabolitos (en especial los conjugados con ácido glucurónico o con sulfatos) son muy polares y por tanto difícilmente extraíbles, la presencia de metabolitos de estructura y comportamiento semejante al analito elegido puede interferir en el análisis, y además, no siempre se encuentran disponibles en el comercio los patrones adecuados. Todo ello complica el análisis y hace necesario tanto un correcto pretratamiento de la muestra como una confirmación de los resultados.

## 5.2. Anfenicoles

Cloranfenicol, tianfenicol y florfenicol son antibióticos de amplio espectro. El cloranfenicol se aisló inicialmente de *Streptomyces venezuelae*, si bien hoy en día se obtiene por síntesis, como el tianfenicol y florfenicol. Su peso molecular es bajo. El cloranfenicol se ha prohibido en uso veterinario en la UE y USA. El cloranfenicol y sus metabolitos presentan efectos tóxicos poco frecuentes pero muy graves, entre ellos se incluye la depresión de médula ósea, un síndrome tóxico con resultado de muerte en personas predispuestas y genotoxicidad. El tianfenicol presenta un metabolismo hepático menor, se excreta más por vía renal y no produce anemia aplásica. El florfenicol se usa exclusivamente en ganadería y piscicultura.

El mecanismo de acción de este grupo de antibióticos se basa en la inhibición de la síntesis proteica por interacción con los ribosomas. En cuanto a su farmacocinética: se administran vía oral en los piensos o el agua, vía intramuscular y vía intravenosa. El cloranfenicol se absorbe muy bien vía oral, se metaboliza con rapidez en hígado formando un conjugado con ácido glucurónico en la mayoría de especies, sin embargo este derivado conjugado no se encuentra en el músculo de pollo, cerdo y ternera, el cloranfenicol intacto es mayoritario en plasma, músculo y grasa, y es importante en hígado (26%) y riñón (18%). Por vía parenteral, entra en circuito enterohepático, alargando su vida media. En peces también se metaboliza en hígado dando diversos metabolitos (conjugado con ácido glucurónico, cloranfenicol base, hidroxilado y oxamato), que se excretan en la orina. En la figura 1.4 se muestra la estructura molecular del cloranfenicol.

Figura 1.4.- Estructura molecular del cloranfenicol.



El tianfenicol, sea cual sea la vía de administración se excreta mayoritariamente sin alterar por vía renal, sólo forma un derivado conjugado con ácido glucurónico de forma apreciable en cerdo, la eliminación es mucho más rápida que la del cloranfenicol. En pollos se localiza con preferencia en la piel/grasa y en menor medida en músculo, riñón e hígado. En besugo se localiza en hígado, músculo y piel.

El florfenicol se emplea especialmente en las piscifactorías de salmón y trucha, un tejido adecuado para su análisis es el músculo/piel.

### 5.2.1. Cloranfenicol

El cloranfenicol debido a su citada peligrosidad y toxicidad no se le puede asignar un límite máximo de residuo (LMR) en los alimentos de origen animal, por ello está incluido en el anexo IV del reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo del 26 de Junio de 1990. El florfenicol y el tianfenicol, a diferencia del cloranfenicol, si poseen un LMR y se encuentran en el anexo I del citado reglamento.

Con la publicación de la Decisión de la Comisión 657/2002/CEE aparece el concepto de MRPL o límite mínimo de funcionamiento exigido, como el contenido mínimo de un analito que debe ser detectado y confirmado.



La Decisión de la Comisión 181/2003/CEE de 13 de marzo de 2003 modifica la Decisión 657/2002/CEE en cuanto al establecimiento de MRPL para determinados residuos en alimentos de origen animal estableciendo un MRPL para el cloranfenicol en carne, huevos, leche, orina, productos de acuicultura y miel de 0,3 µg/Kg.

La Unión Europea para garantizar el cumplimiento de dicho MRPL recomienda a los laboratorios que usen métodos específicos (de un solo residuo) para sustancias especialmente peligrosas como el cloranfenicol.

En este estudio se ha investigado en la elaboración de uno o varios métodos analíticos para la determinación de cloranfenicol en múltiples matrices: tejido animal (músculo, riñón de varias especies animales y productos de acuicultura) huevos, ovoproductos, leche y miel.

El método debe ser de confirmación mediante espectrometría de masas al tratarse de una sustancia del grupo A6 como indica la Decisión de la Comisión 657/2002/CEE. Y debe cumplir también el MRPL del cloranfenicol de 0,3 µg/Kg para las citadas matrices.

Finalmente se presenta dos métodos de extracción y purificación distintos, uno para la determinación de cloranfenicol en tejido animal, huevos y ovoproductos y otro para la determinación de cloranfenicol en leche y miel, siendo la detección con el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> para ambos métodos.

### **5.3. Referencias bibliográficas para su análisis**

A diferencia de otros antiinfecciosos, el cloranfenicol, presenta un espectro con una fuerte absorción en el UV lo que permite utilizar esta propiedad para su detección aunque la detección con espectrómetros de masas es la más difundida. Por otro lado se puede extraer con disolventes orgánicos lo que facilita su aislamiento. Se ha estudiado el efecto que la preparación de la muestra (músculo y riñón de cerdo) tiene sobre la cuantificación con la técnica ELISA, el extracto con menos interferencias se obtuvo a partir de una mezcla de tampón de acetato (pH 5) y acetonitrilo, la mejor purificación se consigue añadiendo ácido clorhídrico al

extracto acuoso antes de purificar con un cartucho de fase sólida de C<sub>18</sub>, la determinación se puede también realizar con LC-UV (270nm) con la misma preparación de muestra (46).

Otra extracción semejante para determinar cloranfenicol en carne, leche, huevos y miel consiste en extraer con acetonitrilo, re-extraer con cloroformo, concentrar a sequedad, redissolver en metanol, purificar con un cartucho de C<sub>18</sub> y determinar con HPLC-MS en modo ión negativo (47). Es posible la extracción desde huevos del cloranfenicol mediante CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico sin ningún aditivo, el analito se retiene en un lecho de Florisil y se eluye con la fase móvil de agua/metanol para determinarse por UV (280nm) (48). Para el análisis de cloranfenicol en hígado, se ha propuesto un procedimiento en el que se adiciona agua para obtener un homogeneizado, se desengrasa con hexano, se extrae con acetato de etilo y se reextrae con un cartucho de sílice que a su vez se eluye con un tampón de fosfato (pH 10) y se re-extrae de nuevo con acetato de etilo, se lleva a sequedad y se redissuelve en hexano/cloroformo se extrae de nuevo por reparto con una solución acuosa y se analiza con HPLC-UV (278nm), confirmando con HPLC-MS (49).

El cloranfenicol es uno de los pocos antinfeciosos que puede determinarse por GC, se ha comparado la técnica de GC-MS con HPLC-MS-MS, resultando más sensible esta última (50). Otro estudio propone el screening del cloranfenicol en peces con ELISA y la confirmación con GC-MS-MS y HPLC-MS-MS, los extractos primarios se obtienen bien con agua o bien con acetato de etilo para realizar la prueba ELISA, y con acetato de etilo, con un paso de eliminación de grasas con reparto en hexano para las confirmaciones, la purificación de la muestra se realiza con columnas de C<sub>18</sub>, la determinación con GC se lleva a cabo tras formar derivados sililados (51).

Otros estudios que conllevan procesos muy largos de preparación de la muestra, con extracciones acuosas seguidas de extracciones con acetato de etilo/eter dietílico, con purificaciones con cartuchos de sílice seguidos por más procesos de purificación L-L (52), demuestran una gran disminución del efecto matriz y el alcance en matrices como músculo animal y productos de acuicultura de

un límite de cuantificación muy bajo con exactitud y precisión aceptables con detectores de masas de tipo triple cuadrupolo.

En la actualidad no hay ningún método analítico publicado para la determinación cuantitativa de cloranfenicol que use como detector de masas asociado a cromatografía líquida una trampa iónica.

Desde la publicación de la Decisión 657/2002/CEE las referencias al límite de decisión o CC $\alpha$  comienzan a aparecer en las publicaciones científicas de métodos analíticos para la determinación de residuos zoonos. En el caso del cloranfenicol, al existir límite mínimo de funcionamiento (MRPL) para todas las matrices, se observa una tendencia en los autores por publicar CC $\alpha$  extremadamente bajos respecto al MRPL de 0,3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Para conseguir estos límites de decisión acuden a diferentes cálculos matemáticos contemplados en las diferentes guías de aplicación de la citada Decisión publicadas por la Comisión europea. La mayoría de estos autores (53-56) una vez calculado el CC $\alpha$  no demuestran experimentalmente que a ese nivel consiguen identificar el analito en la matriz correspondiente al menos en el 50% de los casos. Además, todos ellos, comienzan sus curvas de calibrado en niveles de concentración próximos al MRPL del cloranfenicol, donde si demuestran identificar perfectamente la molécula.

## **6. ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINEs)**

Representan un grupo de compuestos heterogéneo y extensamente utilizado en terapéutica tanto en humanos como en animales por su capacidad de suprimir o reducir procesos inflamatorios y otros signos asociados a ellos.

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), que es un enzima que permite al organismo obtener prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La ciclooxigenasa (COX) tiene varias isoformas, las más conocidas son las isoenzimas: COX-1 y COX-2. Ambas presentan diferencias; la COX-1 es constitutiva y es la responsable de formar las prostaglandinas con función protectora, mientras que la COX-2 es inducible y aparece cuando se desarrolla un proceso inflamatorio, y formaría las prostaglandinas que intervienen en la inflamación. Las prostaglandinas participan en muchos procesos, entre ellos el

inflamatorio; pertenecen al grupo de sustancias llamadas "mediadores de la inflamación", pero no sólo participan en este proceso pues tienen funciones protectoras de la mucosa gástrica, riñón, endotelio y plaquetas. Así pues, con los AINEs no selectivos que inhiben las dos isoformas de la COX, tenemos, no sólo efectos favorables para reducir la inflamación en la enfermedad, sino algunos efectos adversos por inhibición de las funciones protectoras que pueden ser más o menos acusados. Algunos ejemplos son naproxeno, fenilbutazona, indometacina, meloxicam, diclofenaco, ácido acetilsalicílico, etc.

En segundo lugar tendremos que destacar unos fármacos que han comenzado a utilizarse desde hace relativamente poco tiempo, que son los inhibidores selectivos de la COX-2. Estos fármacos, entre ellos meloxicam y nimesulida tienen una mayor capacidad para inhibir la COX-2 respecto a los inhibidores no selectivos, con lo cual deberían existir menos efectos secundarios, sobre todo a nivel gástrico, aunque esto sigue siendo motivo de debate, pues en algunos casos se necesitan dosis altas para igualar los efectos de los AINEs no selectivos. También celecoxib y rofecoxib son inhibidores selectivos de la COX-2, pero estos parece que aumentan el riesgo de padecer problemas cardiovasculares.

Los AINEs se utilizan ampliamente en la práctica de la veterinaria y por lo tanto es importante el control de los animales que derivan en alimentos. Los veterinarios han observado un aumento en el uso de fármacos antiinflamatorios en el ganado con y en ausencia de antibióticos, para el tratamiento de la mastitis, porque incrementan la eficacia de los mismos.

Hay poca información sobre la distribución y metabolismo de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos en ganado. En la tabla 1.3 aparecen los grupos farmacológicos de los AINEs que se han ido sintetizando en estos años.

Tabla 1.3.- Principales grupos de antiinflamatorios no esteroideos.

<b>AINEs</b>	<b>Grupo farmacológico</b>	<b>Fármacos prototipo</b>
Más antiguos	Salicilatos	Ácido acetilsalicílico, ácido metilsalicílico
	Pirazolona	Metamizol, oxifenilbutazona, fenilbutazona, propilfenazona y suxibuzona
Más recientes	Ácido antranílico	Diclofenato, flunixin, y ácido tolfenámico
	Ácido arilpropiónico	Carprofeno y naproxeno
	Ácido indolacético	Indometacina

Por otro lado la Unión Europea está en proceso de asignar los LMRs de los AINEs, pero no está completado. El ácido acetilsalicílico y sus sales no tienen un LMR establecidos, pero su uso está permitido en animales, excepto en peces y animales que produzcan leche y huevos para consumo humano. Tampoco hay un LMR para el paracetamol, su uso es por vía oral en porcino. Por otra parte, el uso de la fenilbutazona y la oxifenilbutazona no está recomendado en animales destinados al consumo humano según la legislación Europea (17,18). En la tabla 1.4 se presenta la clasificación y algunos ejemplos, así como los LMRs establecidos por la Legislación Europea (17,18).

Tabla 1.4.- Clasificación de antiinflamatorios y sus distintos LMRs.

<b>Principio activo</b>	<b>Especie animal</b>	<b>Tejido</b>	<b>LMR (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>)</b>
<b>Derivados del Ácido Arilpropiónico</b>			
Caprofeno	Bovino	Músculo	500
		Grasa	1.000
	Equino	Hígado	1.000
		Riñón	1.000
Vedaprofeno	Equino	Músculo	50
		Grasa	20
		Hígado	100
		Riñón	1.000
<b>Derivados del Grupo Fenamato</b>			
Flunixin	Bovino	Leche	40
		Músculo	20
		Grasa	30
		Hígado	300
		Riñón	100
	Porcino	Músculo	50
		Grasa	10
		Hígado	200
		Riñón	30
	Equino	Músculo	10
		Grasa	20
		Hígado	100
		Riñón	200
	Ácido Tolfenámico	Bovino	Músculo
Grasa			400
Hígado			100
Riñón			50
Porcino		Músculo	50
		Hígado	400
		Riñón	100

Principio activo	Especie animal	Tejido	LMR ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )
<b>Derivados del Oxicam</b>			
Meloxicam	Equino	Músculo	20
		Hígado	65
		Riñón	65
	Bovino	Músculo	20
		Hígado	65
		Riñón	65
		Leche	15
	Porcino	Músculo	20
		Hígado	65
Riñón		65	
<b>Derivado de la Pirazolona</b>			
Metamizol	Bovino, Porcino,	Músculo	200
		Equino	Grasa
	No se usa en animales productores de leche para consumo humano	Hígado	200
		Riñón	200
Fenilbutazona	Todas las especies	Cualquiera	No tiene
Oxifenilbutazona	Todas las especies	Cualquiera	No tiene

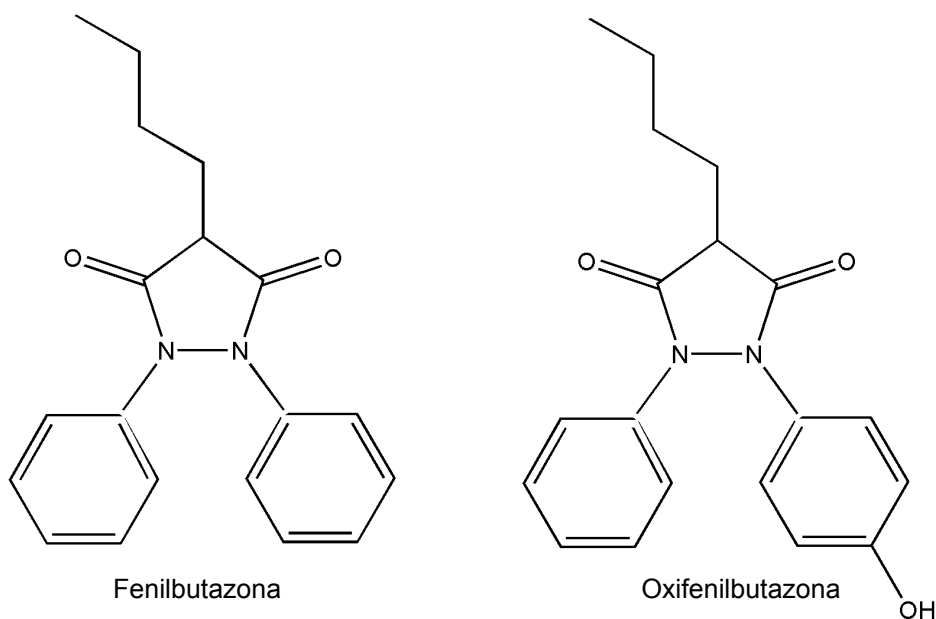
## 6.1. Fenilbutazona y Oxifenilbutazona

La fenilbutazona es un AINE usado en terapéutica veterinaria debido a sus efectos antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios. Pero produce toxicidad y efectos secundarios como gastrorragia, anemia aplásica y agranulocitosis tras un tratamiento prolongado (57).

La Unión Europea no ha establecido todavía un LMR para esta sustancia, pero se considera prohibida y requiere un control exhaustivo en tejido y productos de origen animal.

La fenilbutazona (PBZ) se excreta en la orina sin metabolizar y también como metabolito formado por oxidación y conjugación con ácido glucurónico (58). Los principales metabolitos de la PBZ en orina son oxifenilbutazona (OPBZ) y la hidroxifenilbutazona (OHPBZ) (59). En este trabajo describiremos la determinación de la molécula principal la fenilbutazona y de la de su metabolito activo la oxifenilbutazona en orina animal. La estructura molecular de la PBZ y OPBZ se muestra en la figura 1.5.

Figura 1.5.- Estructura molecular de la fenilbutazona (PBZ) y oxifenilbutazona (OPBZ).



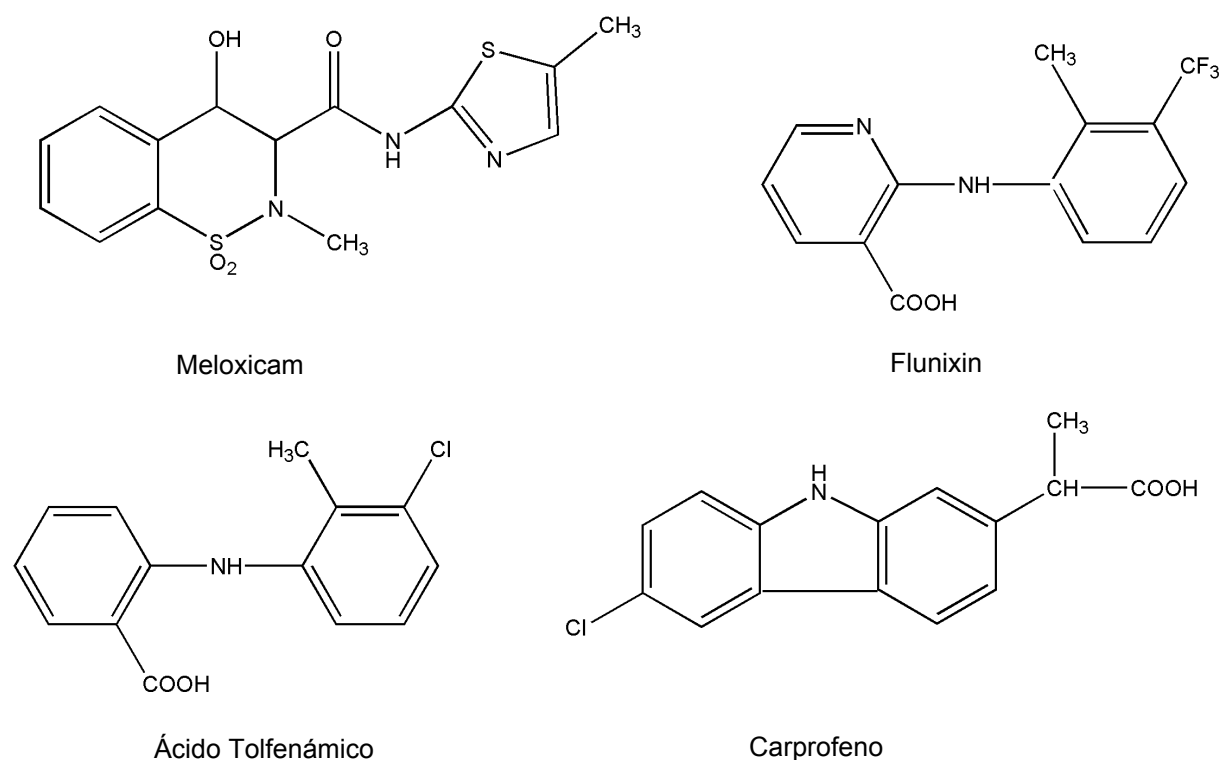


## 6.2. Meloxicam, flunixin meglumine, carprofeno y ácido tolfenámico

El meloxicam, flunixin meglumine, carprofeno y ácido tolfenámico son AINEs incluidos como sustancias con LMR en el anexo I del Reglamento nº 2377/90. El rango de concentraciones de los LMRs de estas sustancias está comprendido entre 10 y 1.000 µg/Kg dependiendo del compuesto y matriz, como se ha podido observar en la tabla 1.4.

En la figura 1.6 se muestra la estructura molecular de los AINEs con LMR en los que se basa este estudio para la realización de un método analítico para su determinación por HPLC-MS<sup>n</sup>.

Figura 1.6.- Estructura molecular del meloxicam, flunixin, carprofeno y ácido tolfenámico.



### 6.3. Referencias bibliográficas para su análisis

A continuación se detalla la metodología analítica descrita para la determinación de estos fármacos.

En la bibliografía todos los métodos de análisis para los AINEs esta limitada a la detección de los analitos en orina y plasma. Muchos de los métodos se optimizaron para detectar drogas particulares y metabolitos en plasma y orina usando HPLC con detector de diodos (HPLC-DAD) (60-62, 65), HPLC con detector de masas (HPLC-MS) (63). Pocos métodos de screening y/o procesos de confirmación multiresiduos han sido publicados usando CG o HPLC (64,66-71), con la excepción de HPLC para la determinación de indometacina en tejido de pollo (72). Se describen dos métodos por HPLC uno para la determinación de fenilbutazona en leche bovina (62), orina (73,74), agua (75) y otro para flunixin en leche bovina (61).

La determinación de residuos de indometacina en hígado, músculo y tejidos grasos de pollo se realiza según el siguiente procedimiento: se homogenizan 5 g de los diferentes tejidos con 15 mL de solución tampón fosfato a pH 3,5 (72). Una alícuota de 4 mL del homogeneizado se extrae con 20 mL de diclorometano y se centrifuga. La fase acuosa se descarta, mientras que la fase orgánica se evapora a sequedad y se reconstituye con 200  $\mu$ L de metanol para analizarlo por cromatografía líquida. La separación se realiza con columna en fase reversa usando una fase móvil isocrática 0,5% ácido acético/acetonitrilo y el detector utilizado fue el de UV a 254 nm. El límite de detección (LD) fue de 20 ppb para los tejidos estudiados.

Un método para la determinación de fenilbutazona en leche consiste en realizar la purificación mediante extracción líquido-líquido (62). Se extrae con tetrahidrofurano/hexano para inhibir la formación de gel en el proceso si se extrajera con hexano únicamente. El método se basa en el hecho de que la fenilbutazona es soluble en soluciones acuosas básicas y la partición cualitativa en la fase acuosa, durante la extracción, de la fase orgánica inmisible. Las propiedades y su valor de pKa, depende del disolvente, está entre 4,5-5,8.

De acuerdo al proceso modificado (63) la leche se mezcla en un contenedor; inmediatamente después se transfiere una alícuota de 1 mL a un tubo de extracción. Esto es necesario porque el 50% de la fenilbutazona está asociada a la nata. La muestra se extrae con una mezcla de dietiléter, eter de petróleo, etanol y 10  $\mu$ L de solución amónica al 25%. La fase orgánica, que contiene los lípidos de la leche, se descarta. Se añaden a la fase acuosa hexano-tetrahidrofurano (4:1), se acidifica con ácido clorhídrico y las fases se mezclan. Bajo las condiciones ácidas, la parte que contiene la fenilbutazona está cuantitativamente en la fase orgánica, la cual se recolecta, evapora y disuelve en la fase móvil para el análisis por cromatografía líquida. La separación se realiza en columna en fase reversa usando una fase móvil isocrática de tampón fosfato 0,02 M/metanol y la determinación por UV 264 nm. El límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) es de 3,0 y 5,4 ppb, respectivamente.

En la literatura se describe un método para determinar flunixin en leche por cromatografía líquida en el cual se confirma el resultado por CG-EM (61). Siguiendo esta técnica, 5 mL de muestra de leche se acidifican a pH 3,0-3,5 con ácido clorhídrico 1 M. Seguidamente se homogeneiza completamente con gel de sílice, se seca y mezcla con la fase móvil. La mezcla se coloca en una columna cromatográfica, la cual se desgrasa con agua-saturada de diclorometano/hexano (30:70) y el flunixin se eluye con acetato de etilo. Al extracto de acetato de etilo se le añade agua a pH 3,5, el agua se descarta, y la fase de acetato de etilo se extrae con 0,1 M de hidróxido sódico. La fase acuosa se seca y se realiza la EFS primero con un cartucho de  $C_{18}$  y se eluye con acetato de etilo. La fase de acetato de etilo se evapora, se disuelve en metanol/5 mM tetrabutilamonio hidrógeno sulfato más 2 mM hidróxido sódico (50:50), sonificado y filtrado. El analito se determina por cromatografía líquida usando una columna de  $C_{18}$  y fase móvil de 58% de metanol y 42% 5 mM tetrabutiamonio hidrógeno sulfato más 2 mM hidróxido sódico y detector de diodos de ultravioleta a 285 nm. La presencia de flunixin en muestras sospechosas se confirmó por CG-EM.

Recientemente se han publicado diferentes metodologías para la determinación de AINEs en tejido animal. La mayoría de las publicaciones realizan el

análisis sobre músculo de bovino como matriz y detección por HPLC (76) o por HPLC-MS (77,78).

Asimismo, se está avanzando en la investigación en la detección por espectrometría de masas (79,80), pero aún son pocos los laboratorios europeos que utilizan estas técnicas para el análisis de AINEs.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **1. HIPÓTESIS.**

La hipótesis del trabajo que se presenta es que es posible utilizar la cromatografía líquida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS<sup>n</sup>) para determinar residuos de medicamentos de uso veterinario en diversas matrices biológicas y utilizarlos de manera rutinaria en los laboratorios de control oficial de productos de origen animal.

## **2. OBJETIVOS.**

El objetivo principal de este trabajo de investigación es conseguir poner a punto métodos de análisis para determinar agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, cloranfenicol y AINEs, con y sin límite máximo de residuo (LMR), en diferentes productos de origen animal (tejido, orina, leche, huevos y miel). Estos métodos servirán para realizar el control oficial de residuos de medicamentos veterinarios del Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR) en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV); por tanto, deberán cumplir las especificaciones técnicas requeridas por la legislación para cada grupo de sustancias.

Para ello como objetivos específicos se pretende:

1. Validar los métodos analíticos puestos a punto según el procedimiento para la validación de ensayos químicos para residuos zoonos de LSPV auditado y acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) acorde a las recomendaciones de la Decisión 657/2002/CEE sobre la regulación de los análisis de residuos de medicamentos veterinarios, descrito en el apartado 1 del capítulo de Material y Métodos.

2. Implementar los métodos analíticos en la rutina del LSPV. Los métodos serán cuantitativos y de confirmación por HPLC-MS<sup>n</sup> que faciliten la identificación inequívoca de los analitos.

3. Asimismo, si es posible, se realizará un ensayo de practicabilidad de los métodos obtenidos, bien con un experimento animal (administrando al animal los

principios activos a investigar) o bien mediante la participación en ejercicios de intercomparación de organizadores de reconocido prestigio.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. PROCEDIMIENTO PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS**

El presente procedimiento describe el proceso utilizado para llevar a cabo la validación de los métodos analíticos de residuos de medicamentos veterinarios puestos a punto en este estudio.

El procedimiento sigue las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea para el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

El procedimiento se aplica en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia cuando concurre alguna de las circunstancias siguientes:

- Después del desarrollo o adaptación de un método analítico y antes de su aplicación a muestras analíticas reales.
- Cuando, en la revisión de procedimientos validados, se produzcan variaciones significativas como: ampliación de las matrices a las que se aplica, ampliación del rango de medida, cambios en las cantidades de muestra empleadas en el análisis, cambios en el proceso de extracción y/o purificación, cambios en la formulación de reactivos empleados o cambios en los equipos de medida empleados.

### **1.1. Introducción**

La validación de ensayos físico-químicos en el LSPV se lleva a cabo mediante la sistemática siguiente:

- a) Validación inicial que se realiza empleando:
  - Material de Referencia Certificado (MRC) o muestras con valores conocidos.
  - Adiciones de cantidades conocidas de analito a una matriz.
  - Mediante la valoración de los ejercicios interlaboratorio y/o controles internos de calidad.
- b) Revalidación que se realiza cuando, en la revisión del procedimiento de ensayo, se producen cambios significativos empleando las

siguientes técnicas:

- MRC o muestras con valores conocidos.
- Adiciones de cantidades conocidas de analito a una matriz.
- Mediante la valoración de los ejercicios interlaboratorio y/o controles internos de calidad.
- Comparación con el procedimiento en revisión anterior.

## 1.2. Definiciones

Coefficiente de Variación (C.V.) (en %): es la magnitud que caracteriza la dispersión de una serie de  $n$  mediciones de un mismo analítico, expresada como medida relativa a la media aritmética de los  $n$  resultados considerados. Su valor se calcula mediante la ecuación 3.1.

Ecuación 3.1.

$$C.V.(%) = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde  $S$  es la desviación típica de la serie de mediciones y  $\bar{X}$  es la media aritmética de los  $n$  resultados considerados.

También se expresa como %R.S.D. de la terminología sajona.

Exactitud de medida: grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término "exactitud" cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común o de un componente del sesgo.

Función respuesta / linealidad: es la relación entre la concentración de analito y la respuesta del método. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por qué ser lineal para que el método sea eficaz. Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado.

Incertidumbre de medida: estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida. La incertidumbre de medida incluye, en general, varias componentes. Algunas pueden estimarse a partir de la distribución estadística de los resultados de series de medición, y pueden caracterizarse por la desviación típica muestral. Las estimaciones de las otras componentes solamente pueden basarse en la experiencia o en otras informaciones.

Interferencia: modificación de la función de respuesta del método producida por la presencia de otras sustancias distintas al analito problema.

Intervalo de trabajo: el intervalo de trabajo de un método es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una exactitud y precisión adecuadas al objetivo del método.

Límite de cuantificación del método (LC): concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión. Se establece utilizando una muestra o material de referencia apropiado. Normalmente corresponde al punto inferior de la curva de calibración (excluido el blanco). No debe determinarse por extrapolación.

Límite máximo de residuo (LMR): nivel máximo u otra tolerancia máxima de sustancias establecidos en la legislación.

Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL): contenido mínimo de un analito que debe ser detectado y confirmado. Sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido.

Material de Referencia (MR): material o sustancia en el que una o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y se encuentran suficientemente definidos para permitir emplearlo en la

calibración de un instrumento, en la evaluación de un método de medida o en la atribución de valores a un material.

Material de Referencia Certificado (MRC): material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad, y para la cual, cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación del nivel de confianza.

Método normalizado: es todo aquel método recogido en una norma, reglamento o publicación de un organismo sectorial.

Muestra: es una cantidad representativa (propiedades de la muestra idénticas a la de la población) y estable (propiedades de la muestra inalterables desde su obtención hasta la realización del ensayo), subconjunto de una población, que se obtiene para determinar en ella los valores de ciertas propiedades, que posteriormente se utilizan para realizar inferencias respecto a las propiedades de la población de la que se obtiene la muestra.

Patrón interno (IS o ISTD): sustancia no contenida en la muestra, de propiedades fisicoquímicas lo más próximas posible a las del analito que ha de identificarse, que se añade a cada muestra y patrón de calibración.

Precisión: grado de concordancia entre resultados de mediciones obtenidas independientemente bajo condiciones establecidas.

Reproducibilidad intralaboratorio: precisión obtenida en un mismo laboratorio y en condiciones estipuladas (relativas al método, materiales de ensayo, operadores y entorno) separados por largos intervalos de tiempo justificados.

Selectividad/especificidad: grado por el cual un método puede determinar un

analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.

Sensibilidad: es la diferencia en la concentración de analito que corresponde a la diferencia más pequeña en la respuesta del método que puede detectarse. Se calcula a partir de la pendiente de la curva de calibración o, experimentalmente, utilizando muestras que contengan distintas concentraciones del analito.

Sesgo: diferencia entre la esperanza matemática de los resultados de una medición y el valor de referencia aceptado. El sesgo es un error sistemático total en contraposición al error aleatorio. Puede haber uno o varios componentes de errores sistemáticos que contribuyen al sesgo. Una diferencia sistemática importante con relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo.

Validación de un método de ensayo: la validación de un método de ensayo establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.

Veracidad: grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad se expresa normalmente como sesgo.

Error alfa ( $\alpha$ ): probabilidad de que la muestra analizada sea realmente conforme, aunque se haya obtenido una medición no conforme («decisión de falso no conforme»). Para las sustancias del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE el error  $\alpha$  será igual o inferior al 1%. Para todas las demás sustancias, el error  $\alpha$  es igual o inferior a 5%.

Error beta ( $\beta$ ): probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme («decisión de falso conforme»).

Límite de decisión ( $CC\alpha$ ): límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error  $\alpha$  que una muestra no es conforme. El límite de decisión debe establecerse según requisitos de identificación o de identificación más cuantificación.

Capacidad de detección ( $CC\beta$ ): contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error  $\beta$ . En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de  $1-\beta$ . En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de  $1-\beta$ .

### **1.3. Determinación y cálculo de los parámetros de validación**

#### **1.3.1. Métodos cualitativos para sustancias que no tienen LMR establecido**

Son métodos analíticos que identifican una o varias sustancias basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas.

##### **A) Selectividad/especificidad**

Para demostrar que el procedimiento de ensayo está libre de interferencias para el rango de concentraciones y las matrices a las que se aplica. Se analiza un número apropiado de muestras en blanco representativas, al menos 20, y se verifica la existencia o no de interferencias en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito.

Se considera que la muestra está libre de interferencias cuando la señal obtenida, si existe, sea menor al 15 % de la señal obtenida en el  $CC\alpha$  del analito.



Cuando la señal obtenida sea mayor al 15 % de la del  $CC_{\alpha}$  del analito, se evalúa si dicha presencia puede conducir a una falsa identificación o la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de la interferencia.

#### B) Límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ )

Se establece según requisitos de identificación, es decir, en el 100% de veces que se adicione una muestra a ese nivel de concentración, se debe poder identificar la presencia de dicho analito, con las tolerancias de las intensidades relativas de los iones característicos del analito (*ion ratio*).

Se estima analizando al menos 20 materiales blancos por matriz, determinándose cuál es la relación señal-ruido al tiempo de retención del analito. El límite de decisión es el valor de concentración correspondiente a una señal 3 veces superior a la señal-ruido obtenida de los 20 blancos.

También se puede estimar experimentalmente utilizando, en primer lugar, soluciones patrón en concentraciones decrecientes y de así tener una idea aproximada de su valor atendiendo a la respuesta obtenida, para posteriormente realizar adiciones en concentraciones crecientes, y en pequeños incrementos, sobre material blanco hasta llegar a una concentración tal que nos permita identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

En ambos casos se realiza la comprobación experimental mediante adición de analito en blancos de matriz a dicho nivel al menos 3 veces. Si la identificación del analito se realiza en las 3 repeticiones, se procede a realizar al menos 10 repeticiones en dicho nivel. Se acepta éste como valor de  $CC_{\alpha}$  si en la totalidad de las repeticiones se identifica el analito. Si esto no ocurriera, se repetiría de nuevo el ensayo con un valor ligeramente superior de adición. Así, paulatinamente, hasta estimar experimentalmente un valor de  $CC_{\alpha}$  que permita la identificación en la totalidad de las repeticiones realizadas a un nivel.

#### C) Capacidad de detección ( $CC_{\beta}$ )

Se establece también según requisitos de identificación. Se estima investigando el material blanco enriquecido en un valor próximo al límite de decisión. Se procede a un mínimo de 20 muestras adicionadas en ese valor de concentración. La capacidad de detección es igual al nivel de concentración en el que sólo queda un 5% o menos de resultados de falsos conforme.

### 1.3.2. Métodos cuantitativos para sustancias con y sin LMR establecido

Son métodos analíticos que determinan la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico de unidades apropiadas.

#### A) Selectividad/especificidad

Se debe demostrar que el procedimiento está libre de interferencias para el rango de concentraciones y las matrices a las que se aplica. Se analizan un número apropiado de muestras en blanco representativas, al menos 20, y se verifica la existencia o no de interferencias en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito.

Se considera que la muestra está libre de interferencias cuando la señal obtenida, si existe, sea menor al 15 % de la señal obtenida en el CC $\alpha$  del analito para sustancias con LMR y en el LC del analito para sustancias con LMR.

Cuando la señal obtenida sea mayor al 15 % de la del CC $\alpha$  del analito para sustancias con LMR y del LC para sustancias con LMR, se evalúa si dicha presencia puede conducir a una falsa identificación o la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de la interferencia.

#### B) Linealidad / función de respuesta

Se determina la función de respuesta para cada analito respecto a un determinado rango de concentración. Se selecciona preferentemente un rango de concentración en el cual se obtenga una respuesta lineal de los analitos. Para sustancias con LMR el rango debe contener, al menos, 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR. Se obtiene la fórmula matemática de la curva de calibrado y, al menos, los

parámetros  $R^2$  (coeficiente de determinación),  $m$  (pendiente) y  $b$  (ordenada en el origen).

Se puede obtener la función de respuesta instrumental y/o la función de respuesta en matriz atendiendo a que los distintos niveles de calibración se inyecten en el sistema cromatográfico disueltos en la fase móvil o en extracto de matriz, tras sufrir, o no, el proceso de extracción/purificación del método de análisis. En cualquier caso, este hecho queda definido en la validación del método.

Se realiza, al menos, 10 curvas de calibrado que contienen al menos 5 niveles (incluyendo el cero). De ellas se obtienen los parámetros  $R^2$ ,  $m$  y  $b$  anteriormente mencionados.

Se acepta como correctos valores de  $R^2 > 0,95$ . Para el establecimiento de los criterios de aceptación a utilizar como control de calidad de los parámetros de las curvas de calibrado, se calcula el valor medio de las pendientes obtenidas, y se establece como criterio de aceptación de las mismas  $m \pm 2 S_m$ , siendo  $m$  el valor medio de las pendientes y  $S_m$ , la desviación estándar de los valores de las pendientes.

Asimismo, se calcula el valor medio de las ordenadas en el origen, estableciendo como criterio de aceptación  $b \pm S_b$ , donde  $b$  el valor medio de las ordenadas en el origen y  $S_b$ , la desviación estándar de los valores de las mismas.

### C) Veracidad / exactitud / recuperación

Se determina el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado.

El estudio de veracidad / exactitud / recuperación se lleva a cabo utilizando material de referencia certificado (MRC) o matriz en blanco adicionada. Para sustancias sin LMR se procede a evaluarla, al menos, en los puntos bajo, medio y alto del intervalo de trabajo. Para sustancias con LMR al menos en 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR o en nivel bajo, LMR y 2 veces el LMR.

Se realiza, al menos, 5 repeticiones en cada nivel y en días diferentes a fin de obtener un valor de exactitud en cada nivel estudiado. Se calcula mediante la ecuación 3.2.

Ecuación 3.2.

$$Exactitud(\%) = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

Los criterios de aceptación se ven reflejados en la tabla 3.1 (según se indica en la Decisión 657/2002/CEE).

Tabla 3.1.- Criterios de aceptación de la veracidad según la Decisión 657/2002/CEE.

<b>Veracidad mínima de los métodos cuantitativos</b>	
Fracción de masa	Intervalo
≤ 1 µg/Kg	- 50 % a + 20 %
> 1 µg/Kg a 10 µg/Kg	- 30 % a + 10 %
≥ 10 µg/Kg	- 20 % a + 10 %

#### D) Reproducibilidad intralaboratorio

Se estima la precisión del método en condiciones de reproducibilidad (distintos operadores, lotes de reactivos, intervalo de tiempo más prolongado y, opcionalmente, distintos instrumentos de medida).

Para sustancias sin LMR, se lleva a cabo utilizando MRC o bien matriz en blanco adicionada al menos en tres niveles, bajo, medio y alto, del intervalo de trabajo, ó a 1, 1,5 y 2 veces el MRPL (límite mínimo de funcionamiento exigido).

Para sustancias con LMR, se lleva a cabo adicionando matriz blanco al menos en tres niveles: 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR o en nivel bajo, LMR y 2 veces el LMR.

El proceso se tiene que repetir al menos dos veces más con, al menos, operadores diferentes, distintos lotes de reactivos y en diferentes días. Se calcula los C.V% generales para los distintos niveles de concentración mediante la ecuación 3.1 mostrada anteriormente.

Los valores de los coeficientes de variación así obtenidos, no deben superar las tolerancias que se muestran en la tabla 3.2.

Tabla 3.2.- Criterios de aceptación de la precisión (C.V) según la Decisión 657/2002/CEE.

<b>Precisión</b>	
Fracción de masa	C.V de reproducibilidad (%)
1 µg/Kg	Lo más bajo posible.
10 µg/Kg	Lo más bajo posible.
100 µg/Kg	23
1000 µg/Kg (1 mg/Kg)	16

#### E) Límite de decisión ( $CC\alpha$ ) para sustancias sin LMR

Se establece según los requisitos de identificación y cuantificación. Se estima analizando al menos 20 materiales blancos por matriz. Se determina cuál es la relación señal-ruido al tiempo de retención del analito. El límite de decisión es el valor de concentración correspondiente a una señal 3 veces superior a la señal-ruido obtenida de los 20 blancos. También se puede estimar experimentalmente utilizando, en primer lugar, soluciones patrón en concentraciones decrecientes y aproximar su valor según la respuesta obtenida, para posteriormente realizar adiciones en concentraciones crecientes, y en pequeños incrementos, sobre material blanco, hasta llegar a una concentración que nos permite identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

En ambos casos se realiza la comprobación experimental mediante adición de analito en blancos de matriz a dicho nivel, al menos por triplicado. Si la identificación del analito se realiza en las 3 repeticiones, se procede a realizar al

menos 10 repeticiones en dicho nivel. Se acepta éste como valor de  $CC\alpha$  si en la totalidad de las repeticiones se identifica el analito. Si esto no ocurriese, se repite de nuevo el ensayo con un valor ligeramente superior de adición. Así, paulatinamente, hasta estimar experimentalmente un valor de  $CC\alpha$  que permita la identificación, en la totalidad de las repeticiones realizadas.

F) Capacidad de detección ( $CC\beta$ ) para sustancias sin LMR

Se establece también según requisitos de identificación y cuantificación.

Se estima investigando el material blanco enriquecido en un valor próximo al límite de decisión. Se procede a un mínimo de 20 análisis para un nivel de concentración. La capacidad de detección es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido.

G) Límite de decisión ( $CC\alpha$ ) para sustancias con LMR

Se establece según requisitos de identificación y cuantificación.

Se estima analizando al menos 20 materiales blancos por matriz adicionados del analito en el LMR. El límite de decisión es igual a la concentración en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar correspondiente.

H) Capacidad de detección ( $CC\beta$ ) para sustancias con LMR

Se establece también según requisitos de identificación y cuantificación.

Se estima investigando el material blanco enriquecido en un valor próximo al límite de decisión. Se procederá a un mínimo de 20 análisis para un nivel de concentración. La capacidad de detección será igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido.

## 2. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE:

### 2.1. AGONISTAS $\beta$ -ADRENÉRGICOS EN HÍGADO Y ORINA POR HPLC-MS<sup>n</sup>.

#### 2.1.1. Alcance

- Muestras a las que se puede aplicar: este método puede aplicarse a la determinación de clenbuterol, clenpenterol, brombuterol, hidroxiclembuterol, mapenterol y mabuterol en hígado y en orina de animales de abasto.

- Rango de medida: Este procedimiento se aplicará a la determinación de clenbuterol a concentraciones iguales o superiores a 0,05 ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en hígado o ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) en orina, que es el límite de decisión ( $\text{CC}\alpha$ ) de la sustancia para ambas matrices. También se aplicará para la determinación de clenpenterol, brombuterol, hidroxiclembuterol, mapenterol y mabuterol a concentraciones iguales o superiores a 0,1 ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en hígado o ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) en orina, que es el límite de decisión ( $\text{CC}\alpha$ ) de estas sustancias para ambas matrices.

#### 2.1.2. Equipos, materiales y reactivos

- Centrífuga (11.000 r.p.m.).
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno Turbo-Vap<sup>®</sup>.
- pH-metro.
- Agitatos.
- Picadora.
- Balanza analítica con resolución de 0,1 mg.
- Granatario con una resolución mínima de 0,1 g.
- Tubos de centrífuga de 80 mL con tapón enroscable.
- Tubos de polipropileno de 15 mL.
- Precolumna para columna Hypersil Gold 3  $\mu\text{m}$  (10 x 3 mm).
- Adaptador para precolumna Uniguard.
- Columna Cromatográfica Hypersil GOLD 3  $\mu\text{m}$  (50 mm x 3 mm d.i.).
- Pipetas automáticas 100-1000  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 500-5000  $\mu\text{L}$  y de 1-10 mL.
- Pipetas 0,5 mL, 1 mL, 10 mL y de 25 mL, graduadas clase A.
- Probeta 500 mL, graduada clase A.
- Matraces aforados de 10, 50, 250, 500 y 1000 mL, clase A.
- Dosificadores 0-10 mL y de 0-5 mL.
- Columnas de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> 1 g/6 cc (Waters<sup>®</sup>).

- Agua desmineralizada por sistema Milli-Q (Millipore).
- Agua para HPLC.
- n-Hexano HPLC grade.
- Terbutilmetiléter para análisis de trazas orgánicas.
- Hidróxido sódico, calidad para análisis, (p.a).
- Ácido acético, calidad para análisis, (p.a).
- Ácido acético suprapur.
- Ácido acético 10 mM: 570  $\mu$ L de ácido acético suprapur llevados a 1 L con agua para HPLC.
- Acetato sódico trihidrato p.a.
- Ácido clorhídrico 1 N.
- Metanol HPLC gradiente grade.
- Gas nitrógeno (99,99%).
- Clorhidrato de clenbuterol (Sigma).
- Clenbuterol-D9 (BgVV, Ref.323/02).
- Clorhidrato de clenpenterol (Witega).
- Clorhidrato de brombuterol (Witega).
- Hidroxiclenbuterol (Witega).
- Clorhidrato de mapenterol (Witega).
- Clorhidrato de mabuterol (Witega).
- 2- propanol, calidad para análisis (p.a).
- 2- propanol al 50% (V/V) en agua para HPLC.
- Solución hidróxido sódico 2 N: pesar 20 g de hidróxido sódico, disolver y enrasar a 250 mL con agua desmineralizada .
- Solución hidróxido sódico 1 N: pesar 20 g de hidróxido sódico, disolver y enrasar a 500 mL con agua desmineralizada .
- Solución de resuspensión del extracto final: solución de ácido acético 10 mM/acetronitrilo hypergrade (75/25).
- Solución tampón acético/acetato pH entre 3-4:
  - \* Solución ácido acético 0,2 M: se toman 11,45 mL de ácido acético p.a. en 1 L.
  - \* Solución acetato sódico 0,2 M (27,2 g acetato sódico trihidrato en 1 L): se toman 463 mL de la solución ácido acético 0,2 M y 37 mL de la solución acetato sódico 0,2 M y se diluyen en 1 L.
- Equipo de detección: cromatógrafo líquido de alta eficacia de Agilent Technologies<sup>®</sup> compuesto por los siguientes módulos: desgasificador G1322A, bomba cuaternaria G1311A, inyector automático termostatzado G1329A, horno para la columna cromatográfica G1316A y detector de espectrometría de masas de trampa iónica G2440A. La adquisición y gestión



de datos cromatográficos y espectrales se lleva a cabo mediante el sistema informático compuesto por el programa Chemstation Software<sup>®</sup> y MSD-Trap Software<sup>®</sup>.

### 2.1.3. Preparación

#### A) Principio

El extracto de tejido, previamente centrifugado se lleva a pH  $11 \pm 1$  y se purifica utilizando una columna C<sub>18</sub> de extracción en fase sólida. En el caso de orina ésta se lleva tras su centrifugación a pH  $11 \pm 1$ . Después de eluir los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos de la columna con metanol, se evapora a sequedad. Se redisuelve el residuo en NaOH 1N y se extraen los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos con terbutilmetiléter. El extracto orgánico evaporado, se resuspende en una solución semejante a la fase móvil y se inyecta en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup>.

#### B) Preparación de Patrones

- Solución madre clenbuterol ( $1.000 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ): pesar entre 51 y 62 mg de clorhidrato de clenbuterol, disolver y enrasar en matraz aforado de 50 mL con agua para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a 8°C.
- Solución patrón intermedia de clenbuterol  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 0,5 mL de la solución anterior en matraz aforado de 50 mL y enrasar con agua para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a 8°C.
- Solución patrón intermedia de clenbuterol  $1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 1 mL de la solución patrón  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  en matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua para HPLC. Preparación diaria.
- Solución patrón de trabajo de clenbuterol para la curva de calibrado  $0,1 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 100  $\mu\text{L}$  de la solución patrón  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  en matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua para HPLC. Preparación diaria.
- Solución patrón interno (clenbuterol-D9) intermedia de aproximadamente  $1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 250  $\mu\text{L}$  de la solución de 100 ng/ $\mu\text{L}$  de clenbuterol-D9 y llevar a un matraz aforado de 25 mL y enrasar con metanol. La preparación de esta disolución dependerá de la solución madre de partida suministrada, siempre con el objetivo de conseguir que esta solución contenga aproximadamente  $1 \mu\text{g/mL}$  de clenbuterol-D9. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a 8°C.

- Solución patrón interno para añadir a las muestras (clembuterol-D9) de aproximadamente 5 ng/mL: pipetear 50 µL de la solución patrón interno intermedia de aproximadamente 1 µg/mL en matraz aforado de 10 mL y enrasar con metanol. Preparación diaria.

- Solución patrón interno de trabajo para la curva de calibrado (clembuterol-D9) de aproximadamente 100 ng/mL: pipetear 100 µL de la solución patrón interno intermedia de aproximadamente 1 µg/mL en matraz aforado de 1mL y enrasar con metanol. Preparación diaria.

- Soluciones de trabajo para la curva de calibrado de clembuterol: en la tabla 3.3 se muestran los volúmenes y soluciones necesarias para realizar las soluciones de los distintos niveles de la curva de calibrado del clembuterol.

Tabla 3.3.- Soluciones de la curva de calibrado de clembuterol, volúmenes y soluciones necesarias para su preparación.

Nivel	Sol. patrón trabajo de clembuterol	Vol. (µL)	Vol. (µL) patrón interno de trabajo	Vol. final (mL)	Concentración en extracto (ppb)
1	-----	--	50	1	0
2	0,1 ± 0,01µg/mL	25	50	1	2,5
3	0,1 ± 0,01µg/mL	50	50	1	5
4	0,1 ± 0,01µg/mL	100	50	1	10
5	0,1 ± 0,01µg/mL	250	50	1	25
6	0,1 ± 0,01µg/mL	500	50	1	50

\* Los volúmenes de la solución patrón intermedia y de la solución de patrón interno de trabajo para la curva de calibrado se llevan a un matraz de 1mL y se enrasa con una mezcla de ácido acético 10 mM y acetonitrilo 75/25 (solución de resuspensión).

- Solución patrón de clembuterol para enriquecer las muestras control, solución de aproximadamente 10 ng/mL: pipetear 100 µL de la solución patrón 1 ± 0,1 µg/mL en matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua para HPLC. Preparación diaria. Se añade al blanco de muestra según el nivel de enriquecimiento que se quiere alcanzar, como se indica en la tabla 3.4.

Tabla 3.4.- Volúmenes de adición de la solución para enriquecer las muestras control a diferentes niveles de concentración.

<b>Concentración aprox. en extracto (ppb)</b>	<b>Volumen solución de 10 ng/mL (µL)</b>
2,5	50
10	200
50	1000

- Solución madre clempenterol ( $1.000 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ): pesar entre 51 y 62 mg de clorhidrato de clempenterol, disolver y enrasar en matraz aforado de 50 mL con metanol para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .
- Solución madre brombuterol ( $1.000 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ): pesar entre 51 y 62 mg de clorhidrato de brombuterol, disolver y enrasar en matraz aforado de 50 mL con metanol para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .
- Solución madre hidroxiclembuterol ( $1.000 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ): pesar entre 45 y 55 mg de hidroxiclembuterol, disolver y enrasar en matraz aforado de 50 mL con metanol para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .
- Solución madre mapenterol ( $1.000 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ): pesar entre 51 y 62 mg de clorhidrato de mapenterol, disolver y enrasar en matraz aforado de 50 mL con metanol para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .
- Solución madre mabuterol ( $1.000 \pm 100 \mu\text{g/mL}$ ): pesar entre 51 y 62 mg de clorhidrato de mabuterol, disolver y enrasar en matraz aforado de 50 mL con metanol para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .
- Solución patrón intermedia mezcla de clempenterol, brombuterol, hidroxiclembuterol, mapenterol y mabuterol  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  : pipetear 0,5 mL de las soluciones madre de estos fármacos en matraz aforado de 50 mL y enrasar con metanol para HPLC. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .
- Solución patrón de trabajo de la mezcla de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos para la curva de calibrado  $0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 200  $\mu\text{L}$  de la solución patrón intermedia mezcla  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  en matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua

para HPLC. Preparación diaria.

- Soluciones de trabajo para la curva de calibrado de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos: en la tabla 3.5 se muestran los volúmenes y soluciones necesarias para realizar las soluciones de los distintos niveles de la curva de calibrado de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Tabla 3.5.- Soluciones de la curva de calibrado de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, volúmenes y soluciones iniciales para su preparación.

Nivel	Sol. patrón trabajo mezcla	Vol. ( $\mu$ L)	Vol. ( $\mu$ L) patrón interno de trabajo	Vol. final (mL)	Concentración en extracto (ppb)
1	-----	--	50	1	0
2	$0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$	25	50	1	5
3	$0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$	50	50	1	10
4	$0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$	125	50	1	25
5	$0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$	250	50	1	50
6	$0,2 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$	500	50	1	100

\* Los volúmenes de la solución patrón intermedia mezcla y de la solución de patrón interno de trabajo para la curva de calibrado se llevan a un matraz de 1mL y se enrasa con una mezcla de ácido acético 10 mM y acetonitrilo 75/25 (solución de resuspensión).

- Solución patrón intermedia mezcla de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos  $1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 1 mL de la solución patrón mezcla intermedia  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$  en matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua para HPLC. Preparación diaria.

- Solución patrón mezcla de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos para enriquecer las muestras control, solución de aproximadamente  $40 \text{ ng/mL}$ : pipetear  $400 \mu\text{L}$  de la solución patrón  $1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$  en matraz aforado de 10 mL y enrasar con agua para HPLC. Preparación diaria. Se añade al blanco de muestra según el nivel de enriquecimiento que se quiere alcanzar, como se indica en la tabla 3.6.

Tabla 3.6.- Volúmenes de adición de la solución para enriquecer las muestras control a diferentes niveles de concentración.

<b>Concentración aprox. en extracto (ppb)</b>	<b>Volumen solución de 40 ng/mL (µL)</b>
5	25
25	125
100	500

### C) Preparación y conservación de la muestra

- Se debe conservar en estado congelado hasta que se realice el análisis.
- En hígado se homogeniza perfectamente la muestra después de haber eliminado la parte visible de grasa.
- En orina se agita el envase antes de tomar la alícuota. Se tomará un volumen superior a 10 mL de la misma y se centrifuga a 11.000 rpm durante 10 min.

### D) Preparación del cromatógrafo

- Limpieza de la fuente de ionización con la mezcla 2-propanol/agua 50/50 (v/v).
- Se deja estabilizar el cromatógrafo durante al menos una hora antes de la primera inyección, en las condiciones indicadas en el apartado C del punto 2.1.4.

## **2.1.4. Realización**

### A) Preparación de la serie de trabajo

1. Paralelamente a la muestra se realizan un blanco de reactivos, blanco de muestra y muestra enriquecida, se les añade a todos ellos 200 µL de la solución de patrón interno para añadir a las muestras de 5ng/mL de clenbuterol, y se preparan de la siguiente forma:

- Blanco de reactivos: sustituir los 10 g de muestra por 7 mL de tampón

acético/acetato pH 3-4.

- Muestra y blanco de muestra: pesar aproximadamente 10 g de hígado (se anota el peso exacto). En el caso de la orina pipetear 10 mL de orina.
- Muestras enriquecidas: añadir a 10 g de muestra de hígado ó 10 mL de orina, el volumen necesario de la solución patrón 10 ng/mL de clenbuterol para enriquecer la muestra y el volumen necesario de la solución patrón de 40 ng/mL de la mezcla de  $\beta$ -adrenérgicos para enriquecer la muestra.

El enriquecimiento a estos tres niveles de la curva se realiza de forma alternativa a fin de obtener datos a lo largo de distintas secuencias, que sirvan para realizar un control periódico de la precisión del método. El control de calidad en el nivel bajo de la curva se realiza en cada secuencia de trabajo y el control en los niveles medio y alto se realiza alternativamente cada dos secuencias de trabajo.

\*En las muestras de orina se ajusta el pH a  $11 \pm 1$  con NaOH 2 N y sigue el análisis en el apartado B.

\*En las muestras de hígado:

2. Añadir 30 mL de la solución tampón acético/acetato pH=3-4. Agitar 1 minuto, con una varilla.
3. Centrifugar a aproximadamente 11.000 rpm durante 10 minutos.
4. Recoger sobrenadante en vaso de precipitados, ajustar pH a  $11 \pm 1$  con hidróxido sódico 2 N.

#### B) Purificación (ambas matrices)

1. Preparar la columna de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> con 5 mL de metanol y 5 mL de agua desmineralizada.
2. Pasar por la columna C<sub>18</sub>, previamente alcalinizado, el extracto.
3. Lavar la columna sucesivamente con 5 mL de agua y 5 mL de metanol/agua, 50 % (v/v).

4. Secar columna durante 15 minutos, con corriente de nitrógeno.
5. Lavar la columna con 5 mL de n-hexano.
6. Secar la columna durante 5 minutos con aire en el sistema de automatización para extracción en fase sólida.
7. Eluir la columna con 3 mL de metanol.
8. Evaporar el eluato a sequedad con corriente de nitrógeno a 45 °C aproximadamente.
9. Disolver el residuo con 2 mL de NaOH 1 N.
10. Añadir 2 mL de terbutilmetil éter. Agitar durante aproximadamente 1 minuto. Si formara emulsión eliminarla añadiendo una punta de espátula de NaCl.
11. Mediante una pipeta pasteur transferir la capa de terbutilmetil éter a un tubo.
12. Repetir los pasos 10 y 11 dos veces.
13. Evaporar las fases reunidas de terbutilmetil éter a sequedad con corriente de nitrógeno a 45 °C aproximadamente.
14. Disolver el residuo con 200 µL de una mezcla de ácido acético 10 mM y acetonitrilo 75/25 (solución de resuspensión).

### C) Detección

1. Se inyectan en el sistema cromatográfico 20 µL de los extractos purificados para la determinación de clenbuterol y otros 20 µL para la determinación del resto de β-adrenérgicos.
2. Condiciones cromatográficas:
  - Flujo: 0,250 mL/min.
  - Columna Cromatográfica Hypersil Gold C<sub>18</sub> 3 µm (50 mm x 3 mm d.i.)
  - Gradiente cromatográfico para el análisis del clenbuterol se muestra en la tabla 3.7.
  - Gradiente cromatográfico para el análisis del resto de β-adrenérgicos se muestra en la tabla 3.8.

Tabla 3.7.- Gradiente cromatográfico para el análisis del clenbuterol.

<b>Tiempo</b>	<b>Ácido acético 10 mM (%)</b>	<b>Acetonitrilo (%)</b>
0,0	100	0
5,0	10	90
8,0	10	90
8,01	100	0
18,00	100	0

Tabla 3.8.-Gradiente cromatográfico para el análisis de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

<b>Tiempo</b>	<b>Ácido acético 10 mM (%)</b>	<b>Acetonitrilo (%)</b>
0,0	100	0
10,0	10	90
12,10	100	0
22,00	100	0

3. Condiciones del espectrómetro de masas: el valor de los parámetros que se detallan a continuación, se optimizan en la página "Tune" del software de equipo HPLC-MS<sup>n</sup>, sirven para obtener una correcta evaporación y la consiguiente ionización de la fase móvil en la fuente.

- ESI +
- Modo MRM en un solo segmento (para el análisis de todos los  $\beta$ -adrenérgicos y clenbuterol-D9):
  - Nebulizador: 50 psi.
  - Gas de secado: 10 L/min.
  - Temperatura de secado: 350°C.
  - Skim 1: 19,9 V.
  - Skim 2: 6 V.
  - Voltaje a la salida del capilar: 68,1 V.



4. Método MS: se muestra en la tabla 3.9.

Tabla 3.9.- Iones precursores y productos de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos y los voltajes de la amplitud de fragmentación en el espectrómetro de masas.

Analitos	Ion precursor	Amplitud de fragmentación (A.F) (V)	MS <sup>2</sup> productos m/z	A.F (V)	MS <sup>3</sup> productos m/z
Clembuterol	277	1,00	259	0,55	203 <sup>a</sup> ,259
Clempenterol	291	0,70	273 <sup>a</sup> ,203		
Brombuterol	367	0,50	349	0,52	293 <sup>a</sup> ,349
Hidroxiclembuterol	293	0,60	275	0,55	203 <sup>a</sup> ,275
Mapenterol	325	0,50	307	0,60	237 <sup>a</sup> ,307
Mabuterol	311	0,68	293 <sup>a</sup> ,237		
Clembuterol-D9	286	1,00	268	0,60	204 <sup>a</sup> ,268

<sup>a</sup> Son los iones usados en la cuantificación.

La secuencia de trabajo en el cromatógrafo para el análisis de clembuterol constará de: soluciones de la curva de calibrado, blanco de reactivos, blanco de muestra, muestras enriquecidas y el resto de muestras que podrán ser desde una hasta aproximadamente veinte, intercalando una inyección de solución de resuspensión cada 5 muestras que garantice la inexistencia de efecto memoria del sistema. A continuación el cromatógrafo vuelve a inyectar la misma secuencia para realizar el análisis del resto de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

### 2.1.5. Tratamiento y expresión de los resultados

#### A) Tratamiento de los resultados

1. Construir una recta de regresión relacionando las respuestas relativas del analito y patrón interno (obtenidos a partir de los cromatogramas extraídos de los iones usados para la cuantificación para cada analito y para el clembuterol-D9) con las concentraciones relativas de los mismos a partir de los datos obtenidos al inyectar 20  $\mu$ L de cada una de las soluciones de trabajo de las curvas de calibrado. La recta de regresión se realiza siguiendo la ecuación 3.3.

Ecuación 3.3.

$$y = mx + b$$

donde:

$y$  = área de pico analito ( $\beta$ -adrenérgico)/área de pico del patrón interno.

$m$  = pendiente.

$x$  = concentración de analito/concentración de patrón interno.

$b$  = ordenada en el origen.

2. A partir de la respuesta relativa analito/patrón interno usando la ecuación de regresión, se calcula la concentración del área del pico del agonista  $\beta$ -adrenérgico y se calcula la concentración del agonista  $\beta$ -adrenérgico en las muestras problema y en la enriquecida mediante la ecuación 3.4.

Ecuación 3.4.

$$C_{(\mu\text{g} / \text{Kg})} = \frac{X \cdot C_{PI} \cdot V_{EF}}{P_M}$$

$C$  = Concentración del analito ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en muestra.

$X = x$  del apartado 1.

$C_{PI}$  = concentración del patrón interno ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).

$V_{EF}$  = Volumen del extracto final (mL).

$P_M$  = Peso de la muestra (g).

### B) Confirmación de la presencia de los analitos en una muestra problema

La confirmación se basa en una comparación del tiempo de retención del agonista  $\beta$ -adrenérgico de la solución patrón y el mismo obtenido en el pico de interés de la muestra problema y sus respectivos espectros de masas.

Una muestra se da como no conforme (positiva) cuando aparece un pico en el

cromatograma de la masa extraída correspondiente al ion usado en la cuantificación cuyo tiempo de retención no difiera más del 5% respecto al tiempo de retención obtenido para dicho ion en las sustancias patrón. La cuantificación de ese pico debe ser igual o superior al  $CC\alpha$  de la sustancia en esa matriz.

Además, la intensidad relativa obtenida entre el ion usado en la cuantificación y el ion cualificador debe ser igual a aquella obtenida para el patrón de concentración aproximada a la obtenida en la muestra problema, teniendo en cuenta las tolerancias de la tabla 3.10 recogidas en la Decisión 657/2002/CEE.

Tabla 3.10.- Tolerancias permitidas por la Decisión 657/2002/CEE para las intensidades relativas de los iones cualificadores.

<b>Intensidad relativa (% del ion más abundante)</b>	<b>Tolerancia permitida</b>
≥ 50 %	± 20 %
> 20-50 %	± 25 %
> 10-20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

### C) Control de calidad

#### ➤ Control interno:

Se realiza en cada secuencia de trabajo.

1. Comprobar con el blanco de reactivos que no hay ningún pico interferente en el tiempo de retención de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.
2. Linealidad y sensibilidad. Criterio de aceptación en curva de calibrado: se acepta como correcta una curva de calibrado:
  - con un valor de la pendiente comprendido en el intervalo [0,03 – 1,57] para el clenbuterol, [0,15 – 1,23] para el clempenterol, [0,19 – 0,79] para el brombuterol, [0,08 – 0,40] para el hidroxiclembuterol, [0,72 – 1,20] para el mapenterol y [0,90 – 1,95] para el mabuterol.

- con una  $R^2 \geq 0,95$ .
- con un valor de  $b$  (ordenada en el origen) comprendido en el intervalo de [-0,70 – 0,25] para el clembuterol, [-0,34 – 0,46] para el clempenterol, [-0,5 – 0,82] para el brombuterol, [-0,14 – 0,20] para el hidroxiclembuterol, [-0,47 – 0,85] para el mapenterol y [-0,38 – 1,46] para el mabuterol.

Estos intervalos están calculados en el capítulo de resultados y discusión.

3. La eficacia del método se comprueba a partir del valor de la exactitud obtenida para la muestra enriquecida en el límite inferior del intervalo de trabajo, que en este caso coincide con los  $CC\alpha$  de las sustancias. Criterio de aceptación: se acepta como correcta una exactitud comprendida en el intervalo [50 - 120].
4. Precisión. La eficacia del método en el punto bajo de la curva se comprueba en cada secuencia, y en los puntos medio y alto se realiza cada dos secuencias de trabajo alternándose ambas. Los resultados obtenidos se utilizan para realizar un control de la precisión del método cada diez secuencias de trabajo con un determinado nivel de la curva sometido a control. Criterio de aceptación: se aceptan como correctos valores de precisión (como Coeficiente de Variación), calculados como se describe en el procedimiento de validación de métodos analíticos investigados, descritos en la tabla 3.2 de precisión en el apartado de la reproducibilidad intralaboratorio.

➤ Acciones correctoras

La secuencia de trabajo no es válida si alguno de los criterios establecidos para el blanco de reactivos, la curva de calibrado y la exactitud no se cumplen, así pues, se repetiría de nuevo.

➤ Control externo

Participación en ejercicios interlaboratorio cuando existan.

#### D) Expresión de los resultados

La concentración de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en la muestra se expresa en

ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en hígado y  $\mu\text{g}/\text{L}$  en orina) con dos cifras decimales. El sistema de redondeo de la tercera cifra decimal obtenida en el cálculo es añadir una unidad a la segunda cifra decimal cuando el tercer decimal sea 5 o superior a 5.

## 2.2. CLORANFENICOL EN MIEL Y LECHE POR HPLC-MS<sup>n</sup>.

### 2.2.1. Alcance

- Muestras a las que se puede aplicar: este método puede aplicarse a la determinación de cloranfenicol en miel y leche líquida.
- Rango de medida: este procedimiento se aplicará a la determinación de cloranfenicol a concentraciones iguales o superiores a 0,3 ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en miel y 0,15 ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en leche. Que es el límite de decisión ( $CC\alpha$ ) de la sustancia para cada matriz.

### 2.2.2. Equipos, materiales y reactivos

- Centrífuga (4.000 r.p.m.)
- Centrífuga (11.000 r.p.m.)
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno Turbo-Vap<sup>®</sup>.
- Agitatuos.
- Multiagitador.
- Balanza analítica con una resolución de 0,1 mg.
- Granatario con una resolución mínima de 0,1 g.
- Tubos de polipropileno de 15 mL.
- Columna Cromatográfica HYPURITY C<sub>8</sub> (Thermo) 5  $\mu\text{m}$  (50 mm x 3 mm d.i.).
- Adaptador para precolumna Uniguard.
- Precolumna para columna Hypurity C<sub>8</sub> (10 x 3mm).
- Pipetas automáticas 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  y 500-5000  $\mu\text{L}$ .
- Pipetas 0,5, 1 y 2 mL, graduadas clase A.
- Probetas de 100 y 250 mL, graduadas clase A.
- Vasos de precipitados de 50 mL.
- Matraces aforados de 1, 10 y 50 mL, clase A.
- Dosificadores 1-10 mL, 2-10 mL y de 0-5 mL.
- Columnas para extracción en fase sólida C<sub>18</sub> de 500 mg.
- Agua ultrapura obtenida con el sistema Milli-Q (Millipore).

- Agua para HPLC.
- Acetato de etilo grado HPLC.
- Acetonitrilo supragradiente grado HPLC.
- Acetonitrilo hypergrade para HPLC.
- Acetonitrilo al 30% (v/v) en agua (medir 60 mL de acetonitrilo calidad HPLC en una probeta graduada clase A de 100 mL. Medir 140 mL de agua Milli Q en una probeta graduada clase A de 250 mL. Mezclar en una botella de 250 mL.)
- Acetonitrilo al 5% (v/v) en agua: se toman 10 mL de acetonitrilo calidad HPLC y se mide 190 mL de agua Milli Q en una probeta graduada clase A de 250 mL. Mezclar en la botella de 250 mL.
- Metanol gradiente grado HPLC.
- Cloranfenicol puro, riqueza mínima 99% (Fluka o Sigma).
- Cloranfenicol-D5 (Laboratorio BgVV, laboratorio comunitario de referencia, ref. n° 313)
- Fosfato disódico dohidratado, calidad para análisis (p.a).
- Hidróxido sódico, (p.a).
- Solución hidróxido sódico 1 N: pesar 20 gr de hidróxido sódico, disolver y enrasar a 500 mL (en matraz aforado 500 mL clase A) con agua desmineralizada.
- Cloruro sódico, calidad para análisis (p.a).
- Gas nitrógeno (99,99%).
- 2-propanol, calidad para análisis (p.a).
- 2-propanol al 50 % (V/V) en agua para HPLC.
- Tampón fosfato 0.3 M pH 10: pesar en torno a 59 g de fosfato disódico dihidratado, disolver con 800 mL de agua destilada y ajustar el pH a 10 con NaOH 1 N. Llevar a un volumen final de 1 L con agua ultrapura del sistema Milli-Q.
- Equipo de detección: cromatógrafo líquido de alta eficacia asociado a un espectrómetro de masas de trampa iónica de Agilent Technologies® descrito anteriormente en el punto 2.1.2.

### **2.2.3. Preparación**

#### **A) Principio**

La muestra tamponada a pH aproximadamente de 7,00, se purifica por una columna de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> previamente activada. Tras lavar y secar bien la columna se eluye con acetonitrilo al 30% en agua. Se extrae el cloranfenicol del eluato con acetato de etilo y se evapora a sequedad en corriente de nitrógeno.

Se resuspende el residuo en fase móvil y se inyecta en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa, utilizando un detector de espectrometría de masas de trampa iónica.

#### B) Preparación de los patrones

- Solución patrón concentrada, cloranfenicol  $1000 \pm 200 \mu\text{g/mL}$ : pesar  $50,0 \pm 10,0 \text{ mg}$  de cloranfenicol, disolver con metanol y llevar a  $50 \text{ mL}$  con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^\circ\text{C}$ .
- Solución patrón intermedia  $10 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ : pipetear  $0,5 \text{ mL}$  de la solución de  $1000 \pm 200 \mu\text{g/mL}$  en un matraz aforado de  $50 \text{ mL}$  y enrasar con metanol. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^\circ\text{C}$ .
- Solución patrón diluida  $0,10 \pm 0,02 \text{ ng}/\mu\text{L}$  : pipetar  $100 \mu\text{L}$  de la solución patrón intermedia de  $10 \pm 2 \mu\text{g/mL}$  en un matraz aforado de  $10 \text{ mL}$  clase A y enrasar con mezcla acetonitrilo/agua 25/75 (v/v). Preparación diaria.
- Solución patrón diluida  $0,010 \pm 0,002 \text{ ng}/\mu\text{L}$ : pipetar  $1 \text{ mL}$  de la solución patrón diluida de  $0,10 \pm 0,02 \text{ ng}/\mu\text{L}$  en un matraz aforado de  $10 \text{ mL}$  clase A y enrasar con una mezcla de 25/75 (v/v) de acetonitrilo/agua. Preparación diaria.
- Solución intermedia de patrón interno cloranfenicol-D5 de aproximadamente  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  : aproximadamente  $100 \mu\text{g}$  de cloranfenicol-D5 son llevados a  $10 \text{ mL}$  en un matraz aforado de clase A y enrasados con metanol. La preparación de esta disolución dependerá de la cantidad de patrón suministrada, siempre con el objetivo de conseguir que esta solución contenga aproximadamente  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  de cloranfenicol-D5. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^\circ\text{C}$ .
- Solución de trabajo de patrón interno cloranfenicol-D5 de aproximadamente  $0,03 \text{ ng}/\mu\text{L}$ : pipetear  $150 \mu\text{L}$  de la solución intermedia de patrón interno de aproximadamente  $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$  en un matraz aforado de  $50 \text{ mL}$  clase A y enrasar con metanol. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^\circ\text{C}$ .
- Soluciones de trabajo para la curva de calibrado: se muestran en la tabla 3.11.

Tabla 3.11.- Soluciones de la curva de calibrado de cloranfenicol, volúmenes y soluciones iniciales para su preparación.

Nivel	Sol. patrón diluida (ng/μL)	Vol. (μL)	Vol. (μL) patrón interno de trabajo	Vol. final (mL)*	Conc. en extracto. (ppb)
1	-----	----	200	1	0
2	0,010 ± 0,002	250	200	1	2,5
3	0,010 ± 0,002	500	200	1	5
4	0,10 ± 0,02	100	200	1	10
5	0,10 ± 0,02	250	200	1	25
6	0,10 ± 0,02	750	200	1	75

\* Los volúmenes de la solución patrón diluida y el volumen de la solución de trabajo de patrón interno se llevan a un matraz aforado de 1 mL y se enrasa con una mezcla de 25/75 (v/v) de acetonitrilo/agua.

- Soluciones para enriquecer las muestras del control de calidad: se añaden al blanco de muestra según el nivel de enriquecimiento que se quiere alcanzar, como se indica en la tabla 3.12.

Tabla 3.12.- Volúmenes de las soluciones estándar de cloranfenicol para enriquecer las muestras de control de calidad interno.

Concentración en extracto (ppb)	Sol. patrón diluida (ng/μL)	Volumen solución patrón diluida (μL).
2,5	0,010 ± 0,002	125
10	0,10 ± 0,02	50
75	0,10 ± 0,02	375

### C) Preparación y conservación de la muestra

- La muestra de miel se debe conservar en estado refrigerado hasta que se realice el análisis.



- La muestra de leche se debe conservar en estado congelado hasta que se realice el análisis.

#### D) Preparación del cromatógrafo

- Limpieza de la fuente de ionización con la mezcla 2-propanol/agua 50/50 (v/v).
- Se deja estabilizar el cromatógrafo durante al menos una hora antes de la primera inyección, en las condiciones indicadas en el apartado C del punto 2.2.4.

### **2.2.4. Realización**

#### A) Preparación de la serie de trabajo y extracción

1. Paralelamente a la muestra se realizan un blanco de reactivos, blanco de muestra y muestra enriquecida, se les añade a todos ellos 100 µL de la solución de trabajo de patrón interno y se preparan de la siguiente forma:

- Blanco de reactivos: sustituir los 5 g de muestra por 5 mL de agua en el caso de la miel y en el caso de la leche se sustituyen por 10 mL de agua.
- Muestra y blanco de muestra: pesar  $5,0 \pm 0,2$  g de muestra previamente homogeneizada en el caso de miel y en el caso de leche pesar  $10 \pm 0,4$  g de muestra previamente homogeneizada.
- Muestras enriquecidas: añadir respectivamente a la muestra, el volumen necesario de la solución patrón de cloranfenicol para enriquecer las muestras. El enriquecimiento a estos tres niveles de la curva se realizará de forma alternativa a fin de obtener datos a lo largo de distintas secuencias, que sirvan para realizar un control periódico de la precisión del método. El control de calidad en el nivel bajo de la curva se realizará en cada secuencia de trabajo y el control en los niveles medio y alto se realizará alternativamente cada dos secuencias de trabajo.

2. A cada uno de los vasitos con muestras, blancos y muestras enriquecidas, añadir 2 mL de tampón fosfato pH 10 y 15 mL de agua milli Q solo en el caso de las mieles.

3. Comprobar que el pH de la muestra está entre pH 7-7,5.

4. En leches: centrifugar a aproximadamente 11.000 rpm durante 10 minutos.

### B) Purificación (ambas matrices)

1. Preparación de la columna C<sub>18</sub>. Pasar sucesivamente 5 mL de metanol y 5 mL de agua.
2. Pasar la muestra tamponada por la columna.
3. Lavar la columna con 5 mL de agua y con 5 mL de acetonitrilo/agua (5/95).
4. Eluir el cloranfenicol de la columna con 5 mL de acetonitrilo al 30 % en agua.
5. Añadir al eluato 2 mL de acetato de etilo y agitar aproximadamente 1 min. Centrifugar a aproximadamente 4.000 rpm durante 5 minutos.
6. Mediante una pipeta pasteur, transferir la capa superior de acetato de etilo a un tubo de 15 mL de polipropileno.
7. Repetir los pasos 5 y 6 dos veces más.
8. Colocar el tubo que contiene las fases de acetato de etilo en el concentrador en corriente de nitrógeno y evaporar a sequedad a 45°C aproximadamente.
9. Disolver el residuo en 500 µL de fase móvil.

### C) Detección

1. Se inyectan en el sistema cromatográfico 20 µL de los extractos purificados.
2. Condiciones cromatográficas:
  - Flujo: 0,3 mL/min.
  - Columna cromatográfica HYPURITY C<sub>8</sub> 5 µm (50 mm x 3 mm d.i.).
  - Fase móvil: acetonitrilo/agua 25/75.
3. Condiciones del espectrómetro de masas: el valor de los parámetros que se detallan a continuación, se optimizan en la página "Tune" del software de equipo HPLC-MS<sup>n</sup>, sirven para obtener una correcta evaporación y la consiguiente ionización de la fase móvil en la fuente.
  - ESI -
  - Modo MRM en un solo segmento para el análisis de cloranfenicol y cloranfenicol-D5:
    - Nebulizador: 40 psi.
    - Gas de secado: 8 L/min.
    - Temperatura de secado: 350°C.

- Skim 1: -23,0 V.
- Skim 2: - 6 V.
- Voltaje a la salida del capilar: -69,0 V.

4. Método MS: se muestra en la tabla 3.13.

Tabla 3.13.- Ion precursor, iones producto y el voltaje de la amplitud de fragmentación en el espectrómetro de masas para el cloranfenicol y el cloranfenicol-D5.

<b>Analito</b>	<b>Ion precursor &gt; ion producto MS<sup>2</sup></b>	<b>Amplitud de fragmentación (V)</b>
Cloranfenicol	322 >152	0,7
	322 >194	0,7
	322 > 257 <sup>a</sup>	0,7
Cloranfenicol-D5	327 > 262 <sup>a</sup>	0,7

<sup>a</sup>Son los iones producto usados para la cuantificación.

La secuencia de trabajo en el cromatógrafo consta de: soluciones de la curva de calibrado, blanco de reactivos, blanco de muestra, muestras enriquecidas y el resto de muestras que podrán ser desde una hasta aproximadamente veinte, intercalando una inyección de fase móvil cada 5 muestras que garantice la inexistencia de efecto memoria en el sistema.

## 2.2.5. Tratamiento y expresión de los resultados

### A) Tratamiento de los resultados

1. Construir una recta de regresión relacionando las respuestas relativas del analito y patrón interno (obtenidos a partir de los cromatogramas extraídos de los iones hijo: 257 para cloranfenicol y 262 para cloranfenicol-D5) con las concentraciones de los mismos a partir de los datos obtenidos al inyectar 20 µL de cada una de las soluciones de trabajo de la curva de calibrado. La ecuación de la recta es la 3.3 mostrada anteriormente.

2. A partir de la respuesta relativa analito/patrón interno usando la ecuación de regresión, se calcula la concentración de la área del pico del cloranfenicol y se calcula la concentración de cloranfenicol en las muestras problema y en la enriquecida mediante la ecuación 3.4.

#### B) Confirmación de la presencia de cloranfenicol en una muestra problema

La confirmación se basa en una comparación del tiempo de retención del cloranfenicol de la solución patrón y el mismo obtenido en el pico de interés de la muestra problema y sus respectivos espectros de masas.

Una muestra se da como no conforme (positiva) cuando aparece un pico en el cromatograma de la masa extraída correspondiente al ion hijo 257 m/z usado en la cuantificación cuyo tiempo de retención no difiera más del 5% respecto al tiempo de retención obtenido para dicho ion en la sustancia patrón. La cuantificación de ese pico deberá ser igual o superior al  $CC\alpha$  de la sustancia en esa matriz.

Además, la intensidad relativa obtenida entre el ion 257m/z y el ion 194m/z o la obtenida entre el ion 257m/z y el ion 152m/z debe ser igual a aquella obtenida para el patrón de concentración aproximada a la obtenida en la muestra problema, teniendo en cuenta las tolerancias recogidas en la Decisión 657/2002/CEE que se han mostrado anteriormente en la tabla 3.10.

#### C) Control de calidad

##### ➤ Control interno

Se realiza en cada secuencia de trabajo.

1. Comprobar con el blanco de reactivos que no hay ningún pico interferente en el tiempo de retención del cloranfenicol.
2. Linealidad y sensibilidad. Criterio de aceptación en curva de calibrado: se acepta como correcta una curva de calibrado:
  - con un valor de la pendiente comprendido en el intervalo [0,59 – 1,17].
  - con una  $R^2 \geq 0,95$ .

- con un valor de  $b$  (ordenada en el origen) comprendido en el intervalo de  $[-0,28 - 0,48]$ .

Estos intervalos están calculados en el capítulo de resultados y discusión.

3. La eficacia del método se comprueba a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra enriquecida en el límite inferior del intervalo de trabajo que coincide con el  $CC\alpha$  de la sustancia. Criterio de aceptación: se acepta como correcta una exactitud comprendida en el intervalo  $[50 - 120]$ .
4. Precisión. La eficacia del método en el punto bajo de la curva se comprueba en cada secuencia, y en los puntos medio y alto se realiza cada dos secuencias de trabajo alternándose ambas. Los resultados obtenidos se utilizan para realizar un control de la precisión del método cada diez secuencias de trabajo con un determinado nivel de la curva sometido a control. Criterio de aceptación: se aceptan como correctos valores de precisión (como Coeficiente de Variación), calculados como se describe en el procedimiento de validación de los métodos analíticos investigados, descritos en la tabla 3.2 de precisión en el apartado de reproducibilidad intralaboratorio.

➤ Acciones correctoras

La secuencia de trabajo no es válida si alguno de los criterios establecidos para el blanco de reactivos, la curva de calibrado y la exactitud no se cumplen, así pues, se repite de nuevo.

➤ Control externo

Participación en ejercicios interlaboratorio cuando existan.

#### D) Expresión de los resultados

La concentración de cloranfenicol en la muestra se expresa en ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) con dos cifras decimales. El sistema de redondeo de la tercera cifra decimal obtenida en el cálculo es añadir una unidad a la segunda cifra decimal cuando el tercer decimal sea 5 o superior a 5.

## **2.3. CLORANFENICOL EN TEJIDO ANIMAL, HUEVOS Y OVOPRODUCTOS POR HPLC-MS<sup>n</sup>.**

### **2.3.1. Alcance**

- Muestras a las que se puede aplicar: este método puede aplicarse a la determinación de cloranfenicol en tejido de animales de abasto, aves, conejos, caza, productos de la pesca y acuicultura, huevos y ovoproductos.

- Rango de medida: este procedimiento se aplicará a la determinación de cloranfenicol a concentraciones iguales o superiores a 0,15 ppb ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), que es el límite de decisión ( $\text{CC}\alpha$ ) de la sustancia para estas matrices.

### **2.3.2. Equipos, materiales y reactivos**

- Homogeneizador Ultraturrax.
- Centrífuga (4.000 r.p.m.)
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno Turbo-Vap<sup>®</sup>.
- Agitatos.
- Balanza analítica con una resolución de 0,1 mg.
- Granatario con una resolución mínima de 0,1 g.
- Rotavapor con controlador de vacío.
- Tubos de centrifuga de 80 mL con tapón enroscable.
- Tubos de polipropileno de 15 mL.
- Columna Cromatográfica HYPURITY C<sub>8</sub> (Thermo) 5  $\mu\text{m}$  (50 mm x 3 mm d.i.).
- Adaptador para precolumna Uniguard.
- Precolumna para columna Hypurity C<sub>8</sub> (10 x 3 mm).
- Matraz de fondo corazón color topacio de 250 mL.
- Pipetas automáticas 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ .
- Pipetas 0,5, 1 y 2 mL graduadas clase A.
- Probeta 250 y 1000 mL graduadas clase A.
- Matraces aforados de 1, 10 y 50 mL clase A.
- Dosificador 0-10 mL, 2-10 mL y de 0-5 mL.
- Columnas Sílice 500 mg Strata<sup>®</sup> (Phenomenex)
- Agua ultrapura obtenida con el sistema Milli-Q (Millipore).
- Agua para HPLC.
- Sulfato sódico anhidro, calidad para análisis (p.a).
- Acetato de etilo grado HPLC.
- Diclorometano para análisis de residuos.

- Acetonitrilo supragradiente grado HPLC.
- Acetonitrilo hypergrade para HPLC.
- Acetonitrilo al 20% (v/v) en agua (medir 200 mL de acetonitrilo calidad HPLC en una probeta graduada clase A de 250 mL. Medir 800 mL de agua Milli Q en una probeta graduada clase A de 1000 mL. Mezclar en la botella de 1 L provista de dosificador.)
- Metanol gradiente grado HPLC.
- Cloranfenicol puro, riqueza mínima 99% (Fluka o Sigma).
- Cloranfenicol-D5 (Laboratorio BgVV, laboratorio comunitario de referencia, ref. n° 313)
- Cloruro sódico, calidad para análisis (p.a).
- Gas nitrógeno "U" (99,99%).
- 2-propanol, calidad para análisis (p.a).
- 2-propanol al 50 % (V/V) en agua para HPLC.
- Equipo de detección: cromatógrafo líquido de alta eficacia asociado a un espectrómetro de masas de trampa iónica de Agilent Technologies® descrito anteriormente en el punto 2.1.2.

### **2.3.3. Preparación**

#### **A) Principio**

La muestra, previamente homogeneizada, se mezcla con sulfato sódico anhidro y acetato de etilo y se centrifuga. Tras evaporar la sequedad del sobrenadante, el residuo se disuelve en diclorometano y se purifica con una columna de sílice para extracción en fase sólida. La elución del cartucho se realiza con una mezcla acetonitrilo al 20% en agua. El cloranfenicol se extrae del eluato con acetato de etilo que se evapora a sequedad. Se resuspende el residuo en fase móvil y se inyecta en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa utilizando un detector de espectrometría de masas de trampa iónica.

#### **B) Preparación de los patrones**

La preparación de patrones de cloranfenicol se realiza de la misma forma que en el apartado anterior 2.2.3 del procedimiento para la determinación de cloranfenicol en miel y leche.

#### **C) Preparación y conservación de la muestra**

- La muestra se debe conservar en estado congelado hasta que se realice el

análisis.

- En tejido animal se homogeniza perfectamente la muestra después de haber eliminado la parte visible de grasa.
- En huevos se homogeniza la muestra batiéndolos con el ultraturrax y en ovoproductos agitando el envase previamente a la toma de la cantidad correspondiente para el análisis.

#### D) Preparación del cromatógrafo

- Limpieza de la fuente de ionización con la mezcla 2-propanol/agua 50/50 (v/v).
- Se deja estabilizar el cromatógrafo durante al menos una hora antes de la primera inyección, en las condiciones indicadas en el apartado C del punto 2.2.4.

### **2.3.4. Realización**

#### A) Preparación de la serie de trabajo y extracción

1. Paralelamente a la muestra se realizan un blanco de reactivos, de muestra y muestra enriquecida, se les añade a todos ellos 100 µL de la solución de trabajo de patrón interno y se preparan de la siguiente forma:
  - Blanco de reactivos: sustituir los 10 g de muestra por 7 mL de agua.
  - Muestra: pesar  $10,0 \pm 0,1$  g de muestra previamente homogeneizada.
  - Muestras enriquecidas: añadir respectivamente a  $10 \pm 0,1$  g de muestra, el volumen necesario de la solución patrón de cloranfenicol para enriquecer las muestras. El enriquecimiento a estos tres niveles de la curva se realizará de forma alternativa a fin de obtener datos a lo largo de distintas secuencias, que sirvan para realizar un control periódico de la precisión del método. El control de calidad en el nivel bajo de la curva se realizará en cada secuencia de trabajo y el control en los niveles medio y alto se realizará alternativamente cada dos secuencias de trabajo.
2. A cada uno de los de los tubos con muestra, blanco y muestras enriquecidas, añadir aproximadamente 10 g de sulfato sódico anhidro.



3. Añadir aproximadamente 40 mL de acetato de etilo.
4. Mezclar con el Ultraturrax durante aproximadamente 1 minuto.
5. Centrifugar a aproximadamente 4000 rpm durante 10 min.
6. Pasar el acetato de etilo a un matraz de fondo corazón color topacio.
7. Añadir al tubo de centrifuga 30 mL de acetato de etilo, remover el contenido.
8. Centrifugar a aproximadamente 4000 rpm durante 10 min.
9. Pasar el acetato de etilo a un matraz de fondo corazón color topacio.
10. Evaporar el acetato de etilo a aproximadamente 45°C y aproximadamente 210 mm Hg de vacío en rotavapor.

### B) Purificación

1. Preparación de la columna de sílice. Pasar sucesivamente 5 mL de acetonitrilo 20% en agua, 5 mL de acetonitrilo y 5 mL de diclorometano.
2. Secar la columna aproximadamente 15 minutos con nitrógeno.
3. Disolver el residuo de evaporación del acetato de etilo con 5 mL de diclorometano y pasarlo al reservorio de la columna de sílice previamente preparada en los puntos 1 y 2 de este apartado.
4. Repetir el paso 3 dos veces más.
5. Pasar el residuo rediseuelto en diclorometano a través de la columna de sílice.
6. Secar la columna de sílice con corriente de nitrógeno durante aproximadamente 15 minutos.
7. Eluir la columna de sílice con 5 mL de acetonitrilo al 20% en agua.
8. Añadir al eluato 2 mL de acetato de etilo y agitar aproximadamente 1 min. Si se formara emulsión eliminarla añadiendo una punta de espátula de cloruro sódico.
9. Mediante una pipeta pasteur, transferir la capa superior de acetato de etilo a un tubo de polipropileno de 15 mL.
10. Repetir los pasos 7 y 8 dos veces más.
11. Colocar el tubo que contiene las fases de acetato de etilo en el concentrador en corriente de nitrógeno y evaporar a sequedad a 45°C aproximadamente.
12. Disolver el residuo en 0,5 mL de fase móvil.

El apartado de detección y el de tratamiento y expresión de los resultados coinciden exactamente con la descripción ya realizada en el procedimiento para la

determinación de cloranfenicol en miel y leche por HPLC-MS<sup>n</sup>.

## **2.4. OXIFENILBUTAZONA Y FENILBUTAZONA EN ORINA ANIMAL POR HPLC-MS<sup>n</sup>.**

### **2.4.1. Alcance**

- Muestras a las que se puede aplicar: este método puede aplicarse a la determinación de oxifenilbutazona (OPBZ) y fenilbutazona (PBZ) en orina de animales de abasto.

- Rango de medida: este procedimiento se aplicará a la determinación de OPBZ Y PBZ a concentraciones iguales o superiores a 2,5 ppb ( $\mu\text{g/L}$ ). El límite de decisión ( $CC\alpha$ ) para ambas sustancias es de 2,5  $\mu\text{g/L}$  en muestra. El cálculo de este límite se detalla en el capítulo de resultados y discusión.

### **2.4.2. Equipos, materiales y reactivos**

- Centrifuga (4.000 r.p.m.).
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno Turbo-Vap<sup>®</sup>.
- Agitatorubos.
- Balanza analítica con una resolución de 0,1 mg.
- Tubos de polipropileno de 15 mL.
- Columna Cromatográfica Zorbax Eclipse<sup>®</sup> XDB-C<sub>18</sub> (Agilent Technologies) (250 mm x 3.0 mm, 5 $\mu\text{m}$ ).
- pH-metro.
- Pipeta automática 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 1000-5000  $\mu\text{L}$ .
- Pipeta pasteur de vidrio desechable.
- Pipeta 0,5 y 1 mL graduada clase A.
- Probeta 250 mL graduada clase A.
- Matraces aforados de 10, 25, 50 y de 500 mL clase A.
- Dosificadores de 1-10 mL y de 0,5-5 mL.
- Agua para HPLC.
- Solución valorada de ácido clorhídrico 1 N, calidad para análisis.
- Solución HCl 0,2 N. Llevar 50 mL de la solución de HCl 1 N a 200 mL con agua para HPLC.
- Ácido fórmico 98-100%.
- Ácido fórmico 10 mM. Llevar 190  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 98-100% a 500 mL con agua para HPLC.

- Acetonitrilo hypergrade para HPLC.
- Cloroformo 99,9% grado HPLC.
- Metanol calidad para HPLC.
- 2-propanol, calidad para análisis (p.a).
- 2-propanol al 50% (V/V) en agua Merck para HPLC.
- Cloruro sódico, calidad para análisis (p.a).
- Fenilbutazona puro, riqueza 99% (Sigma).
- Oxifenilbutazona 1-hidrato, (Laboratorio BgVV laboratorio Comunitario de Referencia, n<sup>a</sup>327/01).
- Fenilbutazona- D10 (Laboratorio BgVV laboratorio Comunitario de Referencia, n<sup>a</sup>376/02).
- Gas nitrógeno "U" (99,99%).
- Equipo de detección: cromatógrafo líquido de alta eficacia asociado a un espectrómetro de masas de trampa iónica de Agilent Technologies<sup>®</sup> descrito anteriormente en el punto 2.1.2.

### 2.4.3. Preparación

#### A) Principio

Se ajusta el pH de la muestra, previamente homogeneizada, a  $3,00 \pm 0,2$  con una solución de HCl. Se realiza una extracción orgánica líquido-líquido con cloroformo. Tras evaporar a sequedad las capas inferiores de cloroformo, el residuo se redisuelve en una mezcla 50/50 (v/v) de ácido fórmico 10 mM y acetonitrilo, y se inyecta en un equipo HPLC-MS<sup>n</sup>.

#### B) Preparación de los patrones

- Solución madre de PBZ,  $1000 \pm 200$  µg/mL: pesar  $50,0 \pm 10,0$  mg de PBZ, disolver con metanol y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- Solución madre de OPBZ,  $500 \pm 100$  µg/mL: pesar  $12,5 \pm 2,5$  mg de OPBZ, disolver con metanol y llevar a 25 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .
- Solución mezcla intermedia,  $10 \pm 2$  µg/mL: pipetear 0,5 mL de la solución madre de PBZ y pipetear 1 mL de la solución madre de OPBZ y llevar a un mismo matraz aforado de 50 mL y enrasar con metanol. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .

- Solución mezcla diluida  $1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 1 mL de la solución mezcla intermedia  $10 \pm 2 \mu\text{g/mL}$  en un matraz aforado de 10 mL clase A y enrasar con una mezcla de 50/50 (v/v) de acetonitrilo/ácido fórmico 10 mM (fase móvil). Preparación diaria.
- Solución mezcla diluida  $0,1 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 1 mL de la solución mezcla diluida  $1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$  en un matraz aforado de 10 mL clase A y enrasar con fase móvil. Preparación diaria.
- Solución de patrón interno (PBZ-D10) de trabajo aproximadamente  $1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 500  $\mu\text{L}$  de la solución de 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  de PBZ-D10 y llevar a un matraz aforado de 50 mL y enrasar con metanol. La preparación de esta disolución dependerá de la solución madre de partida suministrada, siempre con el objetivo de conseguir que esta solución contenga aproximadamente  $1 \mu\text{g/mL}$  de PBZ-D10. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^\circ\text{C}$ .

#### C) Preparación y conservación de la muestra

- La muestra se debe conservar en estado congelado hasta que se realice el análisis.
- Se homogeniza la muestra agitando el envase previamente a la toma del volumen correspondiente para el análisis.

#### D) Preparación del cromatógrafo

- Limpieza de la fuente de ionización con la mezcla 2-propanol/agua 50/50 (v/v).
- Se deja estabilizar el cromatógrafo durante al menos una hora antes de la primera inyección, en las condiciones indicadas en el apartado D del punto 2.4.4.

### **2.4.4. Realización**

#### A) Preparación de la serie de trabajo

1. Paralelamente a la muestra se realizan: un blanco de reactivos, un blanco de muestra y muestras enriquecidas, se les añade a todos ellos 50  $\mu\text{L}$  de la solución de patrón interno de trabajo y se preparan de la siguiente forma:
  - Blanco de reactivos: sustituir los 5 mL de muestra por 5 mL de agua.
  - Muestra: pipetear 5 mL de orina.

- Blanco de muestra: se tomará una alícuota de 5 mL de una muestra en la que previamente no se han detectado los analitos de interés.
- Muestras enriquecidas: a cada alícuota de 5 mL de muestra en la que previamente no se ha detectado los analitos de interés, se añade una cantidad conocida de OPBZ y PBZ a partir de las soluciones mezcla diluida.

En la tabla 3.14 se detalla el volumen de solución de patrón a añadir a las muestras en los distintos niveles de calibración.

Tabla 3.14.- Volúmenes de las soluciones de patrón mezcla diluida de OPBZ y PBZ a añadir a las muestras en los distintos niveles de calibración.

Nivel	Sol. mezcla diluida	Vol.( $\mu\text{L}$ )	Concentración en muestra (ppb)
1	-----	0	0
2	e) $0,1 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$	125	2,5
3	d) $1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$	50	10
4	d) $1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$	250	50
5	d) $1 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$	450	90

### B) Hidrólisis química

1. Ajustar el pH de la muestra a  $3,00 \pm 0,20$  con la solución HCl 1 N y/o HCl 0,2 N.

### C) Extracción

1. Añadir una punta de espátula de cloruro sódico.
2. Añadir 4 mL de cloroformo.
3. Agitar en agitatuvas aproximadamente durante 1 minuto.
4. Centrifugar a aproximadamente 4000 rpm durante 7 min.

5. Pasar el cloroformo (fase inferior) a un tubo de polipropileno.
6. Repetir dos veces más los pasos 2, 3, 4 y 5.
7. Evaporar a sequedad el cloroformo a aproximadamente 50°C con corriente de N<sub>2</sub> en el Turbo-Vap<sup>®</sup>.
8. Disolver el residuo en 500 µL de una solución mezcla 50/50 (v/v) de acetonitrilo/ácido fórmico 10 mM (Fase móvil).

#### D) Detección

1. Se inyectan en el sistema cromatográfico 40 µL de los extractos obtenidos.
2. Condiciones del HPLC:
  - Flujo: 1 mL/min.
  - Temperatura de columna: 40°C.
  - Columna: Zorbax Eclipse<sup>®</sup> XDB-C18 (Agilent technologies) 250 mm x 3,0 mm y 5 µm.
  - Fase móvil: acetonitrilo/ácido fórmico 10 mM 50/50.
3. Condiciones del espectrómetro de masas: el valor de los parámetros que se detallan a continuación, se optimizan en la página "Tune" del software de equipo HPLC-MS<sup>n</sup>, sirven para obtener una correcta evaporación y la consiguiente ionización de la fase móvil en la fuente.
  - ESI +
  - Modo MRM en dos segmentos.
  - Segmento 1 (para el análisis de OPBZ):
    - Nebulizador: 60 psi.
    - Gas de secado: 12 L/min.
    - Temperatura de secado: 350°C.
    - Skim 1: 25, 7 V.
    - Skim 2: 6 V.
    - Voltaje a la salida del capilar: 69,8 V.
  - Segmento 2 (para el análisis de PBZ y PBZ-D10):
    - Nebulizador: 60 psi.
    - Gas de secado: 12 L/min.
    - Temperatura de secado: 350°C.
    - Skim 1: 27,2 V.

- Skim 2: 6 V.
- Voltaje a la salida del capilar: 70,3 V.

3. Método MS: consta de dos segmentos en modo MRM que se programan en el tiempo.

- Segmento 1 (0 a 5 min): se muestra en la tabla 3.15.
- Segmento 2 (5 a 10 min): se muestra en la tabla 3.16.

Tabla 3.15.- Ion precursor, iones producto y el voltaje de la amplitud de fragmentación en el espectrómetro de masas para la oxifenilbutazona (OPBZ).

<b>Ion precursor &gt; Ion producto MS<sup>2</sup></b>	<b>Amplitud de fragmentación (V)</b>	<b>Analito</b>
325>120	0,75	OPBZ
325>160	0,75	OPBZ
325>204 <sup>a</sup>	0,75	OPBZ

<sup>a</sup>Ion usado en la cuantificación.

Tabla 3.16.- Iones precursores, iones producto y los voltajes de la amplitud de fragmentación en el espectrómetro de masas para la fenilbutazona (PBZ) y para la fenilbutazona-D10 (PBZ-D10).

<b>Ion precursor &gt; Ion producto MS<sup>2</sup></b>	<b>Amplitud de fragmentación (V)</b>	<b>Analito</b>
309>120	0,70	PBZ
309>160	0,70	PBZ
309>211 <sup>a</sup>	0,70	PBZ
319>221 <sup>a</sup>	0,85	PBZ-D10

<sup>a</sup> Son los iones hijos usados para la cuantificación.

La secuencia de trabajo en el cromatógrafo consta de: fase móvil, blanco de reactivos, blanco de muestra, muestras enriquecidas que forman la curva de

calibrado y el resto de muestras que podrán ser desde una hasta aproximadamente veinte, intercalando una inyección de fase móvil cada 5 muestras aproximadamente que garantice la inexistencia de efecto memoria en el sistema.

## 2.4.5. Tratamiento y expresión de los resultados

### A) Tratamiento de los resultados

1. Construir una recta de regresión (ecuación 3.3.) relacionando las respuestas relativas de los analitos y patrón interno (obtenidos a partir de los cromatogramas extraídos de los iones hijo: 204 m/z para OPBZ, 211 m/z para PBZ y 221 m/z para PBZ-D10) con las concentraciones relativas de los mismos a partir de los datos obtenidos al inyectar 40 µL de cada una de las muestras enriquecidas.
2. A partir de la respuesta relativa analito/patrón interno usando la ecuación de regresión, se calcula la concentración de las áreas de los picos de los analitos (OPBZ y PBZ) y se calcula la concentración de OPBZ y PBZ en las muestras problema y en la enriquecida mediante la ecuación 3.5.

Ecuación 3.5.

$$C_{(\mu\text{g} / \text{L})} = \frac{X \cdot C_{PI} \cdot V_{EF}}{V_M}$$

C = Concentración de los analitos OPBZ y PBZ (µg/L) en muestra.

X = x de la ecuación 3.3.

C<sub>PI</sub> = concentración del patrón interno (µg/L).

V<sub>EF</sub> = Volumen del extracto final (mL).

V<sub>M</sub> = Volumen de la muestra (mL).

### B) Confirmación de la presencia de los analitos en una muestra problema

La confirmación se basa en una comparación del tiempo de retención de la OPBZ y PBZ patrones y de los picos de interés obtenidos en los cromatogramas extraídos de los iones hijos m/z 204 y 211 respectivamente y sus respectivos espectros de masas.



Una muestra se da como positiva o no conforme cuando aparece un pico en el cromatograma de la masa extraída correspondiente a los iones hijos de interés usados en la cuantificación cuyo tiempo de retención no difiera más del 5% respecto al tiempo de retención de la señal obtenida para dicho ion hijo en las sustancias patrón. La cuantificación de ese pico siempre debe ser mayor o igual al límite de decisión o CC $\alpha$  de la sustancia correspondiente.

Además, debe presentar un espectro de masas en la que al menos una de las intensidades relativas de los iones hijos no usados en la cuantificación (m/z 160 y 120 para OPBZ y m/z 160 y 120 para PBZ) respecto al ion de cuantificación debe ser igual a aquella obtenida en la muestra enriquecida de similar concentración, teniendo en cuenta las tolerancias recogidas en la Decisión 657/2002/CEE mostradas anteriormente en la tabla 3.10.

### C) Control de calidad

#### ➤ Control interno.

Se realiza en cada secuencia de trabajo.

1. Comprobar con el blanco de reactivos que no hay ningún pico interferente en el tiempo de retención de la OPBZ y PBZ.
2. Linealidad y sensibilidad. Criterio de aceptación de la curva de calibrado: se acepta como correcta una curva de calibrado:
  - con un valor de la pendiente comprendido en el intervalo [0,3 – 2,5] para la OPBZ y [0,51 – 2,78] para la PBZ.
  - con una  $R^2 \geq 0,95$ .
  - con un valor de  $b$  (ordenada en el origen) comprendido en el intervalo de [-0,71- 1,11] para la OPBZ y de [-0,67- 0,70] para la PBZ.

Estos intervalos están calculados en el capítulo de resultados.

3. La eficacia del método se comprueba a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra enriquecida en el límite inferior del intervalo de trabajo. Criterio de aceptación: se acepta como correcta una exactitud

comprendida en el intervalo [60 - 120].

4. Precisión. Los resultados obtenidos del control de la eficacia del método se utilizarán para realizar un control de la precisión del método cada cinco secuencias de trabajo. Criterio de aceptación: se acepta como correctos valores de precisión (como Coeficiente de Variación), calculados como se describe en el procedimiento de validación de los métodos analíticos investigados, descritos en la tabla 3.2 de precisión en el apartado de reproducibilidad intralaboratorio.

➤ Acciones correctoras.

La secuencia de trabajo no es válida si alguno de los criterios establecidos para el blanco de reactivos, la curva de calibrado y la exactitud no se cumplen, así pues, se repetiría de nuevo.

➤ Control externo.

Participación en ejercicios interlaboratorio cuando existan.

#### D) Expresión de los resultados analíticos

La concentración de OPBZ y PBZ en la muestra se expresa en ppb ( $\mu\text{g/L}$ ) con una cifra decimal. El sistema de redondeo de la segunda cifra decimal obtenida en el cálculo es añadir una unidad a la primera cifra decimal cuando el segundo decimal sea 5 o superior a 5.

## **2.5. MELOXICAM, FLUNIXIN MEGGLUMINE, CARPROFENO Y ÁCIDO TOLFENÁMICO EN HIGADO POR HPLC-MS<sup>n</sup>.**

### **2.5.1. Alcance**

- Muestras a las que se puede aplicar: este método puede aplicarse a la determinación de meloxicam (MLX), flunixin meglumine (FLU), carprofeno (CPF) y ácido tolfenámico (TOLF) en hígado de animales de abasto, aves y conejos.

- Rango de medida: este procedimiento se aplicará a la determinación de meloxicam, flunixin meglumine, carprofeno y ácido tolfenámico a concentraciones en

torno al límite máximo de residuo que establece la Unión Europea para cada una de estas sustancias. El límite de decisión ( $CC\alpha$ ) será de 76  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para el MLX en hígado de todas las especies, 1.090  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para el CPF en hígado de bovino y equino y 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para hígado de porcino, aves y conejos, 359  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 114  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 243  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para el FLU en hígado de bovino, equino, porcino y aves/conejos respectivamente y 486  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para el TOLF en hígado de bovino y porcino y 200  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para equino y aves/conejos. El cálculo de estos límites se detalla en el capítulo de resultados y discusión.

### 2.5.2. Equipos, materiales y reactivos

- Centrifuga (4.000 r.p.m.).
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno Turbo-Vap<sup>®</sup>.
- Agitatus.
- Agitador basculante.
- Balanza analítica con una resolución de 0,1 mg.
- Tubos de polipropileno de 15 mL.
- Columna Cromatográfica Xterra<sup>®</sup> C<sub>18</sub> Waters (150 mm x 2,1 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ).
- pH-metro.
- Columna de extracción en fase sólida OASIS MCX 150 mg/6cc.
- Pipetas automáticas 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 1000-5000  $\mu\text{L}$  y de 1-10 mL.
- Pipeta pasteur de vidrio desechable.
- Pipetas de 0,5 y 1 mL, graduadas clase A.
- Probeta 250 mL graduada clase A.
- Matraces aforados 10, 25, 50 y de 500 mL clase A.
- Dosificadores 0,5-5 mL y de 1-10 mL.
- Agua para HPLC.
- Ácido clorhídrico al 37%, calidad de análisis (p.a).
- Solución HCl 0,24 M. Llevar 20 mL de HCl al 37% a 1 L con agua milli Q en un matraz aforado de 1 L clase A.
- Solución valorada de ácido clorhídrico 1 N, calidad para análisis.
- Fosfato trisódico dodecahidratado para análisis.
- Solución de fosfato trisódico 0,3 M. Pesar 11,4 g de fosfato trisódico dodecahidratado y llevar a 100 mL con agua Milli-Q.
- Hidróxido sódico p.a.
- Solución hidróxido sódico 2 N: pesar 20 g de hidróxido sódico, disolver y enrasar a 250 mL (en matraz aforado 250 mL clase A) con agua desmineralizada.

- Amoníaco al 27%, calidad para análisis (p.a).
- Amoníaco al 5% en metanol: 10 mL de amoníaco llevados a 200 mL de metanol grado HPLC.
- Ácido fórmico 98-100%.
- Ácido fórmico 10 mM. Llevar 190  $\mu$ L de ácido fórmico 98-100% a 500 mL con agua para HPLC.
- Ácido fórmico al 2%. Llevar 2 mL de ácido fórmico 98-100% a 100 mL con agua para HPLC.
- Metanol hypergrade para HPLC.
- Acetonitrilo hypergrade para HPLC.
- Acetato de etilo HPLC.
- Metanol calidad para HPLC.
- 2-propanol, calidad para análisis (p.a).
- 2-propanol al 50% (V/V) en agua Merck para HPLC.
- Carprofeno puro, riqueza 99% (Sigma).
- Meloxicam sodium salt, (Sigma).
- Flunixin meglumine, (Witega).
- Ácido tolfenámico, (Sigma).
- Flunixin-D3, (Witega).
- Meloxicam-D3, (Witega)
- Gas nitrógeno "U" (99,99%).
- Equipo de detección: cromatógrafo líquido de alta eficacia asociado a un espectrómetro de masas de trampa iónica de Agilent Technologies<sup>®</sup> descrito anteriormente en el punto 2.1.2.

### 2.5.3. Preparación

#### A) Principio

Se toma una alícuota de muestra previamente homogeneizada y se somete a un primer paso de hidrólisis en medio ácido, dejando la muestra agitando durante una hora. Después de neutralizar el extracto, ajustando el pH entre 6,8 y 7,2, se realiza extracción L/L con acetato de etilo. El acetato de etilo, se evapora a sequedad y se resuspende en 5 mL de agua y se purifica mediante extracción en fase sólida con una columna Oasis MCX. El extracto purificado y evaporado a sequedad se redisuelve y finalmente se inyecta en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup>.

#### B) Preparación de los patrones

- Solución madre de MLX,  $325 \pm 25$   $\mu$ g/mL: pesar  $8.6 \pm 0,6$  mg de MLX-Na,

disolver con metanol y llevar a 25 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

- Solución madre de FLU,  $500 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ : pesar  $41,5 \pm 4,1 \text{ mg}$  de FLU, disolver con metanol y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

- Solución madre de CPF,  $500 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ : pesar  $25 \pm 2,5 \text{ mg}$  de CPF, disolver con metanol y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

- Solución madre de TOLF,  $500 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ : pesar  $25 \pm 2,5 \text{ mg}$  de TOLF, disolver con metanol y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

- Solución mezcla intermedia de MLX ( $1,1 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ ), CPF ( $20 \pm 2 \mu\text{g/mL}$ ) y TOLF ( $8 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$ ): pipetear 200  $\mu\text{L}$  de la solución madre de MLX, 2 mL de la solución madre de CPF y pipetear 800  $\mu\text{L}$  de la solución madre de TOLF y llevar a un mismo matraz aforado de 50 mL y enrasar con metanol. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .

- Solución intermedia de FLU,  $10 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 1 mL de la solución madre de FLU en un matraz aforado de 50 mL y enrasar con metanol. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a  $8^{\circ}\text{C}$ .

- Solución de trabajo mezcla de MLX ( $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$ ), CPF ( $2 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$ ) y TOLF ( $0,8 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$ ): pipetear 1 mL de la solución mezcla intermedia de MLX, CPF y TOLF en un matraz aforado de 10 mL clase A y enrasar con metanol. Preparación diaria.

- Solución de trabajo de FLU,  $1 \pm 1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 1 mL de la solución intermedia de FLU en un matraz aforado de 10 mL clase A y enrasar con metanol. Preparación diaria.

- Solución madre de FLU-D3,  $400 \pm 50 \mu\text{g/mL}$ : pesar  $20 \pm 2,5 \text{ mg}$  de FLU-D3, disolver con metanol y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

- Solución madre de MLX-D3,  $200 \pm 20 \mu\text{g/mL}$ : pesar  $10 \pm 1 \text{ mg}$  de MLX-D3, disolver con metanol y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado. Conservación: congelación a temperatura inferior a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

- Solución mezcla de patrones internos (MLX-D3 y FLU-D3) de trabajo de aproximadamente de  $1 \mu\text{g/mL}$ : pipetear 250  $\mu\text{L}$  de la solución madre de MLX-D3 y

125 µL de la solución madre de FLU-D3 y llevar a un matraz aforado de 50 mL y enrasar con metanol. Conservación: refrigeración a temperatura inferior a 8°C.

#### C) Preparación y conservación de la muestra

- La muestra se debe conservar en estado congelado hasta que se realice el análisis.
- Se homogeniza perfectamente la muestra después de haber eliminado la parte visible de grasa.

#### D) Preparación del cromatógrafo

- Limpieza de la fuente de ionización con la mezcla 2-propanol/agua 50/50 (v/v).
- Se deja estabilizar el cromatógrafo durante al menos una hora antes de la primera inyección, en las condiciones indicadas en el apartado E del punto 2.5.4.

### **2.5.4. Realización**

#### A) Preparación de la serie de trabajo

1. Paralelamente a la muestra se realizan: un blanco de reactivos, un blanco de muestra y muestras enriquecidas, se les añade a todos ellos 100 µL de la solución mezcla de patrones internos de trabajo y se preparan de la siguiente forma:

- Blanco de reactivos: sustituir la muestra por 1 mL de agua.
- Muestra: pesar  $1 \pm 0,2$  g de hígado.
- Blanco de muestra: se pesará  $1 \pm 0,2$  g de hígado en el que previamente no se han detectado los analitos de interés.
- Muestras enriquecidas: a cada alicuota de hígado en el que previamente no se ha detectado los analitos de interés, se añade una cantidad conocida de MLX, CPF, TOLF y FLU a partir de las soluciones de trabajo.

En la tabla 3.17 se detalla el volumen a añadir de solución de patrón en los distintos niveles de calibración.

Tabla 3.17.- Volúmenes de las soluciones de patrón de trabajo de MLX, CPF, TOLF y FLU a añadir a las muestras en los distintos niveles de calibración.

Nivel	Vol.( $\mu$ L) sol. trabajo mezcla	Concentración respecto al LMR	Vol.( $\mu$ L) sol. trabajo flunixin	Concentración de flunixin en muestra ( $\mu$ g/Kg)
1	-----	0	-----	0
2	125	0,25	50	50
3	250	0,5	100	100
4	500	1,0	200	200
5	750	1,5	300	300
6	1000	2,0	450	450

#### B) Hidrólisis química

1. Añadir 5 mL de HCl 0,24 M a la muestra.
2. Agitar en agitatuos aproximadamente 1 minuto.
3. Poner en agitatuos basculante durante una hora a temperatura ambiente.

#### C) Extracción

1. Añadir 500  $\mu$ L de la solución de fosfato trisódico 0,3 M.
2. Neutralizar la muestra con la solución de hidróxido sódico 2 N, ajustando el pH a  $7,00 \pm 0,2$  con el pH-metro.
3. Añadir 4 mL de acetato de etilo.
4. Agitar en agitatuos aproximadamente durante 1 minuto.
5. Centrifugar a aproximadamente 4.000 rpm durante 8 min.
6. Pasar el acetato de etilo a un tubo de polipropileno.
7. Repetir dos veces más los pasos 3, 4, 5 y 6.
8. Evaporar a sequedad el acetato de etilo a aproximadamente 50°C con corriente de N<sub>2</sub> en el Turbo-Vap<sup>®</sup>.

#### D) Purificación

1. Disolver el extracto en 5 mL de agua milliQ.
2. Activar la columna Oasis MCX 150 mg/6 cc pasando sucesivamente 5 mL de metanol y 5 mL de agua.
3. Pasar el extracto rediseñado.
4. Lavar la columna con 5 mL de ácido fórmico al 2 %.
5. Secar la columna durante 5 minutos con aire en el sistema de automatización para extracción en fase sólida.
6. Eluir la columna pasando sucesivamente 5 mL de metanol y 5 mL de amoníaco al 5% en metanol.
7. Evaporar a sequedad el eluato a aproximadamente 50°C con corriente de N<sub>2</sub> en el Turbo-Vap®.

#### E) Detección

1. Se inyectan en el sistema cromatográfico 40 µL de los extractos obtenidos.
2. Condiciones del HPLC:
  - Flujo: 0,250 mL/min.
  - Temperatura de columna: 40°C.
  - Columna: Xterra® C<sub>18</sub> Waters (150 mm x 2,1 mm, 3,5µm).
  - Fase móvil: metanol/ácido fórmico 10 mM. El gradiente cromatográfico se muestra en la tabla 3.18.

Tabla 3.18.- Gradiente cromatográfico para el análisis de MLX, FLU, CPF y TOLF.

<b>Tiempo</b>	<b>Ácido fórmico 10 mM (%)</b>	<b>Metanol (%)</b>
0,0	30	70
1,0	30	70
10,0	10	90
13,0	10	90
13,10	30	70
23,00	30	70

3. Condiciones del espectrómetro de masas: el valor de los parámetros que se detallan a continuación, se optimizan en la página "Tune" del software del equipo



HPLC-MS<sup>n</sup>, sirven para obtener una correcta evaporación y la consiguiente ionización de la fase móvil en la fuente.

- ESI +

- Modo MRM

- Nebulizador: 40 psi.
- Gas de secado: 8,00 L/min.
- Temperatura de secado: 350°C.
- Skim 1: 12,6 V.
- Skim 2: 6 V.
- Voltaje a la salida del capilar: 66,5 V.

4. Método MS: se muestra en la tabla 3.19.

Tabla 3.19.- Iones precursores, iones producto y los voltajes de la amplitud de fragmentación en el espectrómetro de masas para MLX, FLU, CPF, TOLF, FLU-D3 y MLX-D3.

Analito	Ion precursor (m/z)	Amplitud de fragmentación (V)	Iones producto MS <sup>2</sup>	Amplitud de fragmentación (V)	Iones producto MS <sup>3</sup>
Meloxicam	352	0,80	115 <sup>a</sup> ,141,184		
Flunixin	297	1,00	279	0,75	279 <sup>a</sup> ,257
Carprofeno	274	0,70	228	0,60	228 <sup>a</sup> ,193
Acido tolfenámico	262	0,70	244	0,70	244 <sup>a</sup> ,209
Flunixin-D3	300	1,00	282	1,00	282 <sup>a</sup>
Meloxicam-D3	355	0,80	115 <sup>a</sup>		

<sup>a</sup>Son los iones hijos usados para la cuantificación.

La secuencia de trabajo en el cromatógrafo consta de: fase móvil, blanco de

reactivos, blanco de muestra, muestras enriquecidas que forman la curva de calibrado y el resto de muestras que podrán ser desde una hasta aproximadamente veinte, intercalando una inyección de fase móvil cada 5 muestras aproximadamente que garantice la inexistencia de efecto memoria en el sistema.

### **2.5.5. Tratamiento y expresión de los resultados**

#### A) Tratamiento de los resultados

1. Construir una recta de regresión (ecuación 3.3.) relacionando las respuestas relativas de los analitos y patrón interno (obtenidos a partir de los cromatogramas extraídos de los iones hijo usados para la cuantificación) con las concentraciones relativas de los mismos a partir de los datos obtenidos al inyectar 40  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras enriquecidas.
2. A partir de la respuesta relativa analito/patrón interno usando la ecuación de regresión, se calcula la concentración de las áreas de los picos de los analitos y se calcula la concentración de MLX, CPF, FLU Y TOLF en las muestras problema y en la enriquecida mediante la ecuación 3.4.

#### B) Confirmación de la presencia de los analitos en una muestra problema

La confirmación se basa en una comparación del tiempo de retención del MLX, CPF, FLU y TOLF en los patrones y de los picos de interés obtenidos en los cromatogramas extraídos de los iones hijos usados en la cuantificación y sus respectivos espectros de masas.

Una muestra se da como no conforme (positiva) cuando aparece un pico en el cromatograma de la masa extraída correspondiente a los iones hijos de interés usados en la cuantificación cuyo tiempo de retención no difiera más del 5% respecto al tiempo de retención de la señal obtenida para dicho ion hijo en las sustancias patrón. Además la cuantificación de ese pico debe ser igual o superior a la concentración del límite de decisión o  $CC\alpha$  de la sustancia correspondiente.

Además, debe presentar un espectro de masas en la que al menos una de las intensidades relativas de los iones hijos no usados en la cuantificación respecto al

ión de cuantificación debe ser igual a aquella obtenida en la muestra enriquecida de similar concentración, teniendo en cuenta las tolerancias recogidas en la Decisión 657/2002/CEE mostradas anteriormente en la tabla 3.10.

### C) Control de calidad

➤ Control interno:

Se realiza en cada secuencia de trabajo.

1. Comprobar con el blanco de reactivos que no hay ningún pico interferente en el tiempo de retención de los analitos.
2. Linealidad y sensibilidad. Criterio de aceptación en curva de calibrado, se acepta como correcta una curva de calibrado:

- con un valor de la pendiente comprendido en el intervalo para el MLX [0,28 – 1,8], para FLU [0,59 – 1,91], para CPF [0,05 – 0,29] y para TOLF [0,10 – 1,02].

- con una  $R^2 \geq 0,95$ .

- con un valor de  $b$  (ordenada en el origen) comprendido en el intervalo para el MLX [-0,55 – 0,89], para el FLU [-0,44 – 1,00], para el CPF [-0,14 – 0,17] y para el TOLF [-0,41 – 0,39].

Estos intervalos están calculados en el capítulo de resultados y discusión.

3. La eficacia del método se comprueba a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra enriquecida en el límite de decisión o  $CC\alpha$  de la sustancia. Criterio de aceptación: se acepta como correcta una exactitud comprendida en el intervalo [80 - 110].
4. Precisión. Los resultados obtenidos del control de la eficacia del método se utilizan para realizar un control de la precisión del método cada cinco secuencias de trabajo. Criterio de aceptación: se acepta como correctos valores de precisión (como Coeficiente de Variación), calculados como se describe en el procedimiento de validación de los métodos analíticos investigados, descritos en la tabla 3.2 de precisión en el apartado de reproducibilidad intralaboratorio.

➤ Acciones correctoras.

La secuencia de trabajo no es válida si alguno de los criterios establecidos para el blanco de reactivos, la curva de calibrado y la exactitud no se cumplen, así pues, se repetiría de nuevo.

➤ Control externo.

Participación en ejercicios interlaboratorio cuando existan.

D) Expresión de los resultados analíticos

La concentración de MLX, FLU, CPF y TOLF en la muestra se expresa en ppb ( $\mu\text{g/Kg}$ ) con una cifra decimal. El sistema de redondeo de la segunda cifra decimal obtenida en el cálculo es añadir una unidad a la primera cifra decimal cuando el segundo decimal sea 5 o superior a 5.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



En este capítulo se describe el proceso de optimización y puesta a punto de los métodos investigados. Se indican cuales han sido los puntos clave y como han sido desarrollados para obtener la mejor reproducibilidad y sensibilidad deseada para cada uno de los métodos.

A continuación, se detallan los resultados obtenidos en la validación de cada uno de los métodos descritos en el apartado 2 de material y métodos. La validación ha sido realizada acorde a las indicaciones del procedimiento para la validación de métodos analíticos para la determinación de residuos zoonosológicos del Laboratorio de Salud Pública de Valencia (apartado 1 de material y métodos). Este procedimiento se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la Decisión 657/2002/CEE.

En la validación se han obtenido los valores de los parámetros: selectividad/especificidad, función respuesta ( $R^2$ , pendiente y ordenada en el origen), exactitud, precisión/reproducibilidad, límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y capacidad de detección ( $CC\beta$ ). La evaluación de estos parámetros ha permitido comprobar que los métodos analíticos descritos cumplen con los requisitos técnicos que establece la Decisión 657/2002/CEE para el funcionamiento de métodos analíticos de residuos de medicamentos veterinarios.

Además, la obtención de varios de los datos obtenidos durante la validación, como los valores de la pendiente y ordenada en el origen de todas las curvas de calibrado realizadas, han servido para establecer unos criterios de aceptación para el control de calidad interno. Dicho control, se realiza en cada secuencia de trabajo cada vez que se utiliza cada uno de los métodos analíticos, de acuerdo a los requisitos técnicos de la Norma UNE/ISO 17025.

Finalmente, en cada unos de los procedimientos de ensayo descritos, se explica como se ha demostrado su utilidad, bien a través de ejercicios de intercomparación de reconocido prestigio, de la administración del principio activo al animal o bien mediante muestras no conformes tomadas por los servicios de inspección de la autoridad competente.

## 1. DETERMINACIÓN DE AGONISTAS $\beta$ -ADRENÉRGICOS EN HÍGADO Y ORINA POR HPLC-MS<sup>n</sup>.

Ante la puesta a punto de este método para la determinación de éstos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, se plantearon muchos interrogantes para conseguir que este método fuera multiresiduo con una buena sensibilidad para todos los analitos implicados.

En principio la matriz elegida fue hígado, ya que como órgano filtrador, se asegura que si se ha suministrado estos fármacos se encuentren en él en más concentración que en otros tejidos.

Esta matriz es ampliamente conocida por aportar siempre extractos sucios que frecuentemente ensucian las fuentes de ionización de los equipos HPLC-MS y que además generan, por su amplia concentración de diferentes sustancias (orgánicas e inorgánicas), mayor efecto de supresión iónica (81).

Este efecto produce una disminución de la ionización de las moléculas a investigar en la fuente de ionización, debido a que se establece una competencia entre estas sustancias que aporta la muestra y los analitos a determinar. Por tanto, a pesar de encontrarse el analito en una concentración detectable, el equipo muestra una respuesta inferior a esa misma concentración de analito en una solución distinta al extracto de la muestra.

La supresión iónica no sólo afecta a la disminución de la capacidad de detección porque se reduce la señal del analito, sino que también afecta a la reproducibilidad, porque el grado de supresión puede variar mucho entre una muestra y otra. Así pues, se verán afectadas también las intensidades relativas de los iones (*ion ratio*) para la confirmación, la linealidad y por supuesto la cuantificación.

Todo ello, puede incluso producir un aumento en los falsos negativos o falsos conforme (Decisión 657/2002/CEE). Además, si este efecto afecta de distinta forma al patrón interno y al analito a cuantificar, puede aumentar el riesgo de falsos positivos o falsos no conformes en sustancias con LMR al sobreestimarse el valor de



concentración de la sustancia con LMR, si el patrón interno se ve más afectado por la supresión iónica.

Este método comienza con una extracción acuosa con un tampón acetato-acético que produce la hidrólisis de los enlaces de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos con glucurónidos y/o sulfatos.

Para purificar este extracto se probaron diversos métodos de extracción en fase sólida (EFS) como indicaba la bibliografía (30, 32), pero finalmente la fase con la que se obtuvo mejor resultado fue la C<sub>18</sub> de 1 g de Waters<sup>®</sup>. No se observó saturación de la fase, incluso aumentando la concentración de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, como se ha descrito para otro tipo de fases (31).

El primer método para la EFS que se optimizó no incluía el último lavado de la columna con hexano y se obtenían recuperaciones más bajas. Se comprobó que añadiendo patrón de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos sobre un extracto de matriz blanca, la señal de éstos disminuía en un 50% respecto a la señal del patrón disuelto en fase móvil sin matriz; este fenómeno correspondía al efecto de la supresión iónica.

El lavado con hexano hizo eluir de la columna de EFS aquellas sustancias que en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> disminuían la completa ionización de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Los pasos posteriores de purificación del eluato con tertbutilmetil éter fueron indispensables para disminuir aún más la supresión iónica al extraer más eficazmente de ese eluato a los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, separándolos de otras sustancias que podían producir supresión iónica en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup>.

Este procedimiento con los procesos de extracción y purificación se probó sobre la orina ajustada a pH  $11 \pm 1$  y los analitos consiguieron detectarse con la misma sensibilidad que en el hígado.

En cuanto a la fragmentación de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos investigados en la trampa de iones, se ha podido realizar experimentos de MS<sup>3</sup> con el clenbuterol, clenbuterol-D9 (patrón interno), brombuterol, hidroxiclembuterol y con el mapenterol,

obteniendo así cromatogramas con la línea base con muy poco ruido de fondo y aumentando la especificidad en la detección de dichos analitos. Es importante señalar que al seleccionar para la cuantificación y para la confirmación-identificación iones nieto o producto  $MS^3$ , es decir fragmentos de los iones hijo que a su vez son productos  $MS^2$  del ión padre o precursor, se está detectando estas sustancias de manera más inequívoca aún que con experimentos de  $MS^2$ .

La Decisión 657/2002/CEE establece que para sustancias del grupo A, como los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, los métodos analíticos deben aportar como mínimo 4 puntos de identificación (IPs), que en el caso de HPLC con espectrometría de masas de baja resolución (ej.: trampa de iones, triple cuadrupolo, etc.) corresponden a un punto para cada ion precursor y 1,5 puntos por cada ion de transición o hijo. Con el equipo HPLC- $MS^n$  usado en este trabajo, para los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, se han obtenido bien 2 iones hijo o 2 iones nieto, que junto con el ion molecular o precursor suman 4 puntos de identificación.

En la figura 4.1 se muestra los cromatogramas de una muestra de hígado blanco de origen porcino, en ella se observa en los cromatogramas extraídos (EIC) del ion nieto del clenbuterol (203 m/z), del ion hijo del clenbuterol (273 m/z), del ion nieto del brombuterol (293 m/z), del ion nieto del hidroxiclembuterol (203 m/z), del ion nieto del mapenterol (237 m/z) y del ion hijo del mabuterol (293 m/z) la ausencia de señal en los tiempos de retención de todos los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, demostrándose la especificidad del método.

En la figura 4.2 se muestra los cromatogramas de los iones usados en la cuantificación de una muestra de hígado de porcino adicionado con los 6 agonistas  $\beta$ -adrenérgicos. Asimismo, en la figura 4.3 se pueden observar espectros de masas de todas las moléculas, con un ion mayoritario y otro menos abundante. Son los iones descritos en el apartado de detección en el capítulo de material y métodos en la tabla 3.9.

Fig. 4.1.- Cromatogramas de un blanco de hígado de porcino (EIC 203 m/z **clenbuterol**, EIC 204 m/z **clenbuterol-D9**, EIC 273 m/z **clempenterol**, EIC 293 m/z **brombuterol**, EIC 203 m/z **hidroxiclembuterol**, EIC 237 m/z **mapenterol** y EIC 293 m/z **mabuterol**).

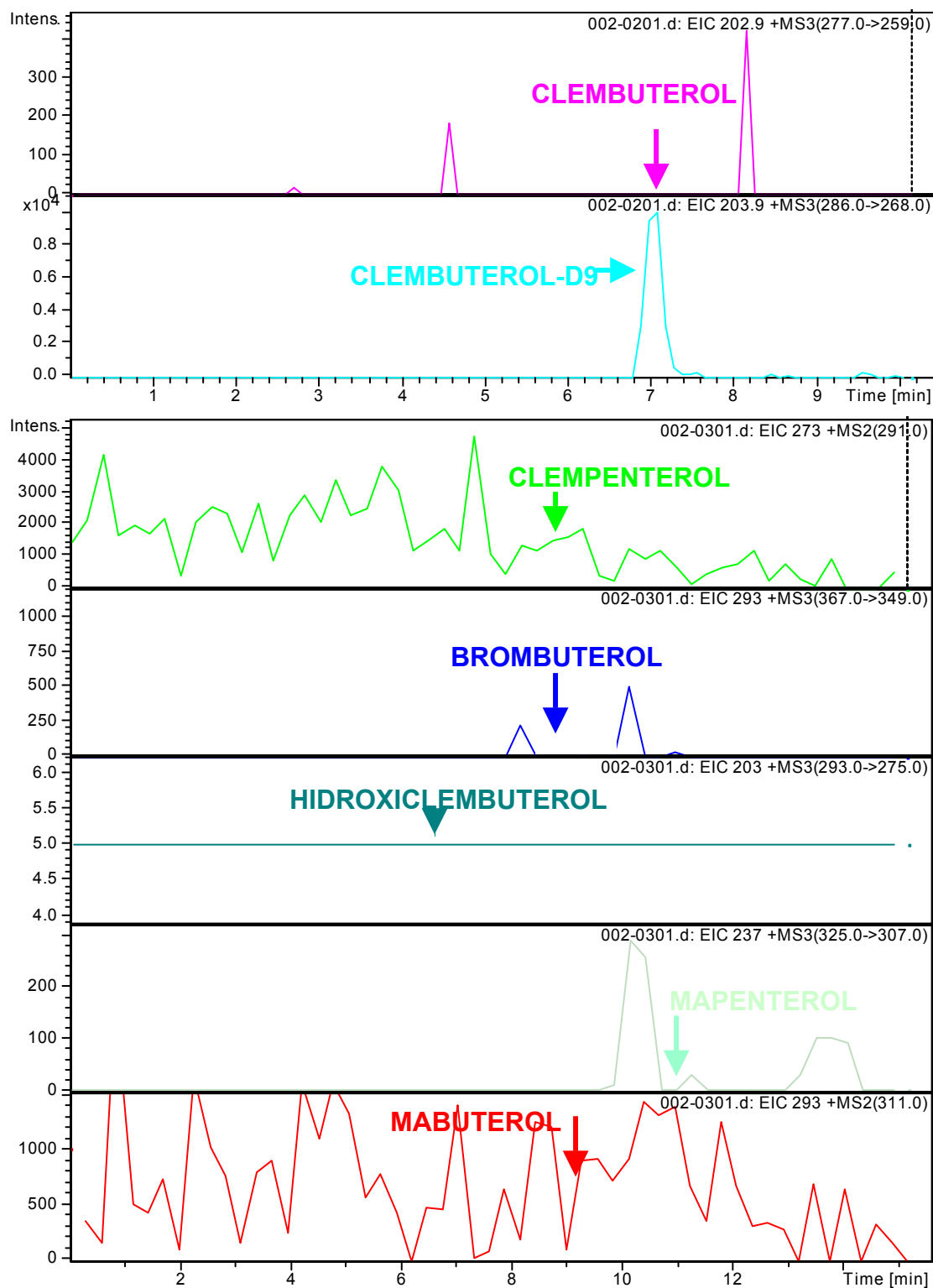


Fig. 4.2.- Cromatogramas de un hígado de porcino adicionado con los 6 agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (EIC 203 m/z **clenbuterol**, EIC 204 m/z **clenbuterol-D9**, EIC 273 m/z **clempenterol**, EIC 293 m/z **brombuterol**, EIC 203 m/z **hidroxiclembuterol**, EIC 237 m/z **mapenterol** y EIC 293 m/z **mabuterol**).

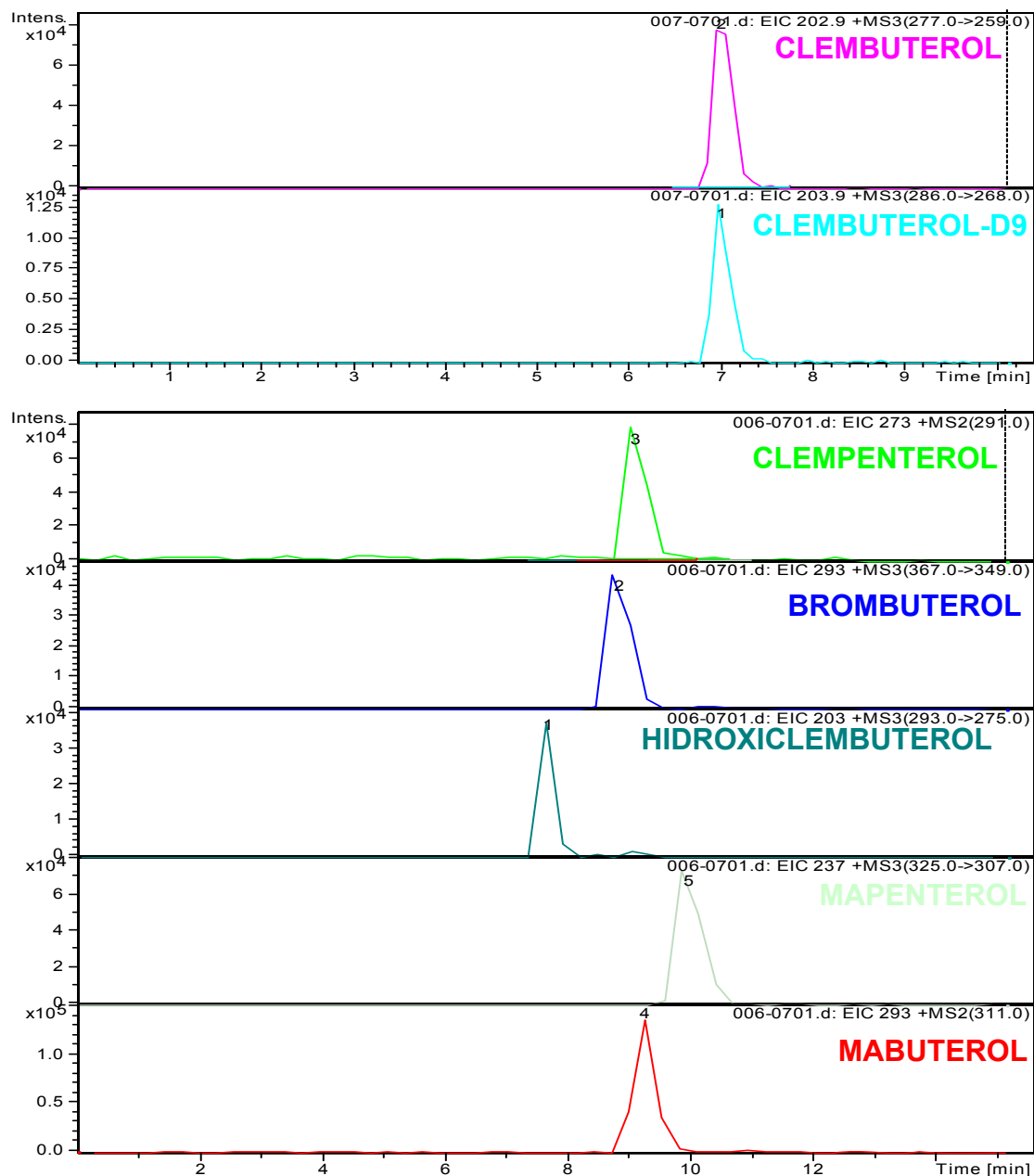
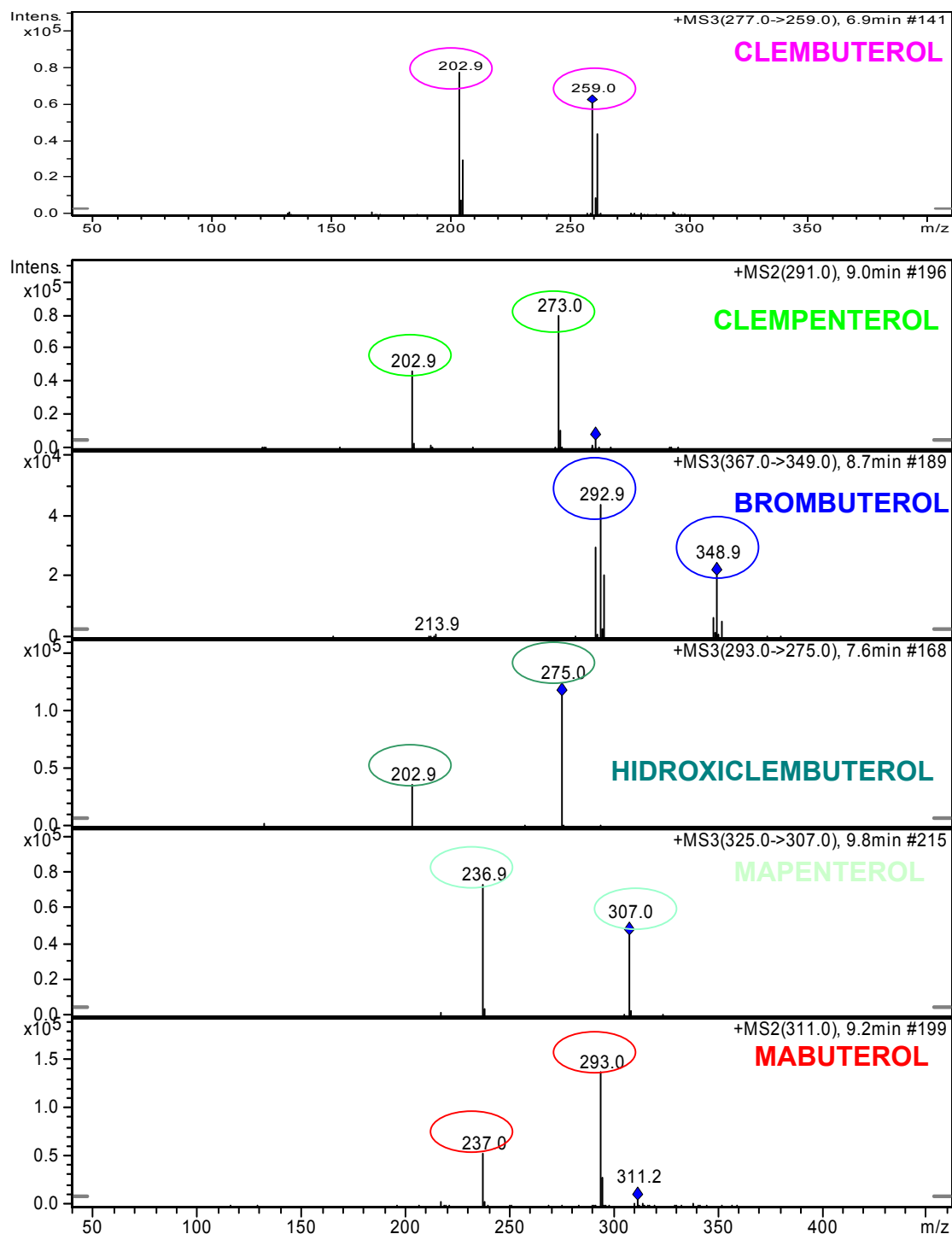


Fig. 4.3.- Espectro de masas de los cromatogramas de la figura 4.2.



En la figura 4.4 se muestran los cromatogramas de una muestra de hígado bovino adicionada al CC $\alpha$  de cada sustancia, 0,05  $\mu$ g/Kg para el clenbuterol y 0,10  $\mu$ g/Kg para el resto de analitos. En la figura 4.5 se muestran los espectros de masas

característicos de cada sustancia, comprobándose que están presentes todos los iones en ese nivel de concentración.

Fig. 4.4.- Cromatogramas de un hígado de bovino adicionado en el límite de decisión de cada agonista  $\beta$ -adrenérgico (EIC 203 m/z **clenbuterol**, EIC 204 m/z **clenbuterol-D9**, EIC 273 m/z **clempenterol**, EIC 293 m/z **brombuterol**, EIC 203 m/z **hidroxiclembuterol**, EIC 237 m/z **mapenterol** y EIC 293 m/z **mabuterol**).

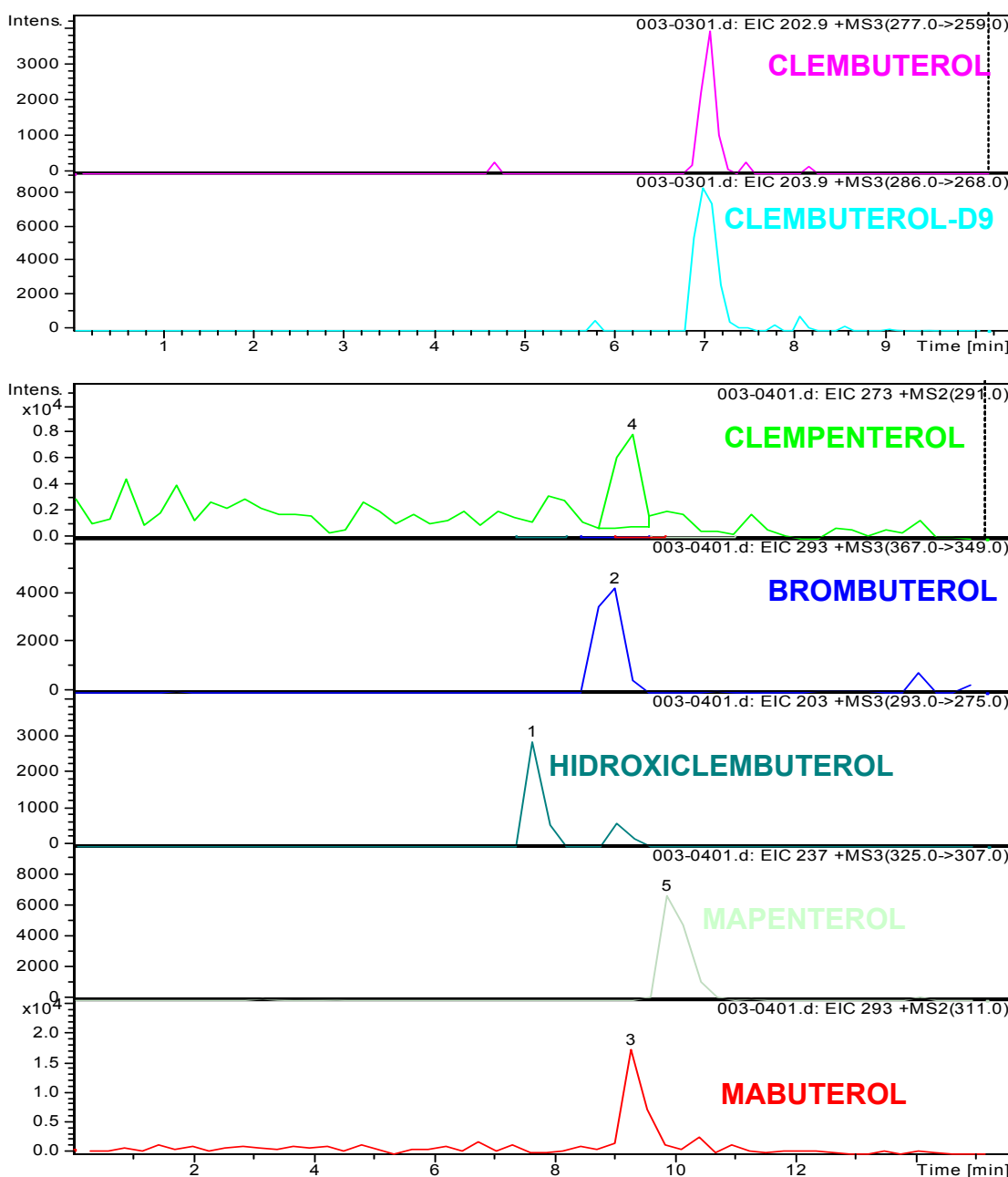
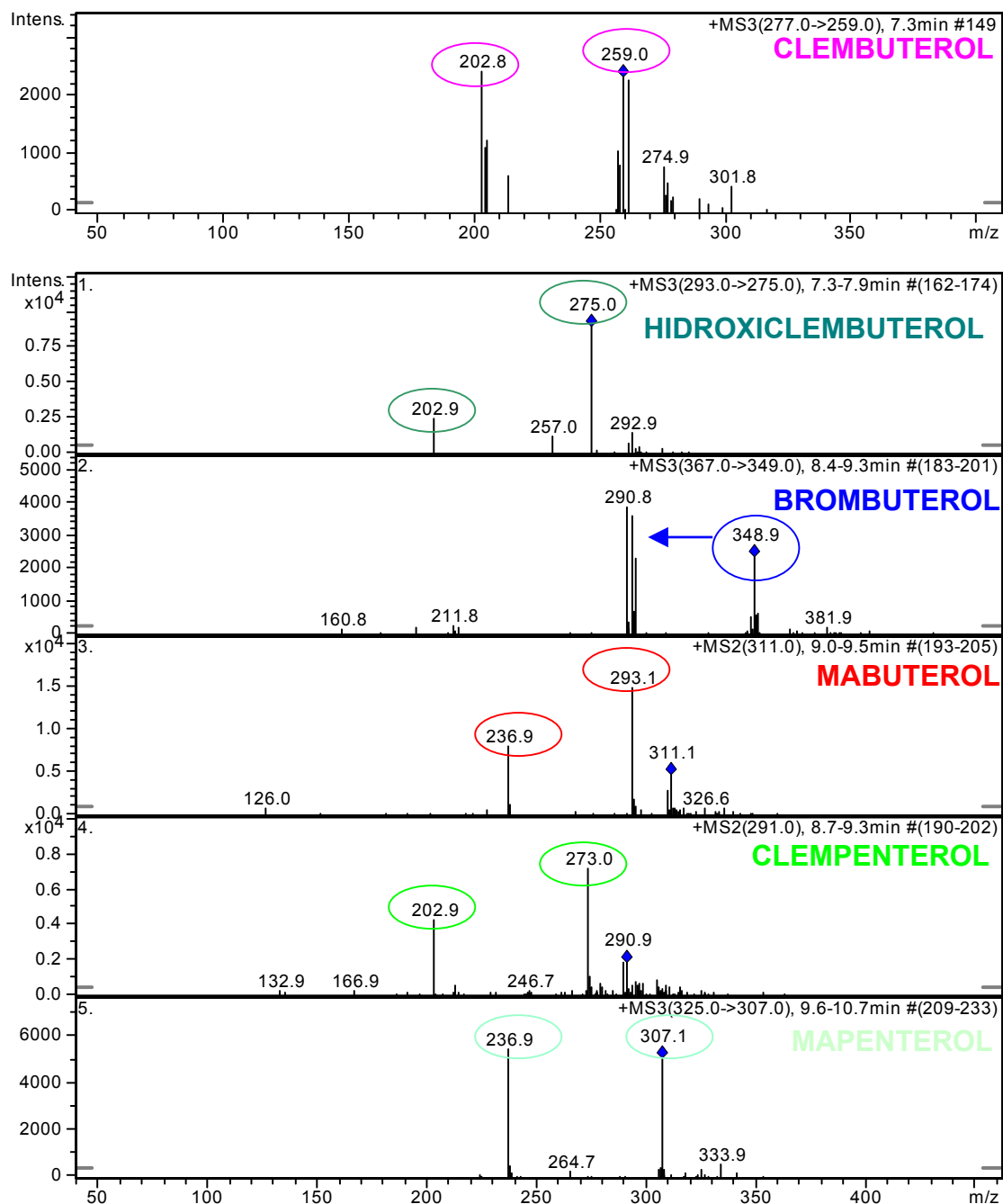


Fig. 4.5.- Espectro de masas de los cromatogramas de la figura 4.4.



Como se ha mencionado anteriormente el patrón interno usado, el clembuterol-D9, se añade a todas las muestras en una concentración de 0,10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y resulta una buena herramienta para la corrección de la recuperación de los analitos en los procesos de extracción y purificación al relativizar su señal con la del analito a detectar para su cuantificación. En la figura 4.1, se puede ver el cromatograma de la

masa extraída 204 m/z que corresponde al ion nieta mayoritario de la fragmentación del ion 286 m/z, que es el clembuterol-D9.

La validación se ha realizado atendiendo a las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, tal y como se ha descrito en el capítulo de material y métodos en el apartado 1 donde se describe el procedimiento para la validación de métodos analíticos.

El ensayo ha sido validado tal y como se describe el punto 1.3.2 del citado apartado, para sustancias que no tienen límite máximo de residuo (LMR) y se van a analizar con un método cuantitativo. Las matrices utilizadas en la validación han sido: hígado y orina animal de todas las especies de consumo. Así pues, los parámetros determinados son:

### 1.1. Selectividad/especificidad

Se utiliza el método para analizar 22 muestras de diferentes matrices y especies que se muestran en la tabla 4.1 y 4.2.

Tabla 4.1.- Muestras de orina de diferentes especies que se analizan con el método desarrollado.

Identificación muestra	Matrices	Especie
1151	Orina	Porcino
3861	Orina	Porcino
10267	Orina	Bovino
8472,8473,8474	Orina	Porcino
10264,11691,12072	Orina	Bovino, Ovino
13047	Orina	Bovino
15894,15895	Orina	Ovino



Tabla 4.2.- Muestras de hígado de diferentes especies que se analizan con el método desarrollado.

Identificación muestra	Matrices	Especie
194,201	Hígado	Pollo
231,232,421	Hígado	Porcino
2754,2755	Hígado	Pavo
2759	Hígado	Conejo
3484,3485	Hígado	Bovino
13286	Hígado	Conejo
12959	Hígado	Pollo
13073	Hígado	Pavo
13124	Hígado	Pollo
13219	Hígado	Pavo
12071	Hígado	Ovino
14257	Hígado	Bovino
14258	Hígado	Bovino
14280	Hígado	Avícola
14281	Hígado	Avícola

En las muestras de las tablas 4.1 y 4.2, no se encuentra ninguna señal en el tiempo de retención del clenbuterol, clenpenterol, brombuterol, hidroxiclembuterol, mapenterol y mabuterol que suponga la identificación del mismo. Con ello se demuestra la especificidad del método para todas las especies y matrices ensayadas.

## 1.2. Función de respuesta instrumental

La función de respuesta se determina a partir de los datos obtenidos tras la inyección de 10 curvas preparadas con las soluciones patrón de la curva de calibrado tal y como se describe en la tabla 3.3 para el clenbuterol y tabla 3.5 para el resto de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en el capítulo material y métodos. Todas las curvas contienen 6 niveles de calibración (incluyendo el blanco como nivel 1), de las 10 curvas 5 están realizadas en condiciones de reproducibilidad por el operador 1 (Francisco Moragues) y las otras 5 por el operador 2 (Carmen Igualada).

En las tablas 4.3 y 4.4 se muestran los datos de  $R^2$ ,  $m$  (pendiente) y  $b$  (ordenada en el origen), así como la media y la desviación estándar de  $m$  y  $b$ , de las curvas instrumentales de los distintos agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Tabla 4.3.- Parámetros de las curvas instrumentales de clenbuterol, clempenterol y brombuterol. D.E: desviación estándar.

Curva	Clenbuterol			Clempenterol			Brombuterol		
	$R^2$	$m$	$b$	$R^2$	$m$	$b$	$R^2$	$m$	$b$
1	0,98	1,07	-0,45	0,99	0,67	0,57	0,99	0,35	0,40
2	0,99	1,20	-0,35	0,99	0,97	-0,04	0,99	0,55	0,99
3	0,98	0,91	-0,27	0,99	0,99	0,10	0,99	0,52	0,17
4	0,99	0,47	-0,43	0,98	0,55	0,02	0,98	0,66	0,05
5	0,99	0,70	-0,07	0,99	0,23	-0,10	0,99	0,76	0,10
6	0,99	1,59	-0,63	0,98	0,70	0,20	0,98	0,25	-0,20
7	0,98	0,43	0,01	0,99	1,10	0,03	0,99	0,38	0,10
8	0,99	0,64	-0,03	0,99	0,35	0,05	0,99	0,39	0,06
9	0,99	0,53	-0,04	0,98	0,68	-0,20	0,98	0,49	0,04
10	0,99	0,48	0,06	0,98	0,75	-0,03	0,98	0,59	-0,07
Media	---	0,81	-0,22	---	0,69	0,06	---	0,49	0,16
D.E	---	0,38	0,23	---	0,27	0,20	---	0,15	0,33

Tabla 4.4.- Parámetros de las curvas instrumentales de hidroxiclembuterol, mapenterol y mabuterol. D.E: desviación estándar.

Curva	Hidroxiclembuterol			Mapenterol			Mabuterol		
	$R^2$	$m$	$b$	$R^2$	$m$	$b$	$R^2$	$m$	$b$
1	0,98	0,23	0,08	0,99	0,77	0,80	0,99	1,38	1,35
2	0,99	0,23	0,13	0,99	1,13	-0,04	0,99	1,70	0,45
3	0,99	0,36	0,02	0,99	1,06	0,006	0,99	1,90	0,03
4	0,98	0,16	0,10	0,99	1,08	0,05	0,98	1,25	0,10
5	0,99	0,26	-0,05	0,99	1,10	0,07	0,99	1,35	0,15
6	0,98	0,28	-0,06	0,99	0,99	0,80	0,98	1,44	0,21
7	0,99	0,13	-0,10	0,98	0,79	0,17	0,99	1,33	0,32
8	0,99	0,16	0,20	0,99	0,87	0,21	0,99	1,32	0,85
9	0,98	0,37	0,15	0,99	0,89	-0,15	0,98	0,99	0,92
10	0,98	0,23	0,16	0,99	0,98	-0,05	0,98	0,89	1,03
Media	---	0,24	0,06	---	0,96	0,19	---	1,35	0,54
D.E	---	0,08	0,10	---	0,12	0,33	---	0,30	0,46

Los límites de la pendiente ( $m$ ) se estiman con la ecuación 4.1.

Ecuación 4.1.

$$\text{Límite} = m \pm 2 \times s_m$$

Como control de calidad interno cada vez que se realiza este procedimiento se tiene en cuenta los siguientes intervalos de aceptación de la pendiente: [0,03 – 1,57] para el clenbuterol, [0,15 – 1,23] para el clenpenterol, [0,19 – 0,79] para el brombuterol, [0,08 – 0,40] para el hidroxiclembuterol, [0,72 – 1,20] para el mapenterol y [0,90 – 1,95] para el mabuterol.

Los límites de la ordenada en el origen ( $b$ ) se estiman con la ecuación 4.2.

Ecuación 4.2.

$$\text{Límite} = b \pm 2 \times s_b$$

Los intervalos de aceptación de la  $b$ : [-0,70 – 0,25] para el clenbuterol, [-0,34 – 0,46] para el clenpenterol, [-0,5 – 0,82] para el brombuterol, [-0,14 – 0,20] para el hidroxiclembuterol, [-0,47 – 0,85] para el mapenterol y [-0,38 – 1,46] para el mabuterol.

### 1.3. Exactitud

Para el cálculo de la exactitud, en cada nivel de adición, bajo (nivel 2), medio (nivel 4) y alto (nivel 6) se obtiene un valor de concentración (C.O) que se compara con el *valor de la concentración esperada* (C.E), tal y como se ha descrito en el apartado 1 de material y métodos.

Las adiciones se han realizado sobre 10 muestras blanco de hígado y sobre 10 muestras blanco de orina realizadas por dos operadores diferentes.

Los resultados de la concentración esperada, exactitud y exactitud media obtenida para cada analito se detallan en las tablas 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10.

Tabla 4.5.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del clenbuterol en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado y diez de orina.

<b>Clenbuterol</b>									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
2,6	3,1	119	10,6	11	104	52,6	50,8	97	
2,6	3,0	115	10,6	9,2	87	52,6	58,1	110	
2,6	3,1	119	10,6	7,0	66	52,6	51,7	98	
2,6	2,4	92	10,6	8,7	82	52,6	52,3	99	
2,6	3,0	115	10,6	11,5	108	52,6	58,5	111	
2,6	3,2	123	10,6	6,5	61	52,6	37,6	71	
2,6	2,2	84	10,6	12,7	120	52,6	56,8	108	
2,6	3,1	119	10,6	8,2	78	52,6	55,9	106	
2,6	3,1	119	10,6	11,5	108	52,6	62,3	118	
2,6	2,7	104	10,6	9,0	85	52,6	59,9	114	
2,6	2,9	112	10,6	10,3	97	52,6	49,8	95	
2,6	2,9	112	10,6	11,6	109	52,6	50,3	114	
2,6	2,9	112	10,6	9,3	88	52,6	47,3	90	
2,6	2,5	96	10,6	9,0	85	52,6	45,9	87	
2,6	2,9	112	10,6	11,8	111	52,6	56,1	107	
2,6	2,7	104	10,6	6,6	62	52,6	37,2	71	
2,6	3,0	115	10,6	12,1	114	52,6	62,6	119	
2,6	2,3	88	10,6	9,2	87	52,6	60,6	115	
2,6	3,1	120	10,6	12,2	115	52,6	51,4	98	
2,6	2,0	77	10,6	12,2	115	52,6	57,8	110	
Exactitud media		108				94			102

Tabla 4.6.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del clempenterol en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado y diez de orina.

<b>Clempenterol</b>									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
4,9	5,4	111	24,5	20,1	82	98	101,9	104	
4,9	5,1	105	24,5	24,0	98	98	73,5	75	
4,9	4,0	82	24,5	28,7	117	98	102,9	105	
4,9	4,1	84	24,5	27,9	114	98	73,5	75	
4,9	4,7	95	24,5	24,5	100	98	72,5	74	
4,9	4,3	87	24,5	20,1	82	98	87,2	89	
4,9	5,0	103	24,5	21,1	86	98	94,1	96	
4,9	3,4	69	24,5	21,8	89	98	83,3	85	
4,9	3,8	77	24,5	18,9	77	98	84,3	86	
4,9	4,2	85	24,5	18,4	75	98	100,9	103	
4,9	4,4	89	24,5	19,1	78	98	103,9	106	
4,9	5,4	111	24,5	24,0	98	98	107,8	110	
4,9	5,1	105	24,5	24,5	100	98	107,8	110	
4,9	5,2	107	24,5	23,5	96	98	87,2	89	
4,9	5,3	109	24,5	21,3	87	98	94,1	96	
4,9	5,6	114	24,5	23,3	95	98	90,2	92	
4,9	5,8	118	24,5	20,6	84	98	91,1	93	
4,9	4,2	85	24,5	21,1	86	98	102,9	105	
4,9	4,7	96	24,5	24,5	100	98	100,0	102	
4,9	4,6	93	24,5	16,7	68	98	86,2	88	
Exactitud media		96				88			

Tabla 4.7.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del brombuterol en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado y diez de orina.

<b>Brombuterol</b>									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
4,8	4,9	102	24	20,4	85	96	73,9	77	
4,8	5,0	105	24	20,2	84	96	72,0	75	
4,8	5,1	106	24	24,5	102	96	73,0	76	
4,8	5,2	108	24	24,7	103	96	71,0	74	
4,8	4,8	99	24	23,5	98	96	82,6	86	
4,8	4,5	93	24	22,8	95	96	85,4	89	
4,8	4,2	88	24	23,0	96	96	91,2	95	
4,8	3,6	75	24	22,3	93	96	96,0	100	
4,8	3,6	74	24	17,8	74	96	97,9	102	
4,8	3,5	72	24	18,0	75	96	98,9	103	
4,8	4,6	96	24	17,5	73	96	100,8	105	
4,8	3,9	82	24	16,3	68	96	103,7	108	
4,8	4,9	102	24	23,0	96	96	95,0	99	
4,8	4,9	103	24	25,2	105	96	91,2	95	
4,8	5,2	109	24	24,7	103	96	94,1	98	
4,8	5,4	113	24	26,4	110	96	93,1	97	
4,8	4,3	89	24	27,4	114	96	92,2	96	
4,8	4,6	96	24	27,6	115	96	99,8	104	
4,8	4,5	94	24	26,9	112	96	97,9	102	
4,8	4,6	95	24	28,6	119	96	103,7	108	
Exactitud media		95				96			

Tabla 4.8.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del hidroxiclembuterol en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado y diez de orina.

<b>Hidroxiclembuterol</b>									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
5,1	5,8	113	25,5	29,1	114	102	90,8	89	
5,1	5,8	114	25,5	28,6	112	102	89,8	88	
5,1	6,0	117	25,5	28,8	113	102	87,7	86	
5,1	6,0	118	25,5	21,7	85	102	101,0	99	
5,1	5,9	115	25,5	22,2	87	102	104,0	102	
5,1	5,1	100	25,5	22,7	89	102	105,1	103	
5,1	4,5	89	25,5	25,2	99	102	90,8	89	
5,1	4,9	96	25,5	24,7	97	102	106,1	104	
5,1	5,9	115	25,5	21,2	83	102	76,5	75	
5,1	5,8	113	25,5	20,7	81	102	77,5	76	
5,1	5,2	102	25,5	21,7	85	102	85,7	84	
5,1	5,1	100	25,5	22,7	89	102	97,9	96	
5,1	5,4	105	25,5	21,9	86	102	94,9	93	
5,1	4,9	96	25,5	22,7	89	102	93,8	92	
5,1	4,8	95	25,5	25,5	100	102	91,8	90	
5,1	4,7	93	25,5	29,3	115	102	96,9	95	
5,1	5,0	98	25,5	28,6	112	102	104,0	102	
5,1	4,3	85	25,5	28,8	113	102	105,1	103	
5,1	3,9	77	25,5	29,8	117	102	107,1	105	
5,1	3,5	69	25,5	29,1	114	102	100,0	98	
Exactitud media		100				99			

Tabla 4.9.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del mabuterol en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado y diez de orina.

<b>Mabuterol</b>									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
5,0	4,3	85	25	22,0	88	100	72,1	72	
5,0	4,3	86	25	24,0	96	100	78,4	78	
5,0	4,4	87	25	23,3	93	100	96,3	96	
5,0	4,5	89	25	24,5	98	100	98,1	98	
5,0	4,8	96	25	23,8	95	100	85,2	85	
5,0	5,1	102	25	23,5	94	100	86,0	86	
5,0	5,7	114	25	28,0	112	100	95,3	95	
5,0	5,8	115	25	27,5	110	100	94,4	94	
5,0	5,1	102	25	26,3	105	100	78,5	78	
5,0	5,2	103	25	29,5	118	100	89,2	89	
5,0	5,7	114	25	29,8	119	100	96,1	96	
5,0	5,6	112	25	29,5	118	100	95,2	95	
5,0	6,0	120	25	18,8	75	100	103,0	103	
5,0	5,7	114	25	19,0	76	100	97,3	97	
5,0	5,8	116	25	18,3	73	100	106,2	106	
5,0	5,8	115	25	23,8	95	100	110,4	110	
5,0	5,7	114	25	21,3	85	100	109,3	109	
5,0	4,3	85	25	21,5	86	100	93,1	93	
5,0	4,5	89	25	20,3	81	100	72,0	72	
5,0	4,8	95	25	20,8	83	100	77,1	77	
Exactitud media		102				95			



Tabla 4.10.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del mapenterol en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado y diez de orina.

<b>Mapenterol</b>									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
4,9	5,7	117	24,5	27,9	114	98	85,3	87	
4,9	5,9	120	24,5	28,2	115	98	86,2	88	
4,9	5,7	116	24,5	28,4	116	98	94,1	96	
4,9	5,8	118	24,5	28,7	117	98	93,1	95	
4,9	5,7	116	24,5	20,8	85	98	91,1	93	
4,9	5,6	115	24,5	20,6	84	98	100,0	102	
4,9	4,4	89	24,5	21,1	86	98	100,9	103	
4,9	3,6	73	24,5	23,3	95	98	102,9	105	
4,9	4,2	85	24,5	23,0	94	98	104,9	107	
4,9	4,4	89	24,5	23,8	97	98	101,9	104	
4,9	4,1	83	24,5	22,8	93	98	84,3	86	
4,9	4,4	89	24,5	21,1	86	98	80,4	82	
4,9	4,2	85	24,5	20,8	85	98	97,0	99	
4,9	4,1	83	24,5	21,8	89	98	98,0	100	
4,9	5,0	103	24,5	21,1	86	98	94,1	96	
4,9	5,4	111	24,5	24,3	99	98	96,0	98	
4,9	5,5	113	24,5	25,2	103	98	97,0	99	
4,9	5,6	114	24,5	27,9	114	98	104,9	107	
4,9	5,8	119	24,5	25,0	102	98	105,8	108	
4,9	4,1	83	24,5	24,5	100	98	86,2	88	
Exactitud media		101				98			

En todos los niveles ensayados se cumple el criterio de aceptación establecido en el procedimiento para la validación de métodos analíticos. Para fracciones de masa inferiores a 1  $\mu\text{g/Kg}$  en muestra (50 ng/mL en extracto) el valor de la exactitud debe estar comprendido en el intervalo [50 – 120 %] y para fracciones entre 1 y 10  $\mu\text{g/Kg}$  en muestra (entre 50 ng/mL y 500 ng/mL en extracto) en el intervalo [70 – 110 %].

El criterio de aceptación para el control de calidad interno es un valor de exactitud comprendido en el intervalo [50 – 120 %] en el límite inferior del intervalo de trabajo (nivel 2) en todos los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

La eficacia del método se comprueba, cada vez que se realiza este procedimiento, a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra enriquecida en el nivel 2.

#### **1.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio**

Para determinar la precisión se toman los datos de las *exactitudes obtenidas* en 20 muestras (10 de orina y 10 de hígado) enriquecidas para cada nivel de calibración y realizadas por los dos operadores. Se calcula la desviación típica (s) y el coeficiente de variación (C.V) para los veinte datos de cada nivel de calibración. El coeficiente de variación permite evaluar la precisión del método analítico en cada nivel de concentración.

Los coeficientes de variación obtenidos, que se muestran en la tabla 4.11, para cada nivel de concentración se consideran adecuados y aceptables, teniendo en cuenta los criterios de aceptación del apartado 1 de material y métodos, donde haciendo referencia a la Decisión 657/2002/CE, se indica que para fracciones de masa en muestra de 100  $\mu\text{g/Kg}$  el C.V debe ser igual o menor a 23. Y en este caso, las concentraciones estudiadas en muestra, no supera en ninguno de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos los valores de 2  $\mu\text{g/Kg}$  para hígado y 2  $\mu\text{g/L}$  para orina, por tanto, los valores de C.V deben ser lo más bajos posible.

Tabla 4.11.- Desviación típica, media de las exactitudes obtenidas y el coeficiente de variación (C.V) en cada uno de los niveles de adición de cada analito.

Nivel	Analito	s (n=20)	Exactitud media (%)	C.V (%)
2	Clembuterol	13	108	12
4	Clembuterol	14	94	15
6	Clembuterol	14	102	14
2	Clempenterol	14	96	14
4	Clempenterol	13	88	15
6	Clempenterol	11	94	12
2	Brombuterol	12	95	13
4	Brombuterol	15	96	16
6	Brombuterol	11	94	12
2	Hidroxiclembuterol	13	100	14
4	Hidroxiclembuterol	13	99	14
6	Hidroxiclembuterol	9	93	10
2	Mabuterol	12	102	12
4	Mabuterol	14	95	15
6	Mabuterol	12	91	13
2	Mapenterol	16	101	16
4	Mapenterol	11	98	12
6	Mapenterol	7	97	8

### 1.5. Límite de decisión ( $CC\alpha$ )

La determinación de los límites de decisión ( $CC\alpha$ ) para estos analitos se ha realizado de forma experimental, ya que es una de las opciones que se contempla en el apartado 1 de material y métodos, para la determinación de dicho límite en métodos para la determinación de sustancias sin LMR y cuantitativos.

Se inyectaron soluciones patrón de los diferentes analitos en concentraciones decrecientes en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> para valorar la respuesta obtenida. Posteriormente, se adicionaron las muestras blanco en niveles crecientes,

y en pequeños incrementos, hasta que se llegó a una concentración que nos permitió identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

En el caso del clenbuterol, se comprobó experimentalmente adicionando sobre 3 blancos de matriz (hígado y orina) la concentración en muestra más baja, que en un principio permitía identificar el analito, que era la de 0,05 µg/Kg en hígado y 0,05 µg/l en orina. Se comprobó que en las tres repeticiones en cada matriz se identificaba correctamente el analito (según los criterios descritos en la tabla 3.10 del apartado 2 de material y métodos).

Para aceptar ese nivel como CC $\alpha$  del clenbuterol se repitió la adición sobre blancos de matriz, a ese nivel de concentración, 7 veces más por cada matriz investigada. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia del analito, por tanto, ese valor de concentración corresponde al límite de decisión del clenbuterol.

En el resto de los analitos, con respuesta instrumental muy similar entre ellos, se comprobó experimentalmente adicionando sobre 3 blancos de matriz (hígado y orina) la concentración en muestra más baja, que en un principio permitía identificar los analitos, que era la de 0,10 µg/kg en hígado y 0,10 µg/l en orina. Se comprobó que en las tres repeticiones en cada matriz se identificaba correctamente los analitos con los criterios del apartado B del punto 2.1.5. del capítulo de material y métodos.

Para aceptar ese nivel como CC $\alpha$  del clenbuterol, brombuterol, hidroxiclembuterol, mabuterol y mapenterol, se repitió la adición sobre blancos de matriz, a ese nivel de concentración, 7 veces más por cada matriz investigada. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia de los analitos, por tanto, ese valor de concentración corresponde al límite de decisión de los citados agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

### 1.6. Capacidad de detección (CC $\beta$ )

El cálculo de la capacidad de detección se ha realizado de forma experimental. Se han analizado 20 muestras adicionadas al nivel del CC $\alpha$  de las sustancias (10 en orina y 10 en hígado). La capacidad de detección es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar (s), en valor de concentración en muestra, de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido en esas 20 muestras.

En la tabla 4.12 se resume el cálculo para la determinación de la capacidad de detección (CC $\beta$ ) y se muestran los valores aceptados de CC $\alpha$  para cada uno de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Tabla 4.12.- Resumen del cálculo de la capacidad de detección para los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos analizados que es igual a la desviación estándar del límite de decisión (CC $\alpha$ ) por 1,64 más la concentración del límite de decisión (CC $\alpha$ ).

Analito	s del CC $\alpha$ x 1,64	+ CC $\alpha$ analito	CC $\beta$ ( $\mu\text{g/Kg o L}$ )
Clembuterol	0,01	0,05	0,06
Clempenterol	0,03	0,10	0,13
Brombuterol	0,03	0,10	0,13
Hidroxiclembuterol	0,03	0,10	0,13
Mabuterol	0,03	0,10	0,13
Mapenterol	0,04	0,10	0,14

Uno de los objetivos de este estudio era realizar, si era posible, ejercicios de intercomparación con los métodos validados, en este caso con el método para la determinación de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

Este método de ensayo al entrar a formar parte de la cartera de servicios de un laboratorio acreditado por ENAC, debe de estar validado, pero además como indica la Norma ISO 17025 en el apartado h) de requisitos técnicos debe tener procedimientos de control de calidad para comprobar su validez.

Así pues, a parte del control de calidad interno que se realiza en cada secuencia de trabajo, el laboratorio participa en ejercicios interlaboratorio para la determinación de estas sustancias a través de organizadores de reconocido prestigio internacional, como son FAPAS® (Reino Unido) y PROGETTO TRIESTE® (Italia).

Estos organizadores remiten al laboratorio su cartera con los ejercicios que van a realizar a lo largo del año, en ella se detallan los analitos o grupo de analitos y matrices. El laboratorio se inscribe en aquellos ejercicios que de acuerdo con su propia cartera de servicios puede realizar.

Estos ejercicios consisten en el envío de un material o muestra con una cantidad conocida (por parte del organizador) de las sustancias a analizar, que el laboratorio debe analizar y comunicar, en un plazo de tiempo determinado, un resultado con la concentración de dicha sustancia en ese material. Tras la recepción de todos los resultados de todos los laboratorios, el organizador realiza una evaluación completa y remite a cada laboratorio un informe completo con su propia evaluación y la del resto de laboratorios, manteniendo siempre confidencialidad absoluta con los nombres de los participantes.

Para la evaluación de los participantes se suele usar el parámetro *z-score* que es el resultado de restar al resultado emitido por el participante el valor asignado por el organizador dividido por la desviación estándar del valor asignado.

Según el valor del *z-score* se evalúa el resultado emitido por el laboratorio. El valor del *z-score* se obtiene tras el cálculo del cociente entre la diferencia entre el resultado del laboratorio y el valor asignado por el organizador, y la desviación estándar del valor asignado. Si el *z-score* es menor de  $\pm 2$  el resultado es satisfactorio, si esta entre  $\pm 2$  y  $\pm 3$  el resultado es cuestionable y si es mayor de  $\pm 3$  es insatisfactorio.

Tras recibir esta evaluación, el laboratorio debe realizar su propia valoración del ejercicio y en caso de un resultado cuestionable o insatisfactorio, debe averiguar las posibles causas y tomar las acciones correctoras y preventivas oportunas.

La determinación de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos es una determinación de gran importancia y preocupación en la Unión Europea, por ello los citados organizadores de estos ejercicios siempre contemplan en su programa anual algún ejercicio para su determinación en orina o en hígado. En estos ejercicios participan muchos laboratorios de varios países de la Unión Europea.

En la tabla 4.13 se muestran los resultados de los interlaboratorios realizados por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV) con el método de ensayo para la determinación de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos descrito en este estudio, durante su puesta a punto, validación y tras su inclusión en el alcance de acreditación del laboratorio.

La participación en 9 ejercicios interlaboratorio con resultados satisfactorios en todos ellos, menos en uno que es cuestionable con un Z-score de 2,1 (debido a que la cantidad asignada estaba por encima del rango de concentraciones de trabajo de éste método), avala la validez de este método para su uso en el LSPV.

Tabla 4.13.- Resultados de los interlaboratorios de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos.

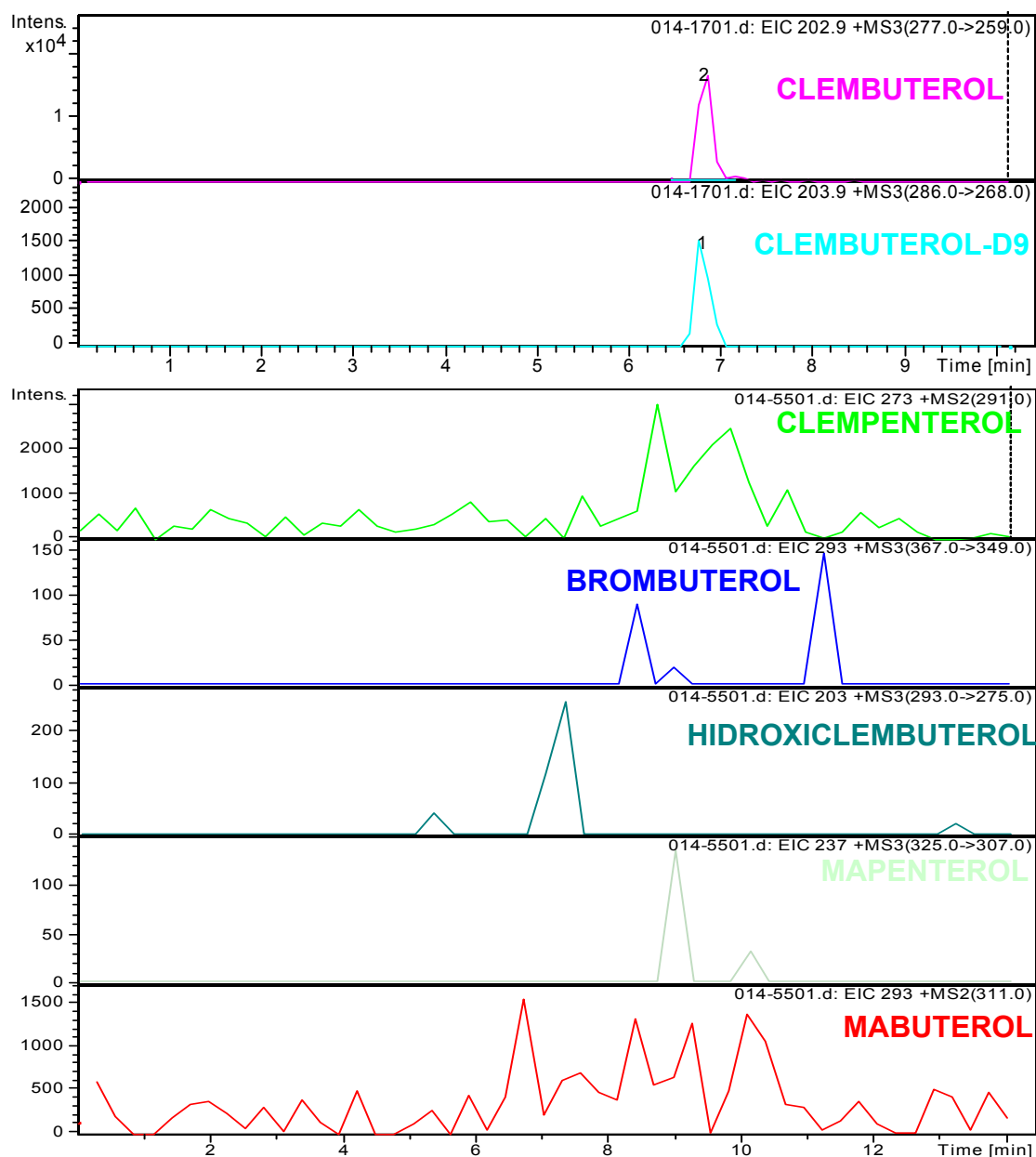
Organi- zador	Fecha	Analito	Matriz	Resultado	Valor	Z-score	% satisfacto- rios en el ejercicio
				LSPV ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	asignado ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )		
FAPAS	ENE05	CLEMB	H	<0,05	Ausencia	N.A	N.A
FAPAS	JUL05	CLEMB	H	4,99	3,80	1,3	81%
FAPAS	SEP05	CLEMB	O	7,66	5,23	2,1	63%
PROG.T	ABR06	CLEMB	O	1,69	1,72	-0,04	90%
PROG.T	ABR06	CLEMB	O	<0,05	Ausencia	N.A	N.A
PROG.T	OCT06	CLEMB	H	3,82	3,33	0,39	85%
PROG.T	OCT06	CLEMB	H	3,56	3,33	0,18	85%
FAPAS	MAY07	CLEMB	H	1,87	1,93	-0,1	90%
		CLEMP		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		BROMB		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		HCLEMB		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		MAPENT		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		MABUTE		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
FAPAS	DIC07	CLEMB	H	1,07	1,07	0,0	79%
		CLEMP		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		BROMB		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		HCLEMB		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		MAPENT		<0,10	Ausencia	N.A	N.A
		MABUTE		<0,10	Ausencia	N.A	N.A

H: hígado, O: orina, N.A: no aplica.

A continuación en la figura 4.6, se muestra los cromatogramas correspondientes al ejercicio FAPAS<sup>®</sup> realizado en mayo de 2007, donde se obtuvo como resultado satisfactorio 1,87  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de clenbuterol y menor del CC $\alpha$  para el resto de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (0,10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).



Fig. 4.6.- Cromatogramas de un hígado de porcino enviado por FAPAS® para el análisis de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos (EIC 203 m/z **clenbuterol**, EIC 204 m/z **clenbuterol-D9**, EIC 273 m/z **clempenterol**, EIC 293 m/z **brombuterol**, EIC 203 m/z **hidroxiclembuterol**, EIC 237 m/z **mapenterol** y EIC 293 m/z **mabuterol**).



Así pues, se ha conseguido poner a punto y validar un método para la determinación de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en hígado y orina de origen animal. El método ha resultado ser altamente sensible con CC $\alpha$  muy bajos (entre 0,05 y 0,10 ppb) para todos los analitos. Por ello, este método es capaz de detectar estas sustancias a pesar de que se hayan tenido en cuenta periodos de supresión tras su

administración. Además, el método es cuantitativo y de identificación inequívoca de las sustancias analizadas, con al menos 4 puntos de identificación para cada una de ellas.

Asimismo el método analítico se ha validado según el procedimiento de validación de métodos analíticos de residuos de medicamentos veterinarios desarrollado en el apartado 1 de material y métodos. El método se aplicó a varias muestras de hígado y orina y no se encontraron interferencias en los tiempos de retención de todos los analitos analizados. Con un total de diez curvas instrumentales realizadas por operadores diferentes y en distintos días, se han determinado unos intervalos de aceptación de la pendiente y de la ordenada en el origen para cada analito. Las exactitudes medias obtenidas para cada analito en todos los niveles de concentración, así como la reproducibilidad intralaboratorio (medida como coeficiente de variación) cumplen con los requisitos de validación de la Decisión 657/2002/CEE.

La comprobación de que este método es apto para el uso previsto, control cuantitativo de residuos de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos, se ha realizado mediante la participación en ejercicios de intercomparación, obteniendo valoración satisfactoria en todos los ejercicios con valores asignados dentro del rango de concentración de la curva de calibrado de este método.

## **2. DETERMINACIÓN DE CLORANFENICOL POR HPLC-MS<sup>n</sup>.**

El reglamento nº 2377/90 del Consejo otorga al cloranfenicol la calificación de sustancia prohibida para la cual no puede establecerse un LMR. Dada la importancia que la Unión Europea establece a esta sustancia, los países miembros priorizan sus actividades de control de residuos en alimentos de origen animal en esta sustancia.

Pero es a partir de la publicación de la Decisiones 657/2002/CEE y la 181/2003/CEE, cuando se exige unos requisitos mínimos de funcionamiento de los métodos analíticos y el establecimiento de MRPL para el cloranfenicol en distintas matrices.

Con estas decisiones y reglamento, los laboratorios de control oficial, saben de la importancia del cloranfenicol y de los requisitos mínimos de los métodos analíticos para su determinación.

Uno de los objetivos de este estudio es elaborar un método para la determinación de cloranfenicol en matrices como tejido animal (músculo, riñón y productos de acuicultura) huevos, ovoproductos, leche y miel, con un límite de decisión o CC $\alpha$  menor o igual al MRPL establecido en la Decisión 181/2003/CEE (0,3  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).

En las referencias bibliográficas se encuentran pocos métodos (53) que usen la misma extracción y purificación para todas las matrices. Esta circunstancia indica que son matrices muy diferentes para poder tratarlas del mismo modo para obtener una correcta cuantificación y detección del cloranfenicol.

Así pues, los experimentos de extracción y purificación se centraron en aquellas matrices que son solubles en agua como la miel y aquellas como la leche y los huevos (batido)/ovoproductos que están en estado líquido.

Se probaron, con la muestra en estado líquido y homogeneizado, extracciones orgánicas con diferentes disolventes (acetato de etilo (54,55) y acetonitrilo-cloroformo (53)) y no se obtuvieron resultados satisfactorios. Los resultados que se obtuvieron añadiendo un tampón fosfato pH 10, que ajusta la muestra en un pH entre 7 y 7,5, para realizar una posterior purificación mediante extracción en fase sólida (EFS) con C<sub>18</sub> fueron mejores. De este modo se ahorra el tiempo de la fase de evaporación del disolvente orgánico que hubiera sido usado para la extracción del analito. Al estar la muestra en estado acuoso y tamponada se usa la EFS con C<sub>18</sub> para retener mejor el cloranfenicol y conseguir separarlo de las impurezas de la matriz.

El disolvente orgánico usado en el lavado y elución de la columna C<sub>18</sub> elegido en primera instancia fue el metanol, al 100% en la elución, con el fin de evaporarlo en esta última fase para luego reconstituirlo e inyectarlo directamente en el equipo

HPLC-MS<sup>n</sup>. De este modo la respuesta instrumental del analito observada era muy baja respecto a esa misma concentración de patrón disuelto en fase móvil. Se debía averiguar si era debido a una mala extracción del cloranfenicol en el C<sub>18</sub>, o bien si era debido al efecto de supresión iónica, debido a algunos componentes de las matrices investigadas.

Adicionando patrón sobre extractos blancos purificados con el C<sub>18</sub> y comparándolos con solución patrón de la misma concentración, se observó una disminución del 70% de la señal del cloranfenicol en los extractos adicionados respecto a la solución patrón de la misma concentración. Con este experimento se evidenció el importante efecto de la supresión iónica en estas matrices, que indica que el extracto debe seguir purificándose para que con este método se pueda alcanzar el MRPL de esta sustancia.

Como consecuencia de este último experimento, se decidió cambiar el lavado y la elución de la EFS con C<sub>18</sub>, dejando el metanol para usar acetonitrilo mezclado con agua (56), que debido a su mayor fuerza electrópica puede combinarse con agua para la elución. Con el fin de no tener que evaporar el eluato y realizar sobre él re-extracciones líquido-líquido (L-L) con acetato de etilo. Previamente se había comprobado la capacidad de este disolvente para extraer el cloranfenicol, de una solución acuosa con pH neutro, de forma bastante específica.

Con estas extracciones L-L, se consiguió desplazar a las sustancias que producían la supresión iónica y se obtuvieron resultados muy satisfactorios para las matrices de miel y leche. En cambio, para el huevo y ovoproductos, no fueron suficientes todos estos procesos de extracción y purificación para poder alcanzar la sensibilidad necesaria para tener un CC<sub>α</sub> menor o igual que el MRPL establecido. No obstante debían seguir realizándose pruebas para la determinación de cloranfenicol en tejido animal que se hicieron conjuntamente con huevos y ovoproductos para conseguir mejores procesados para su análisis.

En este punto de la investigación se obtuvo un método optimizado para la determinación de cloranfenicol en leche y miel, que podía comenzar a validarse. Para el resto de matrices que faltaban, se realizaron pequeñas modificaciones al

método optimizado para leche y miel. Así pues, se probó un tampón fosfato pH 7 (56) para realizar la extracción acuosa y pasar el sobrenadante por el C<sub>18</sub>, este sobrenadante resultó ser muy espeso y era muy costoso hacerlo pasar por la columna de EFS.

Varios autores (50,52) describían la extracción orgánica como la ideal para realizar sobre tejido. Se probó añadir acetato de etilo junto con sulfato sódico para disminuir la humedad de la muestra al mínimo. Tras la evaporación del acetato de etilo, se reconstituyó en diclorometano y se purificó por EFS de sílice.

A continuación, se decidió realizar más purificaciones mediante extracciones L-L con acetato de etilo, ya que al igual que la leche y miel la purificación con la EFS no era suficiente para disminuir la supresión iónica. Este método de extracción y purificación resultó ser el de elección para las matrices de tejido animal (músculo, riñón y productos de acuicultura), huevos y ovoproductos, llegándose a alcanzar la sensibilidad requerida.

En cuanto a la optimización de las condiciones cromatográficas y del detector de masas para el cloranfenicol, se encontró una dificultad añadida; en la bibliografía, no se encontraban referencias a la determinación de cloranfenicol mediante HPLC asociado a un detector de masas de tipo trampa iónica. Se realizaron infusiones en la fuente de ionización de la trampa de iones de soluciones patrón disueltas en diferentes fases móviles. La respuesta instrumental obtenida con las fases móviles ácidas usando ácido fórmico 0,1% (53,54) no eran muy abundantes en modo electropray positivo (ESI +) ni lógicamente en ESI negativo.

Sí la molécula ioniza bien en modo negativo es más interesante trabajar en ESI negativo, ya que las sustancias en solución, que acompañan a la muestra, se suelen ionizar en menor manera que en modo positivo por lo que aportan menos ruido de fondo en los cromatogramas, pudiéndose obtener más sensibilidad del equipo para las sustancias a investigar.

Se observó abundancia del ion negativo del cloranfenicol (321 m/z), por ello se intentó maximizar este estado de ionización mediante la composición de la fase

móvil. Se probó acetato amónico (50,55) junto con acetonitrilo y también agua y acetonitrilo (56). Con ambas se obtuvieron buenos resultados, pero se seleccionó por comodidad, el agua junto al acetonitrilo como componentes de la fase móvil.

Sólo se han podido realizar experimentos de MS<sup>2</sup> con la fragmentación del cloranfenicol en la trampa de iones. Ninguno de los iones hijo obtenidos del ion molecular 321 m/z se podía volver a fragmentar dando iones nieto con suficiente intensidad que permitieran identificar la molécula a las concentraciones en torno al MRPL exigido para el cloranfenicol.

La Decisión 657/2002/CEE establece que para sustancias del grupo A, como el cloranfenicol, los métodos analíticos deben aportar como mínimo 4 puntos de identificación (IPs), que en el caso de espectrometría de masas de baja resolución (ej.: trampa de iones, triple cuadrupolo, etc.) corresponden a un punto para cada ion precursor y 1,5 puntos por cada ion de transición o hijo. Con el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> usado en este estudio para el cloranfenicol, se han obtenido 3 iones hijo (152, 194, 257 m/z) que junto con el ion molecular o precursor (321 m/z) suman 5,5 puntos de identificación.

Para la separación cromatográfica se probaron columnas cromatográficas C<sub>18</sub> mencionadas en la bibliografía (53,55) pero finalmente la C<sub>8</sub> Hypurity de Thermo<sup>®</sup> permitió una elución para el cloranfenicol rápida, pero separada suficientemente del frente de elución, sin interferencias y sin usar gradiente.

### **2.1. Determinación de cloranfenicol en leche y miel por HPLC-MS<sup>n</sup>**

En las figuras 4.7 y 4.8 se muestran los cromatogramas de una muestra blanca de miel y de leche respectivamente, en ellas se observan los cromatogramas extraídos (EIC) del ion hijo del cloranfenicol (257 m/z) y del ion hijo del cloranfenicol-D5 usado como patrón interno (262 m/z). Se destaca en el EIC 257 m/z la ausencia de señal en el tiempo de retención o señal menor del 15% del área del límite de decisión o CC<sub>α</sub> del cloranfenicol en ambas matrices, demostrándose la especificidad del método.

Fig. 4.7.- Cromatogramas de un blanco de miel para cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).

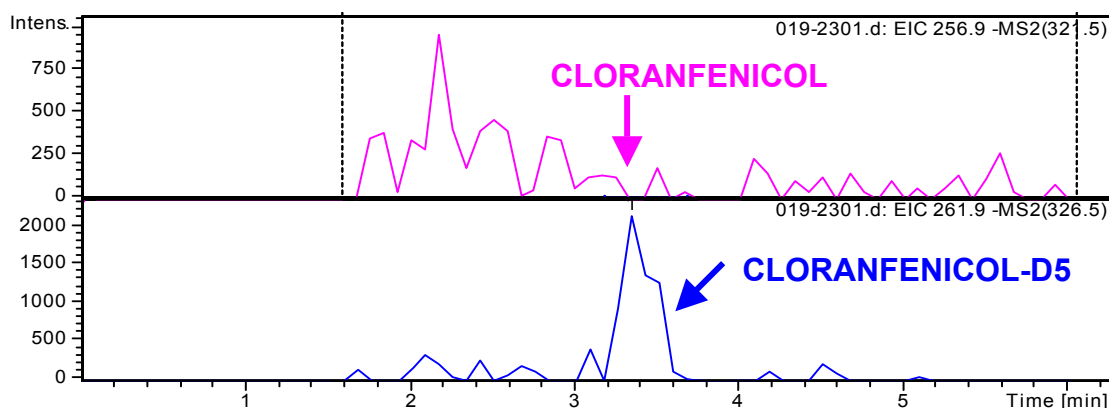
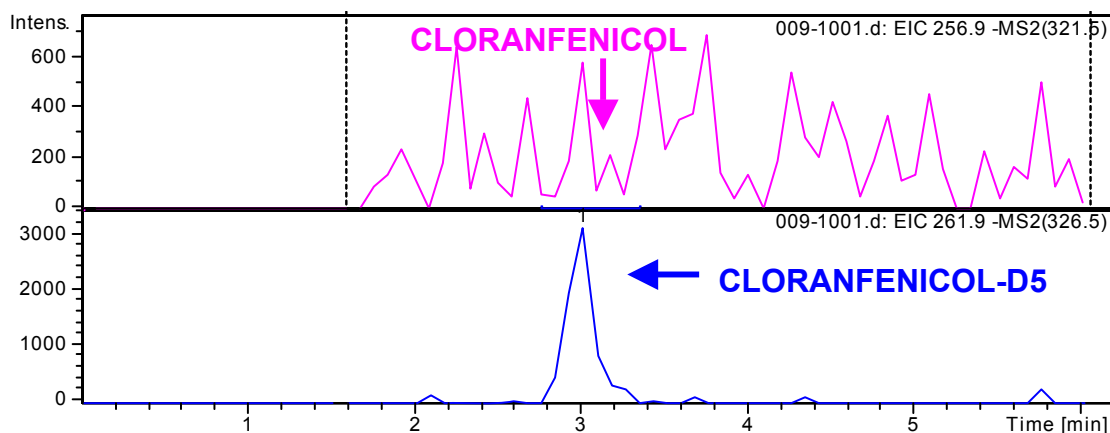


Fig. 4.8.- Cromatogramas de un blanco de leche para cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).



En la figura 4.9 se muestra el cromatograma del ion usado en la cuantificación del cloranfenicol de una muestra de leche adicionada con cloranfenicol. En la figura 4.10 se puede observar el espectro de masas del pico del cloranfenicol de la figura 4.9 con los tres iones hijos característicos. Son los iones hijos descritos en el capítulo de material y métodos en la tabla 3.13.

Fig. 4.9.- Cromatogramas de una leche adicionada con cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).

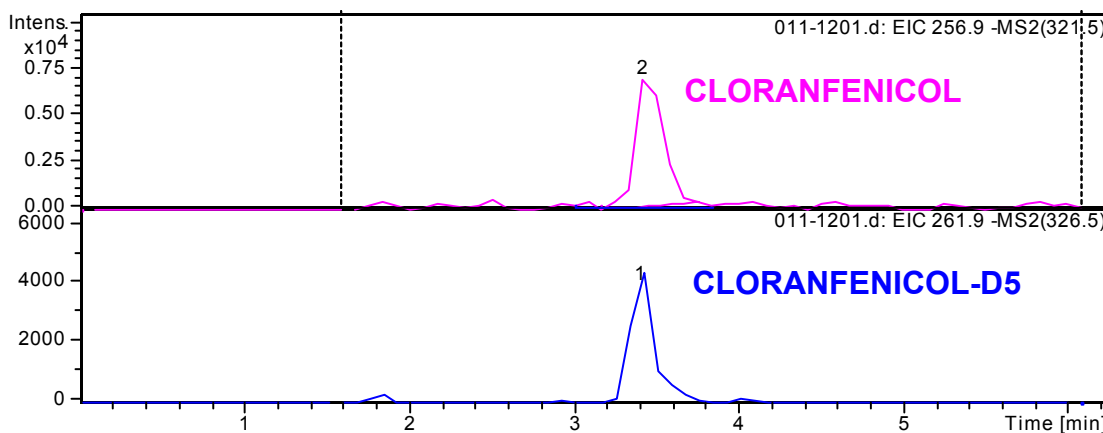
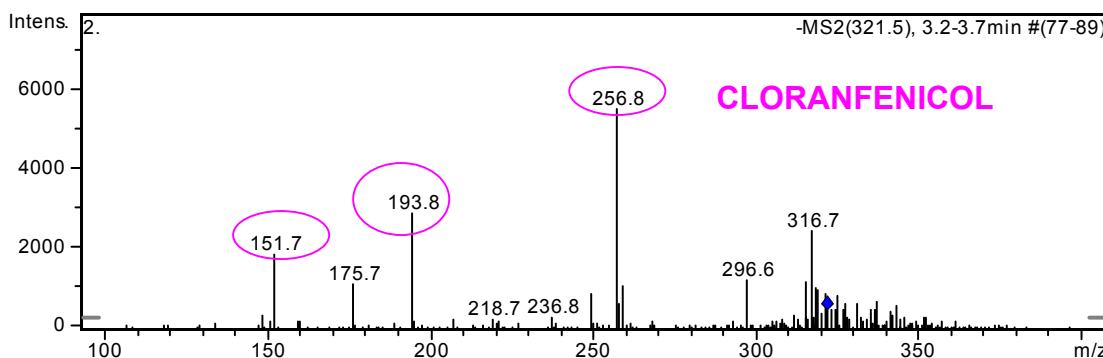


Fig. 4.10.- Espectro de masas del cloranfenicol de la figura 4.9.



En las figuras 4.11 y 4.12 se muestran los cromatogramas de una muestra de miel y de una muestra de leche adicionada al CC $\alpha$  del cloranfenicol (0,30  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para miel y de 0,15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para leche). La figura 4.13 muestra el espectro de masas del cloranfenicol en ese nivel de concentración y se comprueba, que a pesar de la baja concentración de analito, están presentes todos los iones hijos.



Fig. 4.11.- Cromatogramas de una miel adicionada con cloranfenicol al CC $\alpha$  (0,30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).

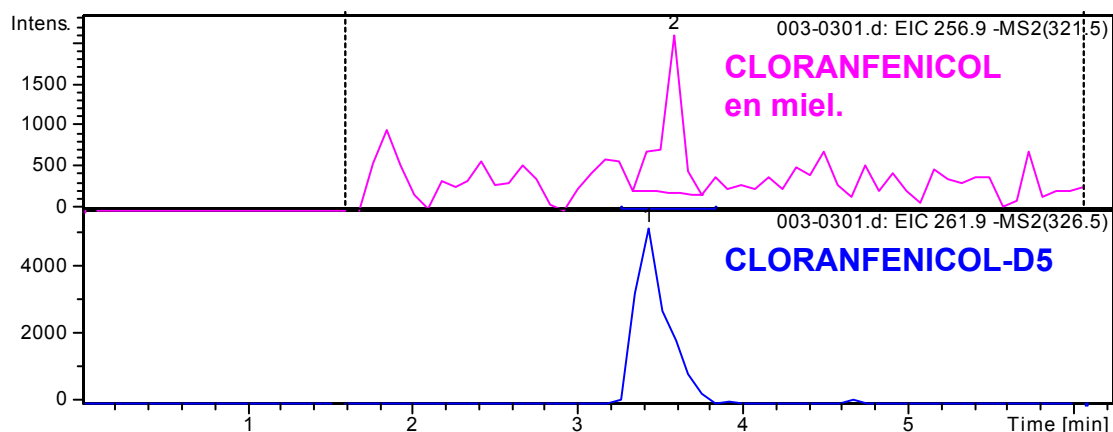
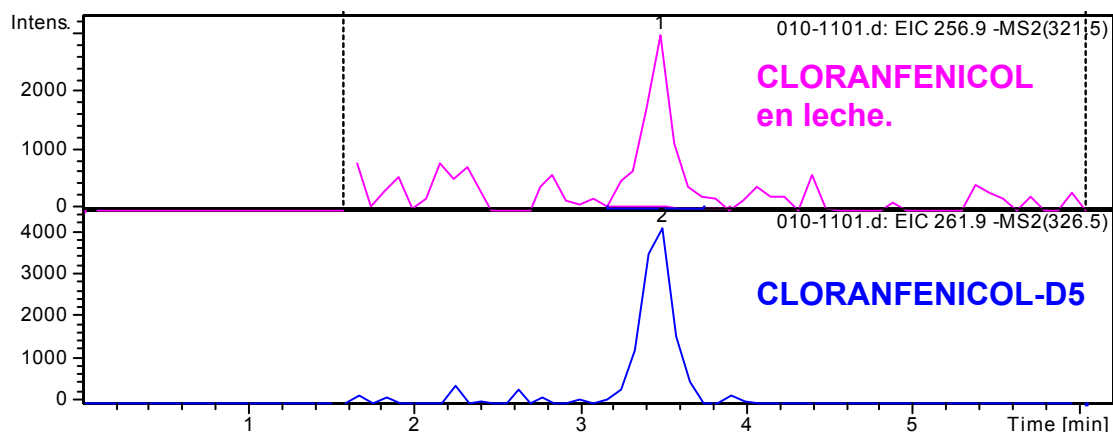


Fig. 4.12.- Cromatogramas de una leche adicionada con cloranfenicol al CC $\alpha$  (0,15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).

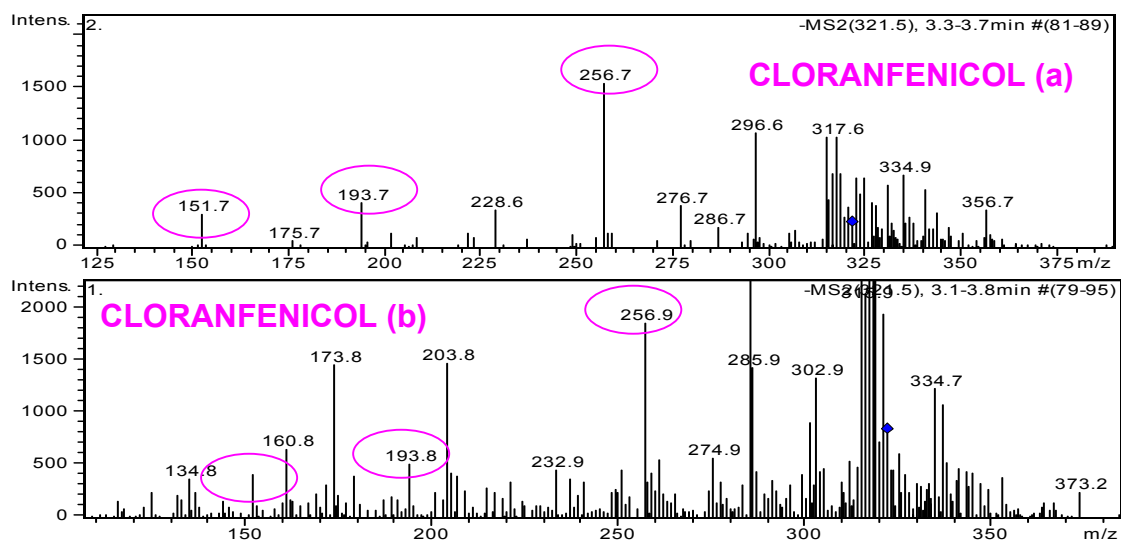


La validación se ha realizado atendiendo a las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, tal y como se ha descrito en el capítulo de material y métodos en el apartado 1 donde se describe el procedimiento para la validación de los métodos analíticos.

El ensayo ha sido validado tal y como se describe el punto 1.3.2 del citado apartado, para sustancias que no tienen límite máximo de residuo (LMR) y se van a

analizar con un método cuantitativo. Las matrices utilizadas en la validación han sido: leche y miel. Así pues, los parámetros determinados son:

Fig. 4.13.- Espectro de masas del cloranfenicol a nivel del CC $\alpha$  en miel (a) y en leche (b).



### 2.1.1. Selectividad/especificidad

Se utiliza el método para analizar 20 muestras (10 muestras de miel y 10 de leche) que se muestran en la tabla 4.14 y 4.15. En todas ellas, no se encuentra ninguna señal en el tiempo de retención del cloranfenicol, que suponga la identificación del mismo. Con ello se demuestra la especificidad del método para todas las especies y matrices ensayadas.

Tabla 4.14.- Muestras de leche de diferentes especies que se analizan con el método desarrollado.

Identificación muestra	Matrices	Especie
15800	Leche	Bovino
4710	Leche	Caprino
4713	Leche	Caprino
8756	Leche	Bovino
8760	Leche	Bovino
11410	Leche	Bovino
12540	Leche	Caprino
13250	Leche	Caprino
12320	Leche	Ovino
14880	Leche	Caprino

Tabla 4.15.- Muestras de miel de diferentes orígenes que se analizan con el método desarrollado.

Identificación muestra	Matrices
4686	Miel
5093	Miel
5124	Miel
5123	Miel
2749	Miel
2748	Miel
16303	Miel
16305	Miel
15747	Miel
16508	Miel

### 2.1.2 Función de respuesta instrumental

La función de respuesta instrumental se evalúa a partir de los resultados obtenidos con 18 curvas preparadas con las soluciones patrón de la curva de calibrado de la tabla 3.11 del capítulo material y métodos. Todas las curvas contienen 6 niveles de calibración (incluyendo el blanco como nivel 1), de las 18 curvas, 8 están realizadas en condiciones de reproducibilidad por el operador 1 (Francisco Moragues) y las otras 10 por el operador 2 (Carmen Igualada).

En las tabla 4.16 se muestran los datos de  $R^2$ ,  $m$  (pendiente) y  $b$  (ordenada en el origen), así como la media y la desviación estándar de  $m$  y  $b$ , de las curvas instrumentales del cloranfenicol.

Los límites de la pendiente ( $m$ ) se estiman con la ecuación 4.1. Como control de calidad interno cada vez que se realice este procedimiento se tendrá en cuenta el siguiente intervalo de aceptación de la pendiente [0,59 – 1,17].

Los límites de la ordenada en el origen ( $b$ ) se estiman con la ecuación 4.2. El intervalo de aceptación de la  $b$  es [-0,28 – 0,48].

Tabla 4.16.- Parámetros de las curvas instrumentales de cloranfenicol.

Curva	Cloranfenicol		
	$R^2$	$m$	$b$
1	0,99	0,76	0,20
2	0,98	0,74	0,50
3	0,99	0,85	-0,12
4	0,99	0,83	-0,10
5	0,99	0,81	0,16
6	0,99	0,85	-0,02
7	0,99	1,20	0,01
8	0,99	0,93	0,04
9	0,99	0,82	0,24
10	0,99	0,74	0,16
11	0,99	1,18	-0,33
12	0,99	0,86	0,10
13	0,99	0,85	-0,11
14	0,99	0,74	0,21
15	0,99	1,06	0,12
16	0,99	1,04	0,29
17	0,99	0,83	0,22
18	0,99	0,83	0,23
Media		0.885	0.101
Desviación estándar		0.143	0.190

### 2.1.3. Exactitud

Para el cálculo de la exactitud, en cada nivel de adición bajo (nivel 2), medio (nivel 4) y alto (nivel 6) se obtiene un valor de concentración obtenida (C.O) que se compara con el *valor de la concentración esperada* (C.E), tal y como se ha descrito en el apartado 1 de material y métodos.

Las adiciones se han realizado sobre siete muestras blanco de miel y sobre seis muestras blanco de leche.

Los resultados de la concentración esperada, exactitud y exactitud media obtenida para el cloranfenicol se detallan en la tabla 4.17.

En todos los niveles se cumple el criterio de aceptación establecido en el procedimiento para la validación de métodos analíticos. Para fracciones de masa

inferiores a 1  $\mu\text{g/Kg}$  en muestra (20 ng/mL en extracto de leche y 10 ng/mL en extracto de miel) es de [50 – 120 %] y para fracciones entre 1 y 10  $\mu\text{g/Kg}$  en muestra (hasta 200 ng/mL en extracto de leche y 100 ng/mL en extracto de miel) es de [70 – 110 %].

El criterio de aceptación para el control de calidad interno es una exactitud comprendida en el intervalo [50 – 120 %] en el límite inferior del intervalo de trabajo (nivel 2).

Cada vez que se realice este procedimiento se comprueba la eficacia del método a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra enriquecida en el nivel 2.

Tabla 4.17.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del cloranfenicol en cada nivel de adición sobre siete muestras blanco de miel y seis de leche.

Cloranfenicol									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
2,88	2,80	97	11,50	12,80	111	86,25	96,40	112	
2,88	3,40	118	11,50	12,80	111	86,25	66,30	77	
2,88	3,00	104	11,50	11,20	98	86,25	83,30	97	
2,88	2,70	94	11,50	10,20	89	86,25	76,70	89	
2,88	2,40	83	11,50	12,90	112	86,25	85,70	99	
2,88	1,90	66	11,50	12,80	111	86,25	83,00	96	
2,88	2,20	76	11,50	8,60	75	86,25	86,10	99	
2,88	2,80	100	11,50	12,90	112	86,25	84,90	98	
2,88	2,90	101	11,50	11,50	100	86,25	85,80	99	
2,88	2,00	70	11,50	12,70	110	86,25	93,60	108	
2,88	2,50	87	11,50	11,30	98	86,25	87,10	101	
2,88	2,30	80	11,50	11,10	96	86,25	85,40	99	
2,88	2,20	77	11,50	11,20	98	86,25	96,40	112	
Exactitud media		89				102			99

#### 2.1.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio

Para determinar la precisión se utilizan los datos de las *exactitudes obtenidas* en 13 muestras (7 de miel y 6 de leche) enriquecidas en cada nivel de calibración realizadas por los dos operadores. Se calcula la desviación típica ( $s$ ) y el coeficiente de variación (C.V) para los 13 datos de cada nivel de calibración. A través de este último (C.V) se evalúa la precisión del método analítico en cada nivel de concentración. En la tabla 4.18 se muestran los coeficientes de variación obtenidos en cada nivel de calibración.

Tabla 4.18.- Desviación típica ( $s$ ), media de las exactitudes obtenidas y el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de adición del cloranfenicol.

<b>Nivel</b>	<b>Analito</b>	<b><math>s</math> (n=13)</b>	<b>Exactitud media</b>	<b>C.V (%)</b>
2	<b>cloranfenicol</b>	14	89	16
4	<b>cloranfenicol</b>	11	102	11
6	<b>cloranfenicol</b>	9	99	9

Los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración se consideran adecuados y aceptables, teniendo en cuenta los criterios de aceptación del apartado 1 de material y métodos, donde haciendo referencia a la Decisión 657/2002/CE, se indica que para fracciones de masa en muestra de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  debe ser el C.V igual o menor a 23. Y en este caso el intervalo de concentración estudiado en muestra oscila es de [0.28 – 8.62  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ] para miel y [0.14 – 4.31  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ] para leche por lo que el C.V debe ser lo más bajo posible.

#### 2.1.5. Límite de decisión ( $CC\alpha$ )

La determinación del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) para este analito en estas dos matrices, se ha realizado de forma experimental, ya que es una de las opciones que se contempla en el apartado 1 de material y métodos, para la determinación de dicho límite en métodos para la determinación de sustancias sin LMR y cuantitativos.

Se inyectaron soluciones patrón de cloranfenicol en concentraciones decrecientes en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> para valorar la respuesta obtenida. Posteriormente, se adicionaron las muestras blanco en niveles crecientes, y en pequeños incrementos, hasta que se llegó a una concentración que nos permitió identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

En el caso del cloranfenicol en leche y miel, se comprobó experimentalmente, adicionando sobre 3 blancos de matriz (leche y miel) la concentración en muestra más baja, que en un principio permitía identificar el analito, que era la de 0,15 µg/Kg en leche (2,5 ng/mL en extracto) y 0,30 µg/Kg en miel (2,5 ng/mL en extracto). Se comprobó que en las tres repeticiones en cada matriz se identificaba correctamente el analito (según los criterios descritos en la tabla 3.10 del apartado 2 de material y métodos).

Para aceptar esos valores como CC<sub>α</sub> del cloranfenicol en esas matrices, se repitió la adición sobre blancos de matriz, a ese nivel de concentración, 7 veces más por cada matriz investigada. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia del analito, por tanto, ese valor de concentración corresponde al límite de decisión del cloranfenicol en leche y miel.

Por tanto, el método cumple el MRPL establecido por la Decisión 181/2003/CEE para el cloranfenicol al tener CC<sub>α</sub> iguales o menores a 0,30 µg/kg.

#### 2.1.6. Capacidad de detección (CC<sub>β</sub>)

El cálculo de la capacidad de detección se ha realizado de forma experimental. Se han analizado 20 muestras adicionadas al nivel del CC<sub>α</sub> de la sustancia (10 en miel y 10 en leche). La capacidad de detección es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar (s), en valor de concentración en muestra, de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido en esas 20 muestras.

En la tabla 4.19 se resume el cálculo para la determinación de la capacidad de detección del cloranfenicol en ambas matrices y se muestran los valores aceptados de CC<sub>α</sub> para cada una de las matrices.

Tabla 4.19.- Resumen del cálculo de la capacidad de detección para el cloranfenicol en leche y en miel que es igual a la desviación estándar del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) por 1,64 más la concentración del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) ( $\mu\text{g/Kg}$ ).

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>s del <math>CC\alpha</math> x 1,64</b>	<b>+ <math>CC\alpha</math> analito</b>	<b><math>CC\beta</math> (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>
Cloranfenicol	Miel	0,06	0,30	0,36
	Leche	0,03	0,15	0,18

La determinación del cloranfenicol es una determinación de gran importancia y preocupación en la Unión Europea, ya que se trata de una sustancia prohibida expresamente en el Anexo IV del Reglamento nº 2377/90 en varias matrices. Además posee un MRPL (límite mínimo de funcionamiento exigido) de 0,30  $\mu\text{g/Kg}$  en todas las matrices según la Decisión de la Comisión 181/2003/CEE, por ello los organizadores de los ejercicios de intercomparación con el fin de que los laboratorios comprueben que cuantifican dicha sustancia en concentraciones próximas a ese límite, siempre incluyen en su programa anual algún ejercicio para la determinación de cloranfenicol en cualquiera de las matrices legisladas (leche, miel, tejido animal, huevos y ovoproductos).

En la tabla 4.20 se muestran los resultados de los interlaboratorios realizados por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV) con el método de ensayo para la determinación de cloranfenicol en leche y miel descrito en este estudio, durante su puesta a punto, validación y tras su inclusión en el alcance de acreditación del laboratorio.

La participación en estos 5 ejercicios interlaboratorio con resultados satisfactorios en todos ellos, garantiza la validez de éste método para su uso en el LSPV.



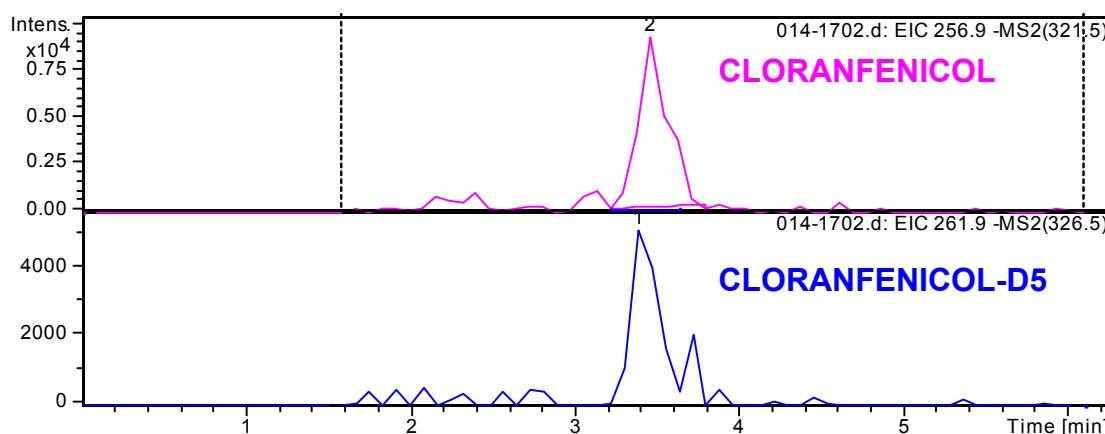
Tabla 4.20.- Resultados de los interlaboratorios de cloranfenicol en leche y miel.

Organi- zador	Fecha	Analito	Matriz	Resultado	Valor	Z-score	% satisfactorios en el ejercicio
				LSPV (µg/Kg)	asignado (µg/Kg)		
FAPAS	FEB05	CAP	M	0,35	0,54	-1,6	84%
FAPAS	NOV05	CAP	M	1,19	1,06	0,40	75%
FAPAS	MAR07	CAP	L	1,30	1,39	-0,1	83%
FAPAS	SEP07	CAP	M	0,91	0,96	0,2	88%
FAPAS	DIC 07	CAP	L	0,86	1,11	-1,0	92%

CAP: cloranfenicol, M: miel, L: leche.

En la figura 4.14 se muestran los cromatogramas correspondientes al ejercicio FAPAS<sup>®</sup> realizado en septiembre de 2007, donde se obtuvo como resultado satisfactorio 0,91 µg/kg.

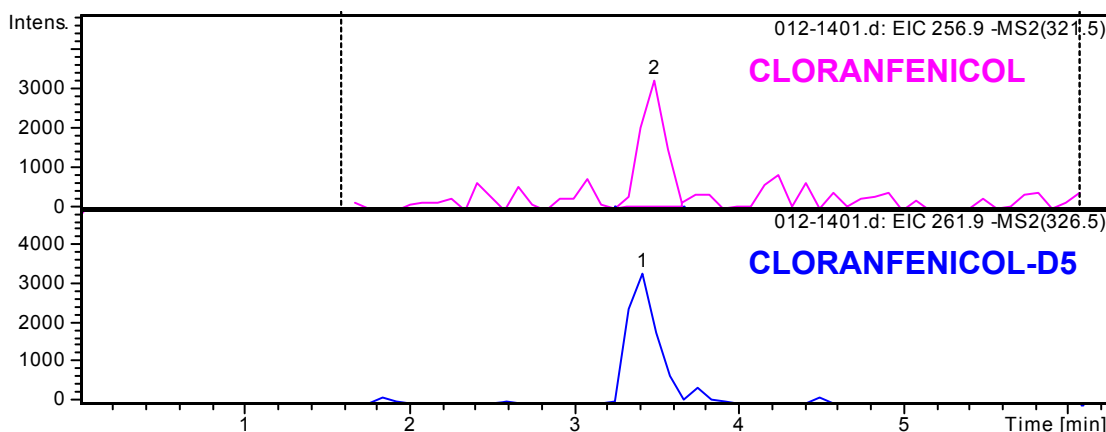
Fig. 4.14.- Cromatogramas de una miel enviada por FAPAS<sup>®</sup> para el análisis de cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).



Durante la validación y tras la inclusión de este ensayo en el alcance de la acreditación del LSPV, se ha realizado el control oficial de este residuo en leche y miel de la Comunidad Valenciana y de otras comunidades que han solicitado la

colaboración del LSPV para la realización del análisis. La figura 4.15 muestra los cromatogramas de una muestra oficial de leche que resultó ser no conforme por la presencia de cloranfenicol en una concentración de 0,26 µg/Kg.

Fig. 4.15.- Cromatogramas de una leche no conforme para cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).



Así pues, se ha conseguido poner a punto y validar un método para la determinación de cloranfenicol en leche y miel. Este método ha resultado ser un método sensible con CC $\alpha$  muy bajos (0,15 µg/Kg para leche y 0,30 µg/Kg para miel), que hacen a este método capaz de detectar el cloranfenicol a concentraciones menores, iguales y superiores al MRPL publicado en la Decisión 181/2003/CEE (0,30 µg/Kg en ambas matrices) para esta sustancia.

El método es cuantitativo y de identificación inequívoca del cloranfenicol, con 5,5 puntos de identificación. Por lo que supera en 1,5 puntos las especificaciones de identificación requeridas para las sustancias del grupo A.

El presente método se ha validado según el procedimiento de validación de ensayos para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios desarrollado en el apartado 1 de material y métodos. El método se aplicó a varias muestras de leche y miel y no se encontraron interferencias en los tiempos de retención del cloranfenicol. Se han elaborado dieciocho curvas instrumentales realizadas por operadores diferentes y en distintos días y se han determinado los intervalos de aceptación de la pendiente y de la ordenada en el origen para el control de calidad

interno. Las exactitudes medias obtenidas en cada nivel de calibración, así como la reproducibilidad intralaboratorio (medida como coeficiente de variación) cumplen con los requisitos de validación de la Decisión 657/2002/CEE.

La comprobación de que este método es apto para el uso previsto, determinación cuantitativa de cloranfenicol en leche y miel, se ha realizado mediante la participación en ejercicios de intercomparación, obteniendo valoración satisfactoria en todos los ejercicios. Además, se ha podido comprobar su efectividad para el control oficial de sustancias prohibidas, al obtener muestras no conformes procedentes del muestreo aleatorio de los servicios de inspección veterinarios.

## 2.2. Determinación de cloranfenicol en tejido animal, huevos y ovoproductos por HPLC-MS<sup>n</sup>

En las figuras 4.16 y 4.17 se muestran los cromatogramas de una muestra blanca de músculo de pollo y de huevo respectivamente, en ellas se observa en los cromatogramas extraídos (EIC) del ion hijo del cloranfenicol (257 m/z) la ausencia de señal en el tiempo de retención del cloranfenicol en ambas matrices, demostrándose la especificidad del método. Se puede ver en ambos cromatogramas el EIC 262 m/z que corresponde al ion hijo del cloranfenicol-D5.

Fig. 4.16.- Cromatogramas de un blanco de músculo de pollo para cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 2619 m/z **cloranfenicol-D5**).

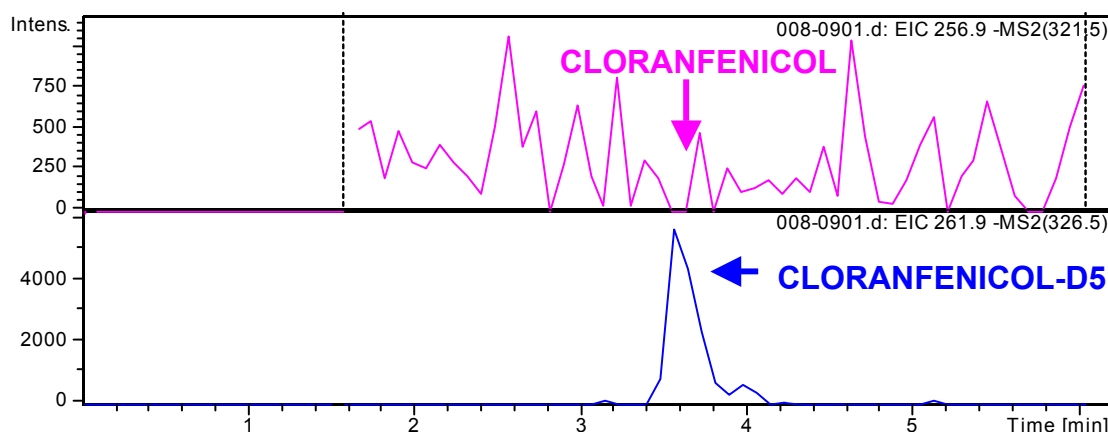
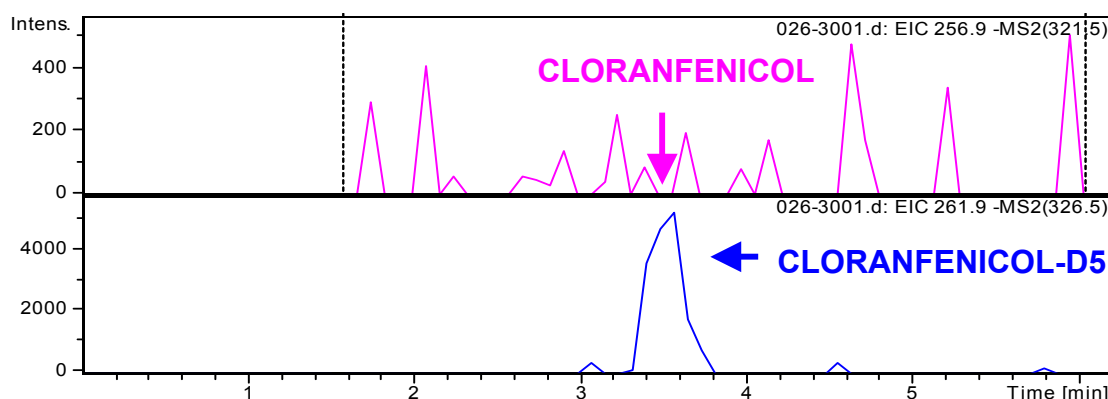


Fig. 4.17.- Cromatogramas de un blanco de huevo para cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).



En la figura 4.18 se muestra el cromatograma del ion usado en la cuantificación de una muestra de gamba adicionada con cloranfenicol. En la figura 4.19 se puede observar el espectro de masas del pico del cloranfenicol del cromatograma anterior con sus tres iones hijo característicos.

Fig. 4.18.- Cromatogramas de una gamba adicionada con cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).

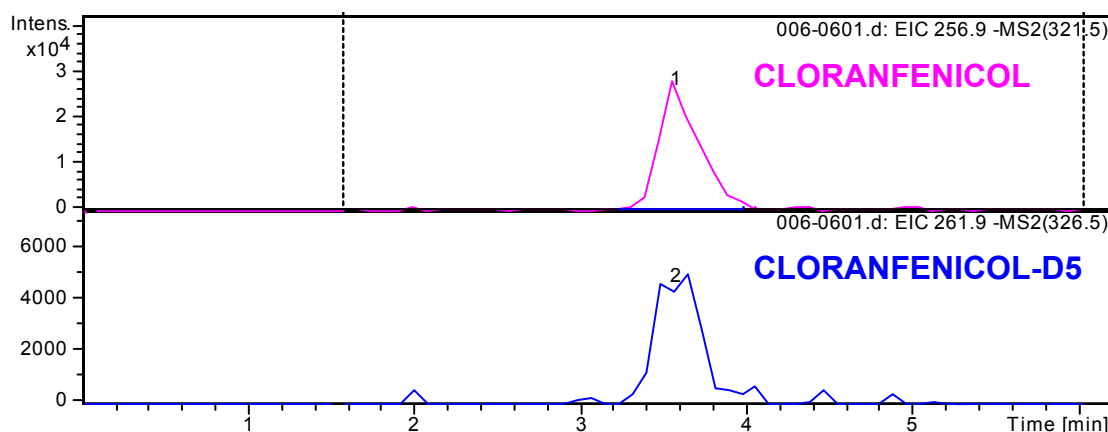
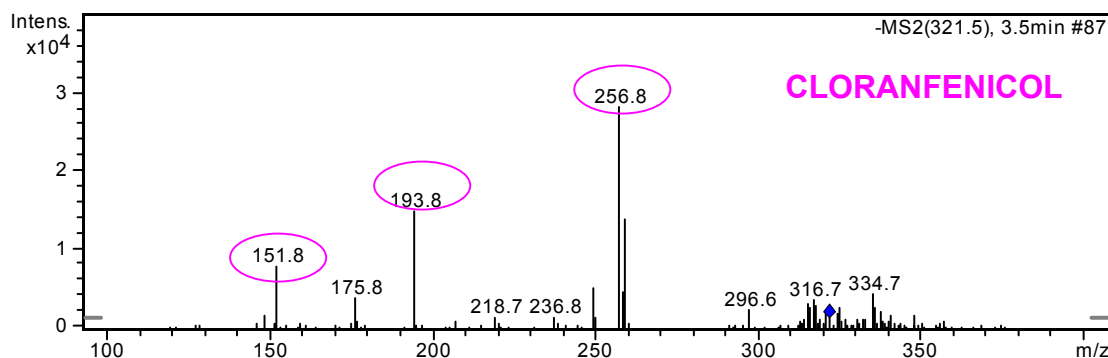


Fig. 4.19.- Espectro de masas del cloranfenicol de la figura 4.18.



En la figura 4.20 se muestran los cromatogramas de una muestra de riñón bovino adicionada al CC $\alpha$  del cloranfenicol en tejido (0,15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). La figura 4.21 muestra el espectro de masas característico del cloranfenicol del cromatograma anterior (EIC 257 m/z), con la presencia de todos los iones hijos, a pesar de la baja concentración en la que se encuentra el cloranfenicol.

Fig. 4.20.- Cromatogramas de un riñón bovino adicionado con cloranfenicol en el CC $\alpha$  (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).

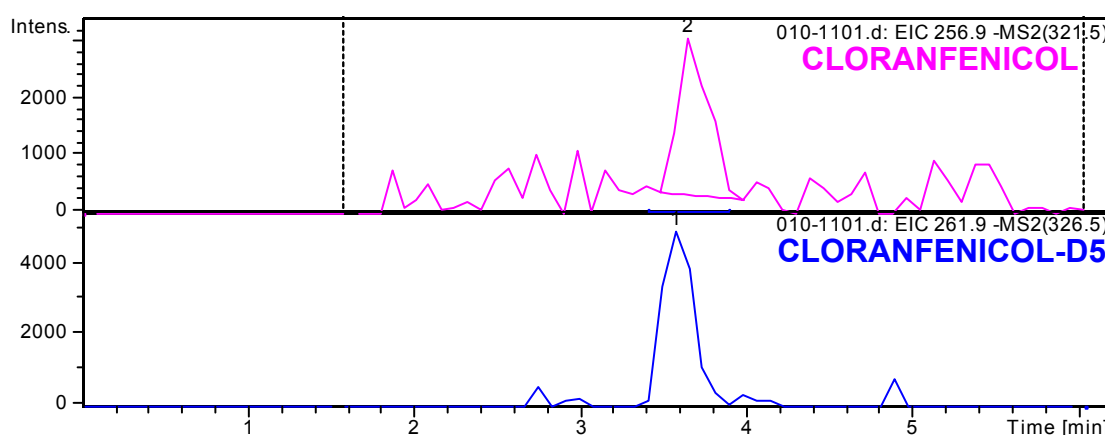
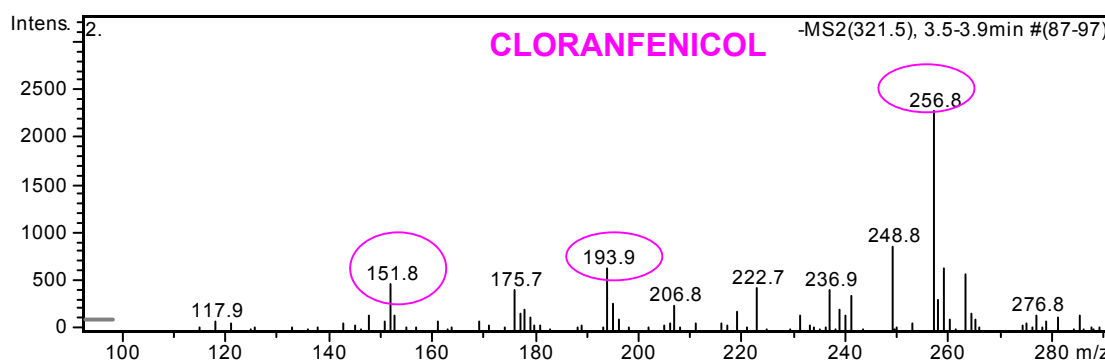


Fig. 4.21.- Espectro de masas del cloranfenicol de la figura 4.20.



La validación se ha realizado atendiendo a las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, tal y como se ha descrito en el capítulo de material y

métodos en el apartado 1 donde se describe el procedimiento para la validación de los métodos analíticos.

El ensayo ha sido validado tal y como se describe en el punto 1.3.2 del citado apartado, para sustancias que no tienen límite máximo de residuo (LMR) y se van a analizar con un método cuantitativo. Las matrices utilizadas en la validación han sido: tejido animal, huevos y ovoproductos. Así pues, los parámetros determinados son:

### 2.2.1 Selectividad/especificidad

Se utiliza el método para analizar 20 muestras de diferentes matrices y especies que se muestran en las tablas 4.21 y 4.22.

Tabla 4.21.- Muestras de tejido animal de diferentes especies que se analizan con el método desarrollado.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Matrices</b>	<b>Especie</b>
185	Riñón	Pollo
186	Riñón	Conejo
187	Músculo	Acuicultura
204	Músculo	Acuicultura
228	Músculo	Bovino
466	Músculo	Bovino
750	Riñón	Pollo
1167	Músculo	Porcino
1191	Músculo	Ovino
1198	Músculo	Acuicultura
1395	Riñón	Bovino
1513	Músculo	Porcino

En las 20 muestras, no se encuentra ninguna señal en el tiempo de retención del cloranfenicol, que suponga la identificación del mismo. Con ello se demuestra la especificidad del método para todas las especies y matrices ensayadas.

Tabla 4.22.- Muestras de huevos y ovoproductos que se analizan con el método desarrollado.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Matrices</b>	<b>Especie</b>
4679	Ovoproducto	Avícola
4680	Ovoproducto	Avícola
6501	Ovoproducto	Avícola
6502	Ovoproducto	Avícola
12600	Huevos	Avícola
12654	Huevos	Avícola
12655	Huevos	Avícola

### 2.2.2. Función de respuesta instrumental

Al tratarse del mismo analito que en el ensayo anteriormente discutido, las curvas instrumentales realizadas son las mismas que se han utilizado para analizar la función de respuesta instrumental de este ensayo, ya que el rango de concentraciones de trabajo es igual en las dos técnicas.

En el control de calidad interno los criterios de aceptación para la pendiente, ordenada en el origen y  $R^2$ , serán exactamente iguales que para el ensayo de la determinación de cloranfenicol en leche y miel.

### 2.2.3. Exactitud

Para el cálculo de la exactitud, en cada nivel de adición: bajo (nivel 2), medio (nivel 4) y alto (nivel 6) se obtiene un valor de concentración obtenida (C.O) que se compara con el valor de la concentración esperada (C.E), tal y como se ha descrito en el apartado 1 de material y métodos.

Las adiciones se han realizado sobre 17 muestras (10 de tejido y 7 de huevos y ovoproductos) realizadas por dos operadores diferentes.

Los resultados de la concentración esperada, exactitud y exactitud media obtenida para el cloranfenicol se pueden ver en la tabla 4.23.

Tabla 4.23.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del cloranfenicol en cada nivel de adición sobre siete muestras blanco de huevos y ovoproductos y diez de tejido animal.

Cloranfenicol									
Nivel 2			Nivel 4			Nivel 6			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
2,75	2,60	95	11,0	12,90	117	82,50	74,90	91	
2,75	1,70	62	11,0	8,90	81	82,50	61,40	74	
2,75	3,30	120	11,0	13,20	120	82,50	69,60	84	
2,75	1,90	70	11,0	11,50	105	82,50	73,60	89	
2,75	2,40	87	11,0	11,90	108	82,50	81,50	99	
2,75	2,40	87	11,0	12,10	110	82,50	86,90	105	
2,75	2,10	76	11,0	8,10	74	82,50	91,30	111	
2,75	3,20	116	11,0	9,30	85	82,50	50,40	61	
2,75	3,30	120	11,0	12,20	111	82,50	62,00	75	
2,75	2,50	91	11,0	10,80	98	82,50	76,00	92	
2,88	3,30	115	11,5	13,50	117	86,25	95,50	111	
2,88	2,90	101	11,5	9,70	85	86,25	78,60	91	
2,88	3,30	115	11,5	10,10	88	86,25	92,00	107	
2,88	2,50	87	11,5	12,80	111	86,25	83,30	97	
2,88	3,40	120	11,5	13,00	113	86,25	86,80	101	
2,88	2,80	100	11,5	8,20	72	86,25	82,40	96	
2,88	2,70	94	11,5	12,70	110	86,25	94,80	110	
Exactitud media		97				100			94

En todos los niveles se cumple el criterio de aceptación establecido en el procedimiento para la validación de métodos analíticos. Para fracciones de masa inferiores a 1 µg/Kg en muestra (20 ng/mL en extracto) el valor de la exactitud debe estar comprendido en el intervalo [50 – 120 %] y para fracciones de masa entre 1 y 10 µg/Kg en muestra (hasta 200 ng/mL en extracto) en el intervalo [70 – 110 %].



El criterio de aceptación para el control de calidad interno es una exactitud comprendida en el intervalo [50 – 120 %] en el límite inferior del intervalo de trabajo (nivel 2).

La eficacia del método se comprueba, cada vez que se realiza este procedimiento, a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra adicionada en el nivel 2.

#### 2.2.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio

Para determinar la precisión se toman los datos de las exactitudes obtenidas de las 17 muestras (10 de tejido y 7 de huevos y ovoproductos) enriquecidas en cada nivel de calibración realizadas por los dos operadores. Se calcula la desviación típica (s) y el coeficiente de variación (C.V) para los diecisiete datos por cada nivel de calibración. Este C.V permite evaluar la precisión del método analítico en cada nivel de concentración. En la tabla 4.24 se muestran los coeficientes de variación obtenidos en cada nivel de calibración.

Tabla 4.23.- Desviación típica (s), media de las exactitudes obtenidas y el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de adición del cloranfenicol en tejido, huevos y ovoproductos.

<b>Nivel</b>	<b>Analito</b>	<b>s (n=17)</b>	<b>Exactitud media</b>	<b>C.V (%)</b>
2	Cloranfenicol	18	97	18
4	Cloranfenicol	16	100	16
6	Cloranfenicol	15	94	15

Los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración se consideran adecuados y aceptables, teniendo en cuenta los criterios de aceptación del apartado 1 de material y métodos, donde según la Decisión 657/2002/CE, se indica que para fracciones de masa en muestra de 100 µg/Kg debe ser el C.V igual o menor a 23, y en este caso el intervalo de concentración en muestra estudiado es de [0,14 - 4,31 µg/kg] por tanto los valores de C.V deben ser los más bajos posibles.

### 2.2.5. Límite de decisión ( $CC\alpha$ )

La determinación del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) para este analito en estas tres matrices, se ha realizado de forma experimental, posibilidad que se contempla en el apartado 1 de material y métodos, para la determinación de dicho límite en métodos para la determinación de sustancias sin LMR y cuantitativos.

Se inyectaron soluciones patrón de cloranfenicol en concentraciones decrecientes en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> para valorar la respuesta obtenida. Posteriormente, se adicionaron las muestras blanco en niveles crecientes, y en pequeños incrementos, hasta que se llegó a una concentración que nos permitió identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

En el caso del cloranfenicol en tejido, huevo y ovoproductos, se comprobó experimentalmente adicionando sobre 3 grupos de tres blancos de matriz (tejido, huevo y ovoproductos) la concentración en muestra más baja, que en un principio permitía identificar el analito, que era la de 0,15  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (2,5  $\text{ng}/\text{mL}$  en extracto). Se comprobó que en las tres repeticiones en cada matriz se identificaba correctamente el analito con los criterios mostrados en la tabla 3.10 del apartado 2 de material y métodos.

Para aceptar ese valor como  $CC\alpha$  del cloranfenicol en esas matrices, se repitió la adición sobre blancos de matriz, a ese nivel de concentración, 7 veces más por cada matriz investigada. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia del analito, por tanto, ese valor de concentración corresponde al límite de decisión del cloranfenicol en tejido, huevo y ovoproductos.

Este método también cumple con la Decisión 181/2003/CEE al tener un  $CC\alpha$  menor al MRPL establecido para el cloranfenicol en estas matrices.

### 2.2.6. Capacidad de detección ( $CC\beta$ )

El cálculo de la capacidad de detección se ha realizado de forma experimental. Se han analizado 20 muestras adicionadas al nivel del  $CC\alpha$  de la sustancia (10 en tejido y 10 en huevos y ovoproductos). La capacidad de detección es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar (s), en

valor de concentración en muestra, de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido en esas 20 muestras.

En la tabla 4.24 se resume el cálculo para la determinación de la capacidad de detección del cloranfenicol en ambas matrices y se muestran los valores aceptados de CC $\alpha$  para cada una de las matrices.

Tabla 4.24.- Resumen del cálculo de la capacidad de detección para el cloranfenicol en tejido, huevos y ovoproductos que es igual a la desviación estándar del límite de decisión (CC $\alpha$ ) por 1,64 más la concentración del límite de decisión (CC $\alpha$ ) ( $\mu\text{g/Kg}$ ).

<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>s del CC<math>\alpha</math> x 1,64</b>	<b>+ CC<math>\alpha</math> analito</b>	<b>CC<math>\beta</math> (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>
Cloranfenicol	Tejido, huevos y ovoproductos	0,05	0,15	0,20

En la tabla 4.25 se muestran los resultados de los interlaboratorios realizados por el Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV) con el método de ensayo para la determinación de cloranfenicol en tejido animal, huevos y ovoproductos descrito en este estudio, durante su puesta a punto, validación y tras su inclusión en el alcance de acreditación del laboratorio.

Tabla 4.25.- Resultados de los interlaboratorios de cloranfenicol en tejido.

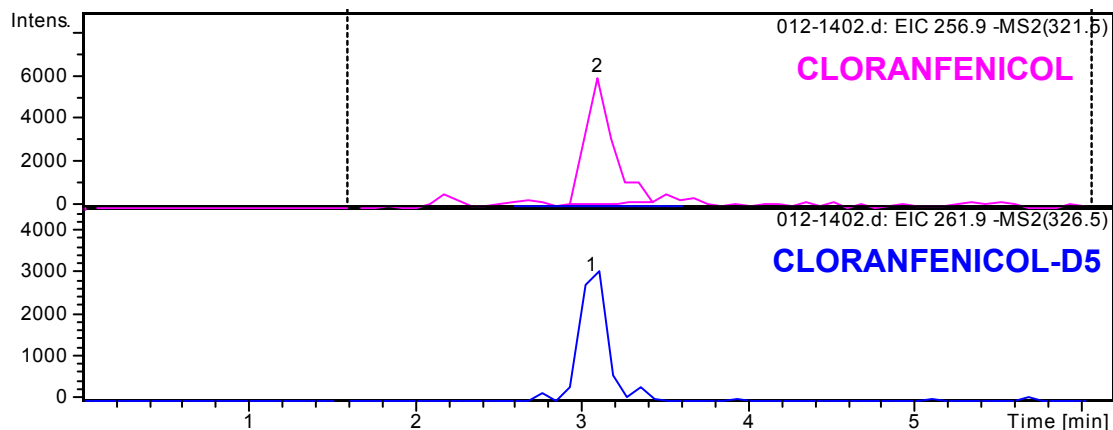
<b>Organi- zador</b>	<b>Fecha</b>	<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>Resultado LSPV (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	<b>Valor asignado (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	<b>Z-score</b>	<b>% satisfactorios en el ejercicio</b>
FAPAS	JUN05	CAP	G	1,30	1,11	0,8	77%
PROG.T	FEB07	CAP	M	0,62	0,97	-0,8	100%
FAPAS	MAR08	CAP	G	0,66	0,61	0,3	82%

CAP: cloranfenicol, G: gambas, y M: músculo.

La participación en estos 3 ejercicios interlaboratorio con resultados satisfactorios en todos ellos, garantiza la validez de este método para su uso en el LSPV.

En la figura 4.22 se muestran los cromatogramas correspondientes al último ejercicio de PROGETTO TRIESTE® realizado en febrero de 2007 donde se obtuvo como resultado satisfactorio 0,62 µg/kg de cloranfenicol.

Fig. 4.22.- Cromatogramas de un músculo de porcino enviado por PROGETTO TRIESTE® para el análisis de cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).



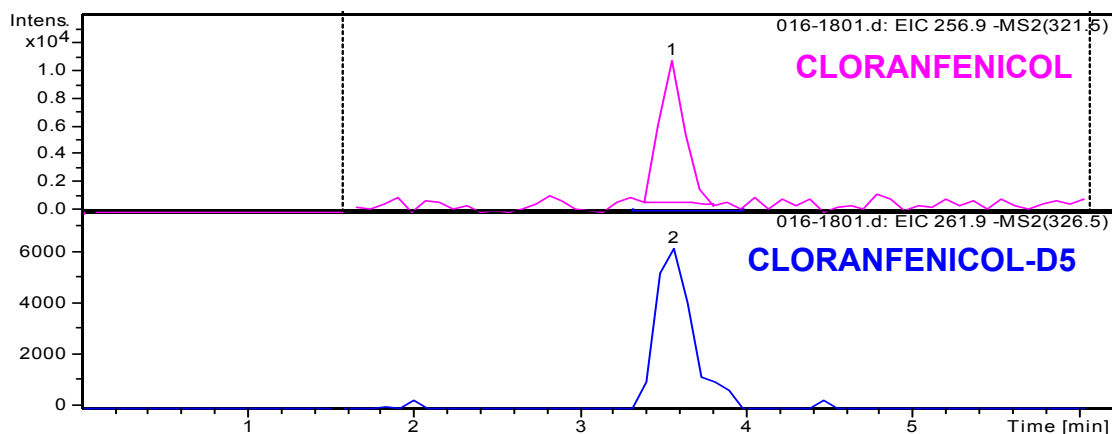
En el control oficial de este residuo en tejido en la Comunidad Valenciana se ha podido detectar la presencia de este residuo, mediante este método, en muestras de pollo tomadas por los servicios veterinarios de inspección de sanidad. La figura 4.23 muestra los cromatogramas de una muestra oficial de músculo de pollo que resultó ser no conforme por la presencia de cloranfenicol en una concentración de 0,40 µg/Kg.

Así pues, se ha conseguido poner a punto y validar un método para la determinación de cloranfenicol en tejido, huevos y ovoproductos. Este método ha resultado ser sensible con CCα muy bajos para todas las matrices (0,15 µg/Kg), que hacen a este método capaz de detectar el cloranfenicol a concentraciones menores,

iguales y mayores al MRPL publicado en la Decisión 181/2003/CEE (0,30 µg/Kg en ambas matrices) para esta sustancia.

El método es cuantitativo y de identificación inequívoca del cloranfenicol, con 5,5 puntos de identificación. Por lo que supera en 1,5 puntos las especificaciones de identificación requeridas para las sustancias del grupo A.

Fig. 4.23.- Cromatogramas de una muestra no conforme de músculo de pollo con una concentración de 0,40 µg/Kg de cloranfenicol (EIC 256,9 m/z **cloranfenicol**, EIC 261,9 m/z **cloranfenicol-D5**).



El presente método se ha validado según el procedimiento de validación de métodos analíticos de residuos de medicamentos veterinarios desarrollado en el apartado 1 de material y métodos. El método se aplicó a varias muestras de tejido (músculo y riñón) huevos y ovoproductos y no se encontraron interferencias en los tiempos de retención del cloranfenicol. Se han elaborado dieciocho curvas instrumentales realizadas por operadores diferentes y en distintos días y se han determinado los intervalos de aceptación de la pendiente y de la ordenada en el origen que sirve para el control de calidad interno en cada secuencia de trabajo. Las exactitudes medias obtenidas en cada nivel de calibración, así como la reproducibilidad intralaboratorio (medida como coeficiente de variación) cumplen con los requisitos de validación de la Decisión 657/2002/CEE.

La comprobación de que este método es apto para el uso previsto, determinación cuantitativa de cloranfenicol, se ha realizado mediante la

participación en ejercicios de intercomparación, obteniendo valoración satisfactoria en todos los ejercicios. Además, se ha podido comprobar su efectividad para el control oficial de sustancias prohibidas, al obtener muestras no conformes procedentes del muestreo aleatorio de los servicios de inspección veterinarios.

### **3. DETERMINACIÓN DE OXIFENILBUTAZONA Y FENILBUTAZONA EN ORINA ANIMAL POR HPLC-MS<sup>n</sup>.**

Ante la puesta a punto de un método de determinación de residuos de medicamentos veterinarios, pueden surgir complicaciones que dificultan el cumplimiento de los objetivos propuestos al inicio de la investigación. En el caso de los antiinflamatorios no esteroideos se sabe por la bibliografía que se eliminan en forma libre o unidos al ácido glucurónico, formando glucuroconjugados, pero se desconocía su gran capacidad de unión a las proteínas de la matriz (orina o tejido animal) cuando se añaden a ésta antes de realizarse la extracción, lo que dificultaba más su determinación.

Así pues se consigue, después de muchos intentos con tratamientos enzimáticos con distintas glucuronidasas/sulfatasas de *Helix pomatia*, un tratamiento químico hidrolítico de los compuestos glucurónidos (68,71), con el cual se obtienen mejores resultados.

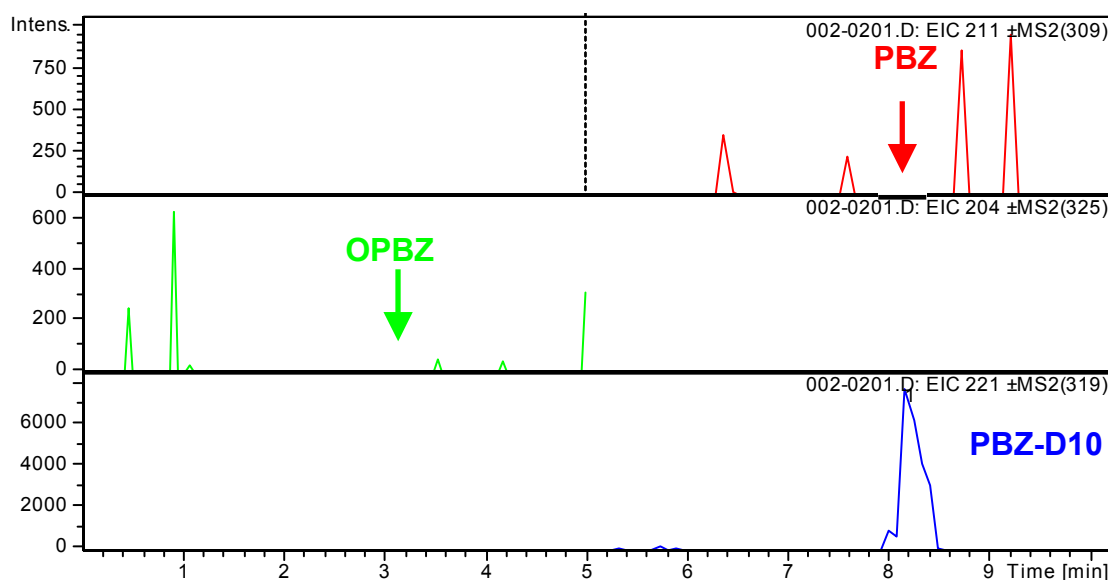
Otro punto importante del análisis es simplificar en la medida de lo posible el proceso de extracción y purificación. Inicialmente se llevaron a cabo procesos de extracción y purificación basados en la extracción en fase sólida usando C<sub>18</sub> como muchos autores proponían (68, 73-74). Al mismo tiempo se probó un método fácil y rápido de extracción líquido-líquido y se obtuvo resultados muy similares a los de la extracción en fase sólida. Por lo que se consideró esta propuesta como idónea para el método de determinación, puesto que simplifica el proceso.

Con el fin de optimizar las condiciones cromatográficas, se probaron diversas fases móviles. Se desechó el uso de ácido acético 10 mM y acetonitrilo (68,71)

debido a la formación de muchos aductos ( $[M - Na]^+$ ). Esta limitación se solucionó usando ácido fórmico 10 mM y acetonitrilo como fase móvil, que igualmente proporciona una buena separación cromatográfica y una óptima ionización.

En la figura 4.24 se muestra un cromatograma de una muestra blanca de orina de origen equino, en ella se observa en el cromatograma extraído (EIC) del ion hijo de la OPBZ (204 m/z) y en el cromatograma extraído del ion hijo de la PBZ (211 m/z) la ausencia de señal en los tiempos de retención de la OPBZ y PBZ, demostrándose la especificidad del método.

Fig. 4.24.- Cromatogramas de un blanco de orina de equino (EIC 204 m/z **OPBZ**, EIC 211 m/z **PBZ** y EIC 221 m/z **PBZ-D10**).



En la figura 4.25 se muestra un cromatograma de una muestra de orina equina enriquecida con OPBZ y PBZ. En ella se observa la buena separación cromatográfica obtenida con este método, así como la buena respuesta del equipo frente a ambas moléculas, siendo esta muy similar en cuanto al área de los picos cromatográficos.

Asimismo, en la figura 4.26 se puede observar el espectro de masas de ambas moléculas con un ion hijo mayoritario y dos menos abundantes. En el caso de la OPBZ el 204 m/z es el ion hijo mayoritario y el 120 y 160 m/z son los minoritarios

que se encuentran en una proporción específica respecto al mayoritario. El ion hijo mayoritario de la PBZ es el 211 m/z y el 120 y 160 m/z los minoritarios que también aparecen en una proporción determinada.

Fig. 4.25.- Cromatogramas de una orina de equino adicionada con OPBZ y PBZ (EIC 204 m/z **OPBZ**, EIC 211 m/z **PBZ** y EIC 221 m/z **PBZ-D10**).

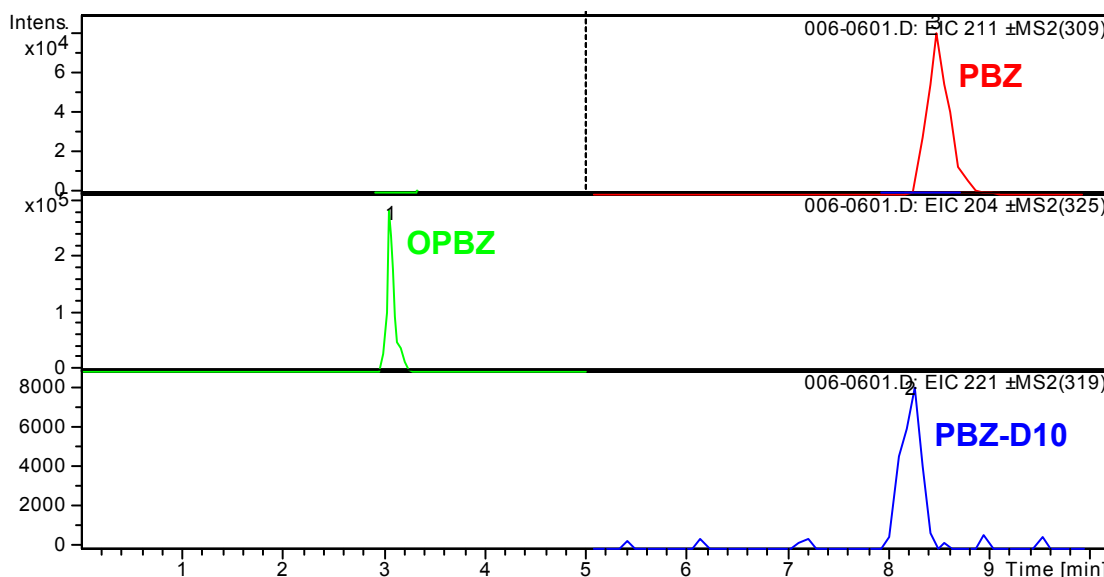
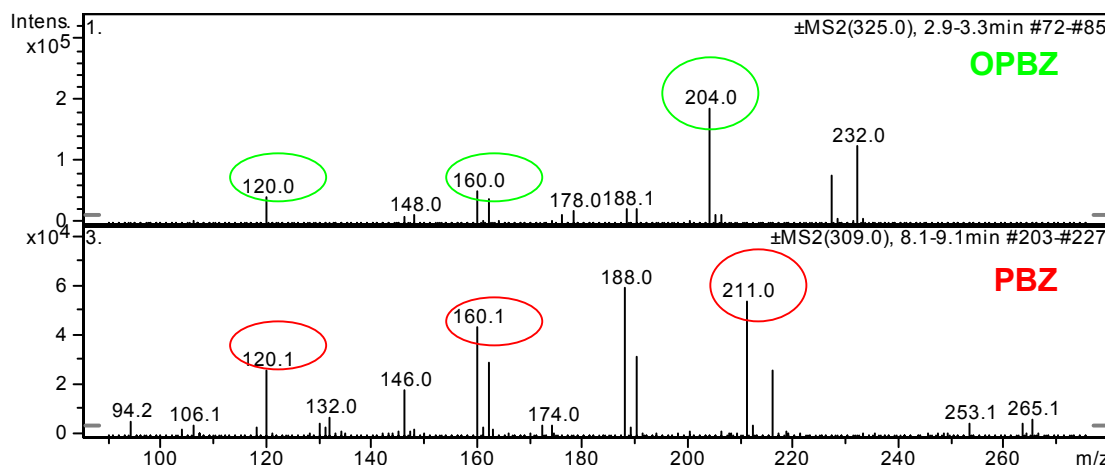


Fig. 4.26.- Espectro de masas de la OPBZ y de la PBZ.



En la figura 4.27 se muestra un cromatograma de una muestra de orina equina enriquecida en el primer nivel de la curva o CC $\alpha$  con 2,5  $\mu\text{g/L}$  de OPBZ y PBZ, en la que se observa la señal correspondiente a esa concentración y sus respectivos



espectros de masas que caracterizan a ambas moléculas se muestran en la figura 4.28.

La Decisión 657/2002/CEE establece que para sustancias del grupo B, como los AINEs, los métodos analíticos deben aportar como mínimo 3 puntos de identificación (IPs), que en el caso de espectrometría de masas de baja resolución (ej.: trampa de iones, triple cuadrupo, etc.) corresponden a un punto para cada ion precursor y 1,5 puntos por cada ion de transición o hijo. En el caso de la OPBZ y PBZ, que no tienen LMR y que la Unión Europea las considera prohibidas, a pesar de pertenecer al grupo B, sería necesario tener al menos 4 IPs, al igual que para las sustancias prohibidas.

Con el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> usado en este estudio, se han obtenido 3 iones hijo característicos de la OPBZ (204, 160, 120 m/z) y de la PBZ (211, 160, 120 m/z) que junto con el ion molecular o precursor suman 5,5 puntos de identificación.

Fig. 4.27.- Cromatogramas de una orina de equino adicionada con 2,5 µg/L de OPBZ y PBZ (EIC 204 m/z **OPBZ**, EIC 211 m/z **PBZ** y EIC 221 m/z **PBZ-D10**).

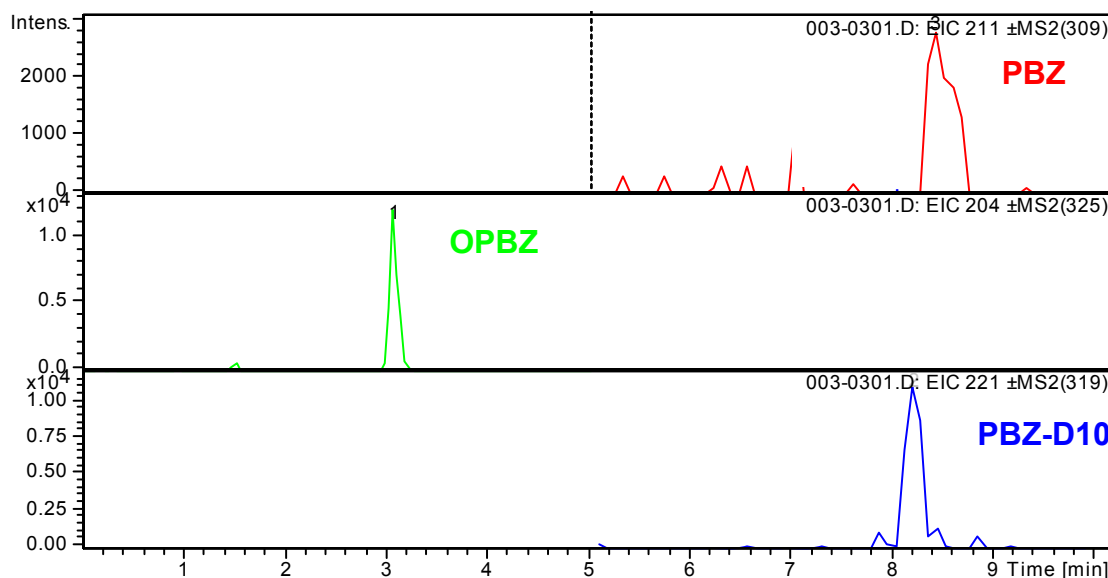
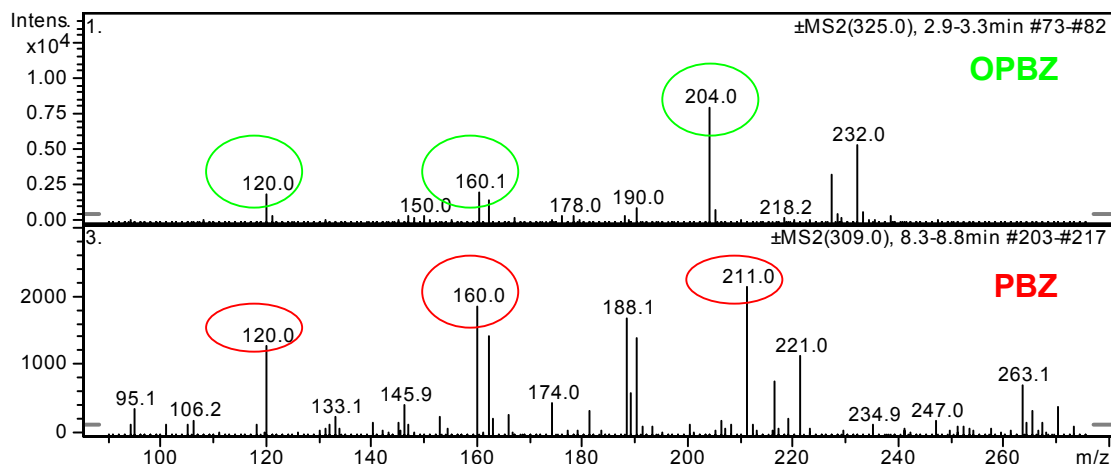


Fig. 4.28.- Espectro de masas de la OPBZ y de la PBZ de la figura 4.27.



Como se ha descrito en el capítulo material y métodos, el patrón interno (PBZ-D10) se añade a todas las muestras en una concentración de 10 ng/mL, resulta una buena herramienta para la corrección de la recuperación del analito en todo el proceso de extracción al relativizar su señal con la del analito a detectar (OPBZ y PBZ) para la cuantificación. En todas las figuras de este apartado se puede ver un cromatograma de la masa extraída 221 m/z que corresponde con el ion mayoritario de la fragmentación del ion padre 319 m/z que es el patrón interno PBZ-D10.

La validación se ha realizado atendiendo a las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, tal y como se ha descrito en el capítulo de material y métodos en el apartado 1 donde se describe el procedimiento para la validación de los métodos analíticos investigados.

El ensayo ha sido validado siguiendo el punto 1.3.2 del citado apartado, para sustancias que no tienen límite máximo de residuo (LMR) y se van a analizar con un método cuantitativo. La matriz utilizada en la validación ha sido orina de diferentes especies animales. Así pues, los parámetros determinados son:

### 3.1. Selectividad/especificidad

Se utiliza el método para analizar 20 muestras de orina de diferentes especies que se muestran en las tablas 4.26 y 4.27.

Tabla 4.26.- Muestras de orina de origen porcino y equino que se analizan con el método desarrollado.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Especie</b>
P2640	Porcino
BM C	Porcino
BM D	Porcino
BM E	Porcino
BM G	Porcino
BM I	Equino
BM K	Equino
BM L	Equino
BM M	Equino
BM P	Equino

Tabla 4.27.- Muestras de orina de origen bovino, caprino y ovino que se analizan con el método desarrollado.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Especie</b>
BM R	Bovino
BM S	Bovino
BM U	Bovino
BM W	Bovino
BM Z	Caprino
BM Ñ	Caprino
OV2141	Ovino
OV2	Ovino
OV3	Ovino
BOV2	Bovino

En todas ellas, no se encuentra ninguna señal en los tiempos de retención de la oxifenilbutazona (OPBZ) y de la fenilbutazona (PBZ). Con ello se demuestra la especificidad del método para todas las especies ensayadas.

### 3.2. Función de respuesta del método

La función respuesta del método se determina a partir de los datos obtenidos tras la inyección de 10 curvas de muestras adicionadas tal y como se describe en la tabla 3.14 del capítulo material y métodos. Todas las curvas contienen

5 niveles de calibración (incluyendo el blanco como nivel 1), de las 10 curvas 5 están realizadas por el operador 1 (Francisco Moragues) y las otras 5 por el operador 2 (Carmen Igualada).

En la tabla 4.28 se muestran los datos de  $R^2$ ,  $m$  (pendiente) y  $b$  (ordenada en el origen) así como la media y la desviación estándar de  $m$  y  $b$ , de las curvas extraídas con matriz de OPBZ y PBZ.

Tabla 4.28.- Parámetros de las curvas de matriz extraídas de OPBZ y PBZ. D.E: desviación estándar.

Curva	$R^2$	OPBZ		$R^2$	PBZ	
		$m$	$b$		$m$	$b$
1	0,988	1,272	0,996	0,998	1,690	0,036
2	0,984	0,851	0,590	0,991	1,640	-0,320
3	0,980	1,000	0,199	0,982	1,121	0,199
4	0,980	0,449	0,340	0,970	1,109	0,460
5	0,980	0,680	0,410	0,950	1,830	-0,510
6	0,998	1,830	-0,370	0,999	1,165	0,026
7	0,997	1,810	-0,015	0,997	2,150	0,008
8	0,999	1,800	-0,180	0,990	1,220	0,220
9	0,990	1,990	-0,430	0,992	2,730	-0,577
10	0,990	2,020	-0,170	0,980	1,660	-0,120
Media		1,400	0,200		1,650	0,008
D.E		0,550	0,450		0,560	0,340

Los límites de la pendiente se estiman con la ecuación 4.1 mostrada anteriormente. Como control de calidad del método cada vez que se realiza este procedimiento se tiene en cuenta el siguiente intervalo de aceptación de la pendiente: para la OPBZ [0,3 – 2,5] y para PBZ [0,51 – 2,78].

Los límites de la ordenada en el origen se estiman con la ecuación 4.2 mostrada anteriormente. El intervalo de aceptación: para la OPBZ [-0,71 – 1,11] y para la PBZ [-0,67 – 0,70].

### 3.3. Exactitud

Para el cálculo de la exactitud, en cada nivel de adición (cinco niveles) se obtiene un valor de concentración obtenida (C.O) que se compara con el *valor de la*

concentración esperada (C.E), tal y como se ha descrito en el apartado 1 de material y métodos.

Las adiciones se han realizado sobre 10 muestras de orina realizadas por dos operadores diferentes.

Los resultados de la concentración esperada en extracto, exactitud y exactitud media obtenida para la OPBZ y PBZ se detallan en las tablas 4.29 y 4.30.

Tabla 4.29.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (E. media) (%) de la OPBZ en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de orina.

<b>OPBZ</b>												
Nivel 2			Nivel 3			Nivel 4			Nivel 5			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
24,0	27,9	117	94,0	108,0	114	472,0	463,6	98	850,0	845,3	99	
24,0	20,0	83	94,0	98,0	105	472,0	446,0	95	850,0	853,2	100	
24,0	27,9	117	94,0	84,0	90	472,0	363,0	77	850,0	903,1	106	
24,0	19,4	81	94,0	94,9	101	472,0	271,4	60	850,0	828,5	98	
24,0	31,0	120	94,0	108,0	114	472,0	305,4	65	850,0	807,2	95	
24,0	22,8	96	94,0	73,0	78	472,0	445,9	95	850,0	866,5	102	
24,0	28,0	117	94,0	98,8	105	472,0	455,5	96	850,0	863,1	102	
24,0	28,0	116	94,0	73,0	78	472,0	447,3	95	850,0	863,3	102	
24,0	20,0	83	94,0	84,7	90	472,0	415,2	88	850,0	882,3	104	
24,0	28,0	116	94,0	104,0	111	472,0	394,8	83	850,0	891,3	105	
E. media		105				94				85	101	

En todos los niveles se cumple el criterio de aceptación establecido en el procedimiento para la validación de métodos analíticos.

El criterio de aceptación para el control de calidad interno es un valor de exactitud comprendido en el intervalo [60 – 120 %] en el límite inferior del intervalo de trabajo (nivel 2).

La eficacia del método se comprueba, cada vez que se realiza este procedimiento, a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra adicionada en el nivel 2.

Tabla 4.30.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (E. media) (%) de la PBZ en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de orina.

<b>PBZ</b>												
Nivel 2			Nivel 3			Nivel 4			Nivel 5			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
25,0	23,0	92	100	106,2	106	499	468,7	94	898,0	911,9	102	
25,0	23,0	92	100	64,8	65	499	414,2	83	898,0	944,1	105	
25,0	18,3	72	100	115,9	116	499	462,2	93	898,0	832,5	93	
25,0	16,7	67	100	105,0	105	499	275,0	60	898,0	811,5	90	
25,0	15,0	60	100	115,0	115	499	504,8	101	898,0	914,7	102	
25,0	18,0	72	100	96,0	96	499	526,6	106	898,0	895,1	100	
25,0	17,8	72	100	68,0	68	499	477,5	96	898,0	883,3	98	
25,0	18,0	72	100	96,0	96	499	535,2	107	898,0	913,5	102	
25,0	23,0	92	100	75,0	75	499	426,4	85	898,0	877,4	98	
25,0	25,7	103	100	105,2	105	499	384,9	77	898,0	940,2	105	
E. media		81				95				90		

### 3.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio

Para determinar la precisión se toman los datos de las *exactitudes obtenidas* en los distintos niveles de calibración de las diez curvas realizadas por los

dos operadores. Se calcula la desviación típica ( $s$ ) y el coeficiente de variación (C.V) para los diez datos de cada nivel de calibración. El C.V permite evaluar la precisión del método analítico en cada nivel de concentración. En la tabla 4.31 se muestran los coeficientes de variación obtenidos en cada nivel de calibración para los dos analitos.

Tabla 4.31.- Desviación típica ( $s$ ), media de las exactitudes obtenidas y el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de adición de OPBZ y PBZ en orina.

Nivel	Analito	$s$ (n=10)	Exactitud media	C.V (%)
2	OPBZ	18	105	17
	PBZ	15	81	19
3	OPBZ	14	94	15
	PBZ	18	95	19
4	OPBZ	14	85	17
	PBZ	15	90	17
5	OPBZ	3	101	3
	PBZ	5	99	5

En base a los criterios de aceptación del apartado 1 de material y métodos, donde, en referencia a la Decisión 657/2002/CE, se indica que para fracciones de masa en muestra de 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  debe ser el C.V igual o menor a 23, los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración se consideran adecuados y aceptables. Ya que en el intervalo de concentración estudiado en muestra [2,5 - 90  $\mu\text{g}/\text{L}$ ] para los dos analitos, en ningún caso se supera este valor de C.V.

### 3.5. Límite de decisión ( $\text{CC}\alpha$ )

La determinación del límite de decisión o  $\text{CC}\alpha$  para estos analitos en esta matriz, se ha realizado de forma experimental, posibilidad que se contempla en el apartado 1 de material y métodos, para la determinación de dicho límite en métodos para la determinación de sustancias sin LMR y cuantitativos.

Se inyectaron soluciones patrón de OPBZ y PBZ en concentraciones decrecientes en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> para valorar la respuesta obtenida. Posteriormente, se adicionaron las muestras blanco en niveles crecientes, y en pequeños incrementos, hasta que se llegó a una concentración que nos permitió identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

Se comprobó experimentalmente, adicionando sobre tres blancos de matriz la concentración más baja (2,5 µg/L (25 ng/mL en extracto)), que en un principio permitía identificar el analito. Se comprobó que en las tres repeticiones se identificaba correctamente el analito, con los criterios de la tabla 3.10 del apartado 2 de material y métodos.

Para aceptar ese valor como CC $\alpha$  de la OPBZ y PBZ en orina, se repitió siete veces más la adición sobre blancos de matriz a ese nivel de concentración. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia del analito, por tanto, ese valor de concentración corresponde al límite de decisión de ambas sustancias en orina.

### **3.6. Capacidad de detección (CC $\beta$ )**

El cálculo de la capacidad de detección se ha realizado de forma experimental. Se han analizado 20 muestras adicionadas al nivel del CC $\alpha$  de las sustancias. La capacidad de detección es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar (s), en valor de concentración en muestra, de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido en esas 20 muestras.

En la tabla 4.31 se resume el cálculo para la determinación de la capacidad de detección de la OPBZ y PBZ y se muestran los valores aceptados de CC $\alpha$  para ambas sustancias.



Tabla 4.31.- Resumen del cálculo de la capacidad de detección para la OPBZ y PBZ en orina, que es igual a la desviación estándar del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) por 1,64 más la concentración del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) ( $\mu\text{g/L}$ ).

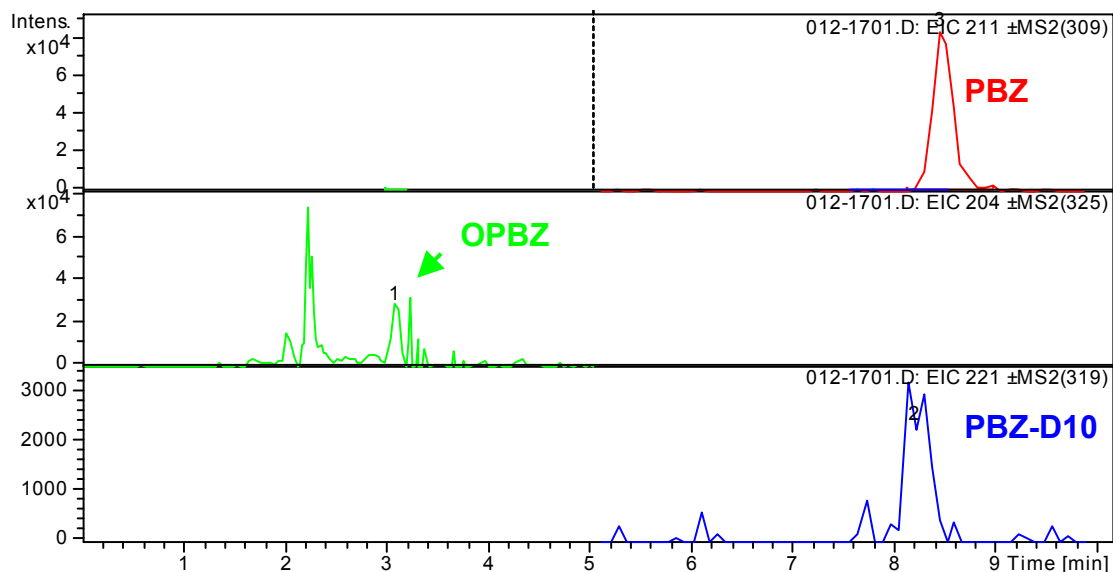
<b>Analito</b>	<b>Matriz</b>	<b>s del <math>CC\alpha</math> x 1,64</b>	<b>+ <math>CC\alpha</math> analito</b>	<b><math>CC\beta</math> (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
OPBZ	Orina	0,65	2,5	3,2
PBZ		0,62	2,5	3,1

Uno de los objetivos de este estudio era realizar un ensayo de utilidad del método, para ello es necesario obtener una muestra de orina de un animal tratado con fenilbutazona y analizarla con el método de determinación que se ha puesto a punto.

Así pues, se trató a un perro con una inyección intravenosa de 3 mg/Kg de fenilbutazona sódica (Butasyl<sup>®</sup> Forte Dodge Veterinaria S.A.). Transcurridas 36 horas del tratamiento se recolectó una muestra de orina y se analizó. En la figura 4.29 se muestra el cromatograma de la orina analizada de un animal tratado. La presencia de fenilbutazona y de la oxifenilbutazona (su metabolito activo principal) fue detectada y confirmada siendo el nivel de PBZ mayor al de la OPBZ.

Los antiinflamatorios no esteroideos son sustancias poco investigadas a nivel europeo, los laboratorios de control oficial que analizan estas sustancias en matrices de origen animal son escasos. En España, sólo el LSPV está acreditado por ENAC para la determinación de estas sustancias y su análisis sin acreditar tampoco esta muy extendido. En Europa ocurre lo mismo, por ello los organizadores de interlaboratorios, es probable, que al no tener suficiente mercado para la realización de estos ejercicios, no organicen para estas sustancias ningún tipo de ejercicio intercomparativo.

Fig. 4.29.- Cromatogramas de una orina de animal tratado con PBZ (EIC 204 m/z **OPBZ**, EIC 211 m/z **PBZ** v EIC 221 m/z **PBZ-D10**).



El presente método se ha validado según el procedimiento de validación de métodos analíticos de residuos de medicamentos veterinarios desarrollado en el apartado 1 de material y métodos. El método se aplicó a varias muestras de orina de especies diferentes y no se encontraron interferencias en los tiempos de retención de la OPBZ y PBZ. Se han elaborado de diez curvas de calibrado extraídas en matriz realizadas por operadores diferentes y en distintos días y se han determinado los intervalos de aceptación de la pendiente y de la ordenada en el origen para cada analito. Las exactitudes medias obtenidas en cada nivel de calibración, así como la reproducibilidad intralaboratorio (medida como coeficiente de variación) cumplen con los requisitos de validación de la Decisión 657/2002/CEE.

El método es cuantitativo y de identificación inequívoca de la OPBZ y PBZ, con 5,5 puntos de identificación para cada una de ellas. Por lo que supera en 1,5 puntos las especificaciones de identificación requeridas para las sustancias sin LMR del grupo B.

La comprobación de que este método es apto para el uso previsto, determinación cuantitativa de la OPBZ y PBZ, se ha realizado mediante la administración del principio activo (fenilbutazona sódica) a un animal y tras la

recolección de su orina, se ha cuantificado no sólo la concentración de la PBZ sino también la de su metabolito activo principal, la OPBZ.

#### **4. DETERMINACIÓN DE MELOXICAM, FLUNIXIN MEGLUMINE, CARPROFENO Y ÁCIDO TOLFENÁMICO EN HIGADO POR HPLC-MS<sup>n</sup>.**

Tras la validación y acreditación por ENAC del método para la determinación de OPBZ y PBZ por HPLC-MS<sup>n</sup> se requería poner a punto otro método para la determinación de AINEs en tejido animal, para así ampliar el control oficial a las especies de aves y conejos.

Se decidió cambiar de analitos ya que en tejido existían en la legislación, concretamente en el Anexo I del reglamento nº 2377/90 del Consejo, un grupo de AINEs permitidos con LMR, de esta forma, se podía realizar un control oficial sobre los residuos de estos fármacos en animales tratados legalmente y que posteriormente son sacrificados, respetando o no, el periodo de supresión del fármaco.

Las publicaciones sobre el análisis de estos analitos en tejido animal son escasas (76-78). Además, el análisis multiresiduo que se quería poner a punto no se realizaba en todos los artículos. Los analitos a investigar conjuntamente eran MLX, FLU, CPF y TOLF.

Al existir LMR en diversas matrices de tejido, como músculo o hígado, se decidió optimizar el método para una sola matriz para que resultara menos laboriosa la validación del método. La matriz elegida fue hígado, por ser un órgano que acumula en mayor concentración estos fármacos de uso veterinario.

Por los antecedentes conocidos de los AINEs (OPBZ y PBZ) se optimizó la fase de hidrólisis previa a la extracción orgánica de los analitos. Al tratarse de tejido, se debía mezclar éste con una solución, que bien mediante la adición de una enzima o por su pH bajo produjera la ruptura de los glucuroconjugados. Al igual que con la

OPBZ y PBZ en orina, se obtuvieron mejores resultados con una hidrólisis química a través de la adición de ácido clorhídrico 0,25 M, que mediante la adición de enzimas.

Para realizar la extracción orgánica sobre el extracto acuoso hidrolizado, se probaron diferentes disolventes: diclorometano, acetato de etilo y cloroformo. El más fácil de manejar, menos tóxico y que mejores resultados proporcionó, fue el acetato de etilo.

En este punto, tras la evaporación del disolvente orgánico y la redisolución en fase móvil para su inyección en el cromatógrafo, se obtenía una buena respuesta instrumental de los analitos que permitía detectar las sustancias por debajo de la mitad del LMR de cada una. Pero al procesar muchas muestras de muy variadas matrices de hígado, hubo un gran número de ellas, en que la respuesta obtenida para los analitos era muy por debajo de la esperada.

Tras comprobar por los distintos controles de calidad internos que no eran fallos debidos a la extracción u otras causas; se realizó un experimento en esas matrices para averiguar el posible efecto matriz que ocasionaba supresión iónica en el espectrómetro de masas.

Adicionando soluciones patrón sobre extractos de hígado se demostró una inhibición de la señal de un 30% que ocasionaba trastornos en la correcta cuantificación de los analitos. Este error del 30% podía producir que una muestra no conforme (concentración de analito por encima del CC $\alpha$ ) se diera como conforme al obtenerse menos señal por las características de su matriz.

Así pues, hubo que realizar un segundo paso de purificación, que mediante el protocolo de las columnas de EFS de Oasis MCX de Waters<sup>®</sup> para ácidos débiles fue suficiente para reducir ese efecto matriz.

Al existir poca bibliografía referente al análisis de estas sustancias por HPLC-MS-MS o HPLC-MS<sup>n</sup> (77-80) y reflejarse en estos artículos fuentes de ionización o interfases diferentes, se hizo una optimización de la fragmentación de estos analitos

usando las dos interfases del equipo ESI y APCI, tanto en modo positivo (+) como en modo negativo (-).

La Decisión 657/2002/CEE establece que para sustancias del grupo B, como los AINEs, los métodos analíticos deben aportar como mínimo 3 puntos de identificación (IPs), que en el caso de espectrometría de masas de baja resolución (ej.: trampa de iones, triple cuadrupolo, etc.) corresponden a un punto para cada ion precursor y 1.5 puntos por cada ion de transición o hijo. Con el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> usado en este estudio, se debe obtener un punto por el ion molecular y al menos dos iones hijo o de transición, para sumar en total 4 IPs, ya que sólo un ion hijo sería insuficiente.

La fase móvil utilizada en todos los experimentos estaba compuesta por ácido fórmico 10 mM y metanol.

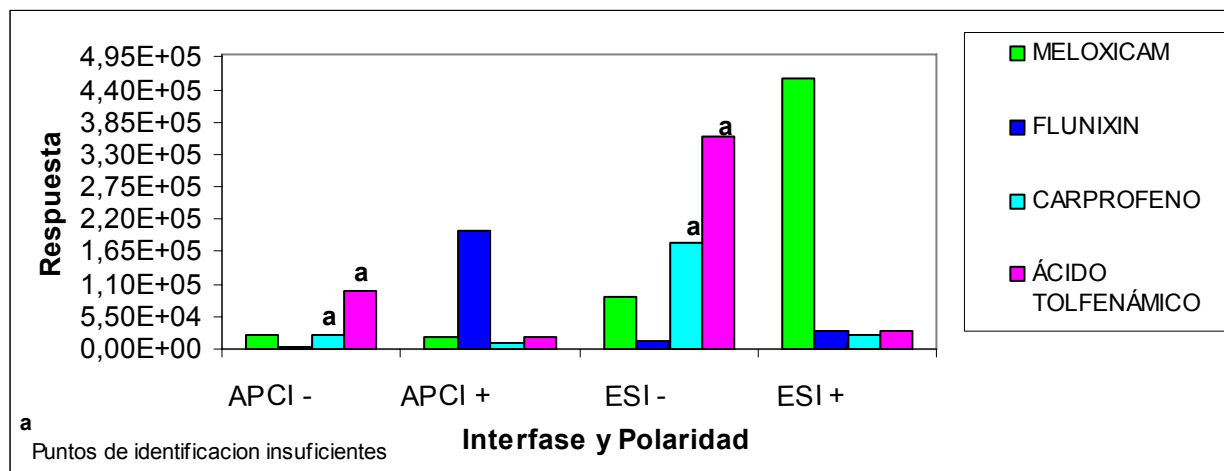
Para el MLX se obtuvo una respuesta mayor con ESI que con APCI y finalmente en ESI (+) fue el modo con el que mejor señal se obtuvo. Además, con ESI (+) se alcanzó una respuesta muy alta en comparación con las del CPF, FLU y TOLF.

Para el CPF y TOLF no se obtuvieron suficientes puntos de identificación en modo (-) tanto con APCI como con ESI. Pero con la fuente de ionización ESI en modo (+) se obtuvo una mayor señal que produjo suficientes iones producto para la identificación de los analitos.

La ionización del FLU con la APCI en modo (+) produjo una señal más alta que la producida con la APCI (-), ESI (-) y ESI (+), pero finalmente se seleccionó ESI (+) porque aportaba una señal suficiente para ser determinado en las concentraciones próximas a los LMR.

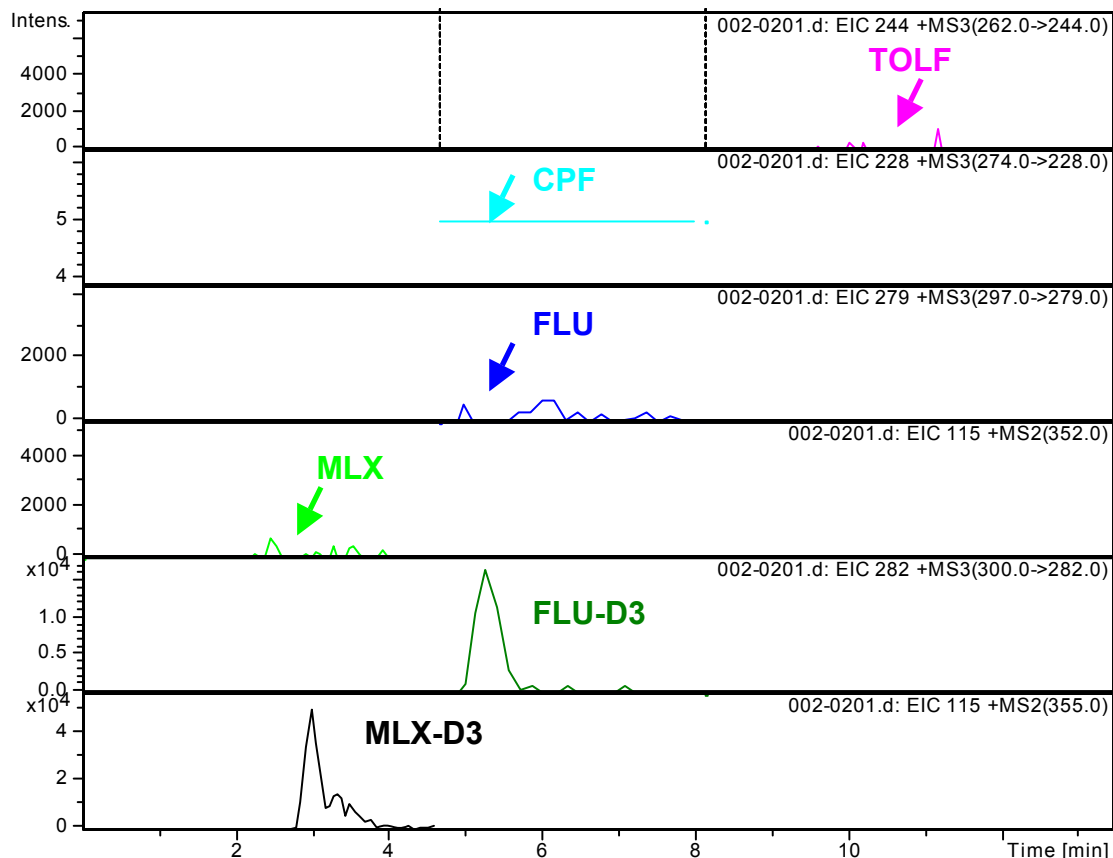
Por tanto, con ESI (+) se consiguió la mejor ionización para generar suficientes iones para cumplir los criterios de identificación (IPs). La figura 4.30 muestra las respuestas del equipo HPLC-MS<sup>n</sup> usando las diferentes técnicas de ionización.

Fig. 4.30.- Respuesta para el **MLX**, **FLU**, **CPF** y **TOLF** usando diferentes técnicas de ionización.



En la figura 4.31 se muestra los cromatogramas de una muestra de hígado de origen bovino blanco, en ella se observan en los cromatogramas extraídos (EIC) del ion nieto del TOLF (244 m/z), del ion nieto del CPF (228 m/z), del ion nieto del FLU (279 m/z) y del ion hijo del MLX (115 m/z) la ausencia de señal o señal inferior al 15% del área del límite de cuantificación, en los tiempos de retención de todos los AINEs analizados, demostrándose la especificidad del método. También se puede observar los cromatogramas extraídos de los patrones internos MLX-D3 (115 m/z) y FLU-D3 (282 m/z).

Fig. 4.31.- Cromatogramas de un blanco de hígado de bovino (EIC 244 m/z **TOLF**, EIC 228 m/z **CPF**, EIC 279 m/z **FLU**, EIC 115 m/z **MLX**, EIC 282 m/z **FLU-D3** y EIC 115 m/z **MLX-D3**).



En la figura 4.32 se muestra los cromatogramas extraídos de los iones usados en la cuantificación del MLX, FLU, CPF y TOLF pertenecientes a una muestra de hígado de origen bovino adicionado en el LMR. En la figura 4.33 se muestra los espectros de los cromatogramas de la figura 4.32, de MS<sup>2</sup> del MLX y MS<sup>3</sup> de CPF, FLU y TOLF, que dan más de 4 puntos de identificación, uno más de lo que se requiere en la Decisión 657/2002/CEE para estas sustancias, que son del grupo B.

Fig. 4.32.- Cromatogramas de un de hígado de bovino adicionado con MLX, FLU, CPF Y TOLF en el LMR. (EIC 244 m/z **TOLF**, EIC 228 m/z **CPF**, EIC 279 m/z **FLU**, EIC 115 m/z **MLX**, EIC 282 m/z **FLU-D3** y EIC 115 m/z **MLX-D3**).

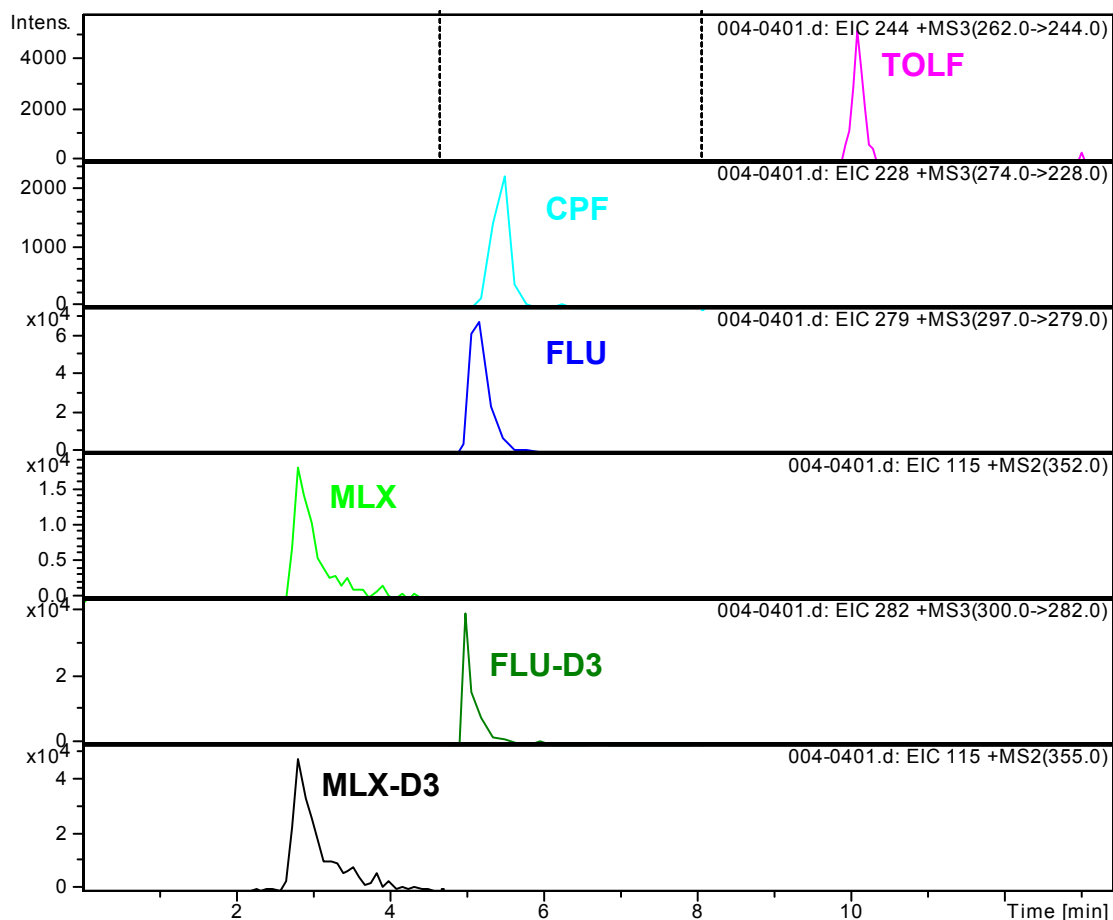
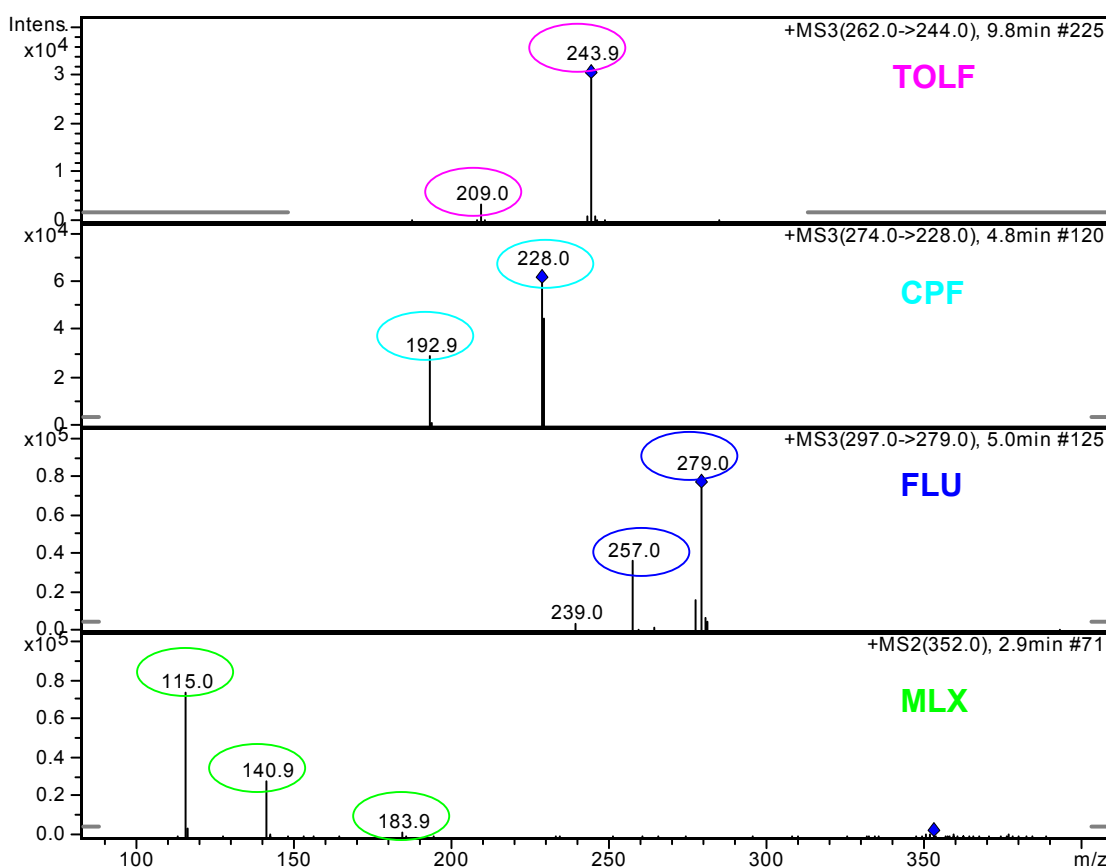




Fig. 4.33.- Espectro de masas del TOLF, CPF, FLU y MLX en un hígado de bovino adicionado al LMR.



La validación se ha realizado atendiendo a las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, tal y como se ha descrito en el capítulo de material y métodos en el apartado 1 donde se describe el procedimiento para la validación de los métodos analíticos.

El ensayo ha sido validado siguiendo el punto 1.3.2 del citado apartado, para sustancias que tienen límite máximo de residuo (LMR) y se van a analizar con un método cuantitativo.

En el caso de aves y conejos, como no se ha establecido ningún LMR para estas sustancias, al igual que para el CPF en porcino y el TOLF en equino, se ha realizado una validación siguiendo las recomendaciones del punto 1.3.2 del apartado

1 de material y métodos para validar métodos cuantitativos para sustancias sin LMR. La matriz utilizada en la validación ha sido hígado de diferentes especies animales. Así pues, los parámetros determinados son:

#### 4.1. Selectividad/especificidad

Se utiliza el método para analizar 20 muestras de hígado de diferentes especies que se muestran en las tablas 4.32 y 4.33. En todas ellas, no se encuentra ninguna señal en los tiempos de retención del MLX, FLU, CPF y TOLF. Con ello se demuestra la especificidad del método para todas las especies ensayadas.

Tabla 4.32.- Muestras de hígado de porcino y equino que se analizan con el método desarrollado.

Identificación muestra	Especie
08-06-01124	Porcino
08-06-01154	Porcino
08-06-01155	Porcino
08-06-01156	Porcino
08-06-01167	Porcino
08-06-01178	Equino
08-06-01189	Equino
08-06-01258	Equino
08-06-01259	Equino
08-06-01270	Equino

Tabla 4.33.- Muestras de hígado de bovino, aves y conejos que se analizan con el método desarrollado.

Identificación muestra	Especie
08-06-01275	Bovino
08-06-01300	Bovino
08-06-01358	Bovino
08-06-01359	Bovino
08-06-01365	Aves
08-06-01366	Aves
08-06-01367	Aves
08-06-01470	Conejo
08-06-01471	Conejo
08-06-01472	Conejo

#### 4.2. Función de respuesta del método

La función de respuesta del método se determina a partir de los datos obtenidos tras la inyección de 10 curvas de muestras enriquecidas con MLX, FLU, CPF y TOLF, tal y como se describe en la tabla 3.17 del capítulo material y métodos. Todas las curvas contienen 6 niveles de calibración (incluyendo el blanco como nivel 1), de las 10 curvas 5 están realizadas por el operador 1 (Francisco Moragues) y las otras 5 por el operador 2 (Carmen Igualada).

Todas las curvas contienen en su rango de concentración, al menos 0,5, 1 y 1,5 veces el límite máximo de residuo (LMR).

El intervalo de concentración en muestra de la curva del FLU es de 50  $\mu\text{g/Kg}$  a 450  $\mu\text{g/Kg}$ , y comprende en su rango de concentración el 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR para bovino (300  $\mu\text{g/Kg}$ ), para equino (100  $\mu\text{g/Kg}$ ) y para porcino (200  $\mu\text{g/Kg}$ ).

Para el resto de analitos como el LMR es común para todas las especies, excepto para CPF en porcino y TOLF en equino que aún no está establecido, la curva contempla en su rango de concentraciones el 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR.

En las tablas 4.34 y 4.35 se muestran los datos de  $R^2$ ,  $m$  (pendiente) y  $b$  (ordenada en el origen) así como la media y la desviación estándar de  $m$  y  $b$ , de las curvas extraídas con matriz de MLX, FLU, CPF y TOLF.

Los límites de la pendiente se estiman con la ecuación 4.1. Como control de calidad del método cada vez que se realice este procedimiento se tendrá en cuenta el siguiente intervalo de aceptación de la pendiente: para el MLX [0,28 – 1,8], para FLU [0,59 – 1,91], para CPF [0,05 – 0,29] y para TOLF [0,10 – 1,02].

Tabla 4.34.- Parámetros de las curvas de matriz extraídas de MLX y FLU. D.E: desviación estándar.

Curva	MLX			FLU		
	$R^2$	$m$	$b$	$R^2$	$m$	$b$
1	0,99	1,02	0,05	0,99	1,25	0,23
2	0,98	1,22	0,58	0,99	1,36	0,58
3	0,98	1,58	0,32	0,98	1,38	0,63
4	0,99	0,78	0,78	0,98	1,98	0,54
5	0,99	0,89	0,12	0,98	0,99	0,85
6	0,99	0,95	-0,35	0,99	1,34	-0,002
7	0,99	0,25	-0,32	0,97	1,38	-0,36
8	0,98	1,35	0,27	0,99	0,99	0,12
9	0,97	1,47	0,32	0,99	0,97	0,13
10	0,98	0,98	-0,005	0,98	0,85	0,07
Media	---	1,04	0,17	---	1,25	0,28
D.E	---	0,38	0,36	---	0,33	0,36

Tabla 4.35.- Parámetros de las curvas de matriz extraídas de MLX y FLU. D.E: desviación estándar.

Curva	CPF			TOLF		
	$R^2$	$m$	$b$	$R^2$	$m$	$b$
1	0,99	0,22	0,05	0,99	0,57	-0,12
2	0,97	0,26	0,003	0,98	0,45	0,05
3	0,98	0,14	0,005	0,99	0,37	0,09
4	0,99	0,12	0,02	0,99	0,46	0,31
5	0,99	0,14	0,02	0,99	0,89	-0,09
6	0,99	0,25	-0,02	0,98	0,48	-0,16
7	0,98	0,26	-0,03	0,97	0,69	0,13
8	0,98	0,07	0,21	0,99	1,01	0,21
9	0,99	0,12	-0,05	0,99	0,33	-0,35
10	0,99	0,13	0,08	0,99	0,39	-0,15
Media	---	0,17	0,03	---	0,56	-0,008
D.E	---	0,06	0,07	---	0,23	0,20

Los límites de la ordenada en el origen se estiman la ecuación 4.2. El intervalo de aceptación: para el MLX [-0,55 – 0,89], para el FLU [-0,44 – 1,00], para el CPF [-0,14 – 0,17] y para el TOLF [-0,41 – 0,39].

### 4.3. Exactitud

Para el cálculo de la exactitud, en cada nivel de adición se obtiene un valor de concentración obtenida (C.O) que se compara con el *valor de la concentración esperada* (C.E) , tal y como se ha descrito en el apartado 1 de material y métodos.

En el FLU las adiciones se han realizado a 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR en hígado de porcino, equino y bovino. Se han adicionado 5 réplicas en cada nivel en días diferentes con operadores diferentes. Para aves y conejos se ha adicionado al nivel más bajo del intervalo de trabajo que es de 50 µg/Kg, al nivel medio de 200 µg/Kg y al nivel alto de 450 µg/Kg. También se han efectuado 5 réplicas en cada nivel en días diferentes y con operadores distintos. En las tablas 4.36, 4.37, 4.38 y 4.39 se muestran los resultados obtenidos de concentración, exactitud y exactitud media (%) para los distintos niveles de adición de FLU en las distintas especies.

Tabla 4.36.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del FLU por especies, en el nivel bajo de adición ó 0,5 LMR sobre cinco muestras blanco de hígado.

<b>FLU bovino</b>			<b>FLU equino</b>		
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.
299,4	314,4	105	99,8	109,8	110
299,4	266,5	89	99,8	88,8	89
299,4	287,4	96	99,8	85,8	86
299,4	260,5	87	99,8	97,8	98
299,4	278,4	93	99,8	92,8	93
Exactitud media		94			95
<b>FLU porcino</b>			<b>FLU aves y conejos</b>		
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.
199,6	213,6	107	99,8	79,8	80
199,6	209,6	105	99,8	84,8	85
199,6	195,6	98	99,8	85,8	86
199,6	177,6	89	99,8	89,8	90
199,6	167,7	84	99,8	79,8	80
Exactitud media		97			84

Tabla 4.37.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del FLU en bovino y equino, en el nivel medio de adición o LMR sobre cinco muestras blanco de hígado.

<b>FLU bovino</b>			<b>FLU equino</b>		
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.
598,8	658,7	110	199,6	159,7	80
598,8	497,0	83	199,6	163,7	82
598,8	652,7	109	199,6	167,7	84
598,8	646,7	108	199,6	195,6	98
598,8	568,9	95	199,6	161,7	81
Exactitud media		101			85

Tabla 4.38.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del FLU en porcino, aves y conejos, en el nivel medio de adición o LMR sobre cinco muestras blanco de hígado.

<b>FLU porcino</b>			<b>FLU aves y conejos</b>		
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.
399,2	319,4	80	199,6	203,6	102
399,2	403,2	101	199,6	205,6	103
399,2	375,2	94	199,6	195,6	98
399,2	327,3	82	199,6	197,6	99
399,2	435,1	109	199,6	171,7	86
Exactitud media		92			98

Tabla 4.39.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del FLU por especies, en el nivel alto de adición ó 1,5 LMR sobre cinco muestras blanco de hígado.

<b>FLU bovino</b>			<b>FLU equino</b>		
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.
898,2	880,2	98	299,4	290,4	97
898,2	862,3	96	299,4	287,4	96
898,2	925,1	103	299,4	308,4	103
898,2	988,0	110	299,4	323,4	108
898,2	889,2	99	299,4	260,5	87
Exactitud media		101			85
<b>FLU porcino</b>			<b>FLU aves y conejos</b>		
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.
598,8	509,0	85	299,4	284,4	95
598,8	532,9	89	299,4	278,4	93
598,8	568,9	95	299,4	293,4	98
598,8	628,7	105	299,4	302,4	101
598,8	622,8	104	299,4	290,4	97
Exactitud media		92			98

Para el MLX, CPF y TOLF las adiciones se han realizado a 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR en hígado de porcino, equino y bovino (LMR común para estas sustancias en estas especies). Se han adicionado 10 replicas en cada nivel en días diferentes con operadores diferentes, mezclando las matrices de hígado de porcino, bovino, equino y de aves y conejos.

Para CPF en porcino y TOLF en equino y para MLX, CPF, y TOLF en aves y conejos, también se estudiará la exactitud en los intervalos 0,5, 1 y 1,5 veces el LMR correspondiente al de hígado de porcino, equino y bovino.

En las tablas 4.40, 4.41 y 4.42 se muestran los resultados de concentración obtenida, exactitud y exactitud media, para cada nivel de adición de MLX, CPF y TOLF en hígado de diferentes especies.

Tabla 4.40.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del MLX en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado.

<b>MLX</b>									
Nivel 0,5 LMR			Nivel 1 LMR			Nivel 1,5 LMR			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
64	55,0	86	128	131,8	103	195	202,8	104	
64	47,4	74	128	134,4	105	195	200,9	103	
64	57,0	89	128	113,9	89	195	173,6	89	
64	57,0	89	128	111,4	87	195	187,2	96	
64	45,4	71	128	122,9	96	195	189,2	97	
64	57,0	89	128	121,6	95	195	202,8	104	
64	61,4	96	128	105,0	82	195	214,5	110	
64	62,7	98	128	138,2	108	195	161,9	83	
64	48,0	75	128	140,8	110	195	191,1	98	
64	65,9	103	128	135,7	106	195	189,2	97	
Exactitud media		87				98			98

Tabla 4.41.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del CPF en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado.

<b>CPF</b>									
Nivel 0,5 LMR			Nivel 1 LMR			Nivel 1,5 LMR			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
998	978,0	98	1996	1976,0	99	2994	3053,9	102	
998	1027,9	103	1996	1816,4	91	2994	2964,1	99	
998	1037,9	104	1996	1896,2	95	2994	2904,2	97	
998	1097,8	110	1996	1876,2	94	2994	2874,2	96	
998	1018,0	102	1996	2135,7	107	2994	3113,8	104	
998	978,0	98	1996	2055,9	103	2994	3263,5	109	
998	888,2	89	1996	1916,2	96	2994	3233,5	108	
998	848,3	85	1996	1896,2	95	2994	2844,3	95	
998	1018,0	102	1996	1836,3	92	2994	2814,4	94	
998	1057,9	106	1996	1956,1	98	2994	2784,4	93	
Exactitud media		100				97			100



Tabla 4.42.- Resultados de la concentración esperada (C.E) y obtenida (C.O) (ng/mL) en extracto. Exactitud (E.) (%) y exactitud media (%) del TOLF en cada nivel de adición sobre diez muestras blanco de hígado.

Nivel 0,5 LMR			TOLF Nivel 1 LMR			Nivel 1,5 LMR			
C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	C.E	C.O	E.	
398	417,9	105	796	660,7	83	1194	1277,6	107	
398	429,8	108	796	756,2	95	1194	1253,7	105	
398	354,2	89	796	843,8	106	1194	1217,9	102	
398	346,3	87	796	668,6	84	1194	1062,7	89	
398	382,1	96	796	740,3	93	1194	991,0	83	
398	378,1	95	796	652,7	82	1194	1146,2	96	
398	409,9	103	796	851,7	107	1194	1158,2	97	
398	429,8	108	796	644,8	81	1194	1098,5	92	
398	437,8	110	796	732,3	92	1194	1289,5	108	
398	421,9	106	796	652,7	82	1194	1253,7	105	
Exactitud media		100				90			97

En todos los niveles se cumple el criterio de aceptación establecido en el procedimiento para la validación de métodos analíticos. El criterio de aceptación para el control de calidad interno es una exactitud comprendida en el intervalo [80 – 110 %] en el nivel próximo al LMR o al límite inferior del intervalo de trabajo para las especies que no poseen LMR.

La eficacia del método se comprueba, cada vez que se realice este procedimiento, a partir del valor de la exactitud obtenido para la muestra adicionada en el nivel próximo al LMR o al límite inferior del intervalo de trabajo para las especies que no poseen LMR.

#### 4.4. Precisión/reproducibilidad intralaboratorio

Para determinar la precisión se toman los datos de las *exactitudes media obtenidas* en los distintos niveles de calibración en las muestras adicionadas por los dos operadores. Se calcula la desviación típica (s) y el coeficiente de variación (C.V)

para los datos de cada nivel de calibración. A través de este último (C.V) se evalúa la precisión del método analítico en cada nivel de concentración. En la tabla 4.43 se muestran los coeficientes de variación obtenidos en cada nivel de calibración.

Los coeficientes de variación obtenidos para cada nivel de concentración se consideran adecuados y aceptables, teniendo en cuenta los criterios de aceptación del apartado 1 de material y métodos, donde en referencia a la Decisión 657/2002/CE, se indica que para fracciones de masa en muestra inferiores a 100 µg/Kg debe ser el C.V igual o menor a 23 y menores de 1000 µg/Kg debe ser menores a 16.

#### **4.5. Límite de decisión ( $CC_{\alpha}$ )**

El cálculo de este límite se ha realizado siguiendo las recomendaciones de la decisión 657/2007/CE para sustancias con LMR como se describe en el punto 1.3.2. del apartado 1 del capítulo material y métodos, y para las sustancias y matrices sin LMR se ha realizado de forma experimental, tal y como se describe en el mismo punto del citado apartado.

Para el FLU en hígado de bovino, porcino y equino se analizaron 20 muestras blanco adicionadas en el LMR. El  $CC_{\alpha}$  es igual a la concentración en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar (s) de dicha concentración. En tabla 4.44 se muestra el cálculo del límite de decisión (µg/Kg) para esta sustancia en hígado de bovino, equino y porcino.

Tabla 4.43.- Desviación típica (s), media de las exactitudes obtenidas y el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de adición de FLU, MLX, CPF y TOLF.

Nivel	Analito	s	Exactitud media	C.V (%)
0,5 LMR o nivel bajo	FLU bovino	7	94	7
	FLU equino	9	95	10
	FLU porcino	9	97	10
	FLU aves y conejos	4	84	5
	MLX	10	87	12
	CPF	7	100	8
	TOLF	8	100	8
1 LMR o nivel medio	FLU bovino	12	101	12
	FLU equino	7	85	9
	FLU porcino	12	92	13
	FLU aves y conejos	6	98	7
	MLX	9	98	10
	CPF	5	97	5
	TOLF	10	90	11
1,5 LMR o nivel alto	FLU bovino	5	101	5
	FLU equino	8	98	8
	FLU porcino	8	96	9
	FLU aves y conejos	3	97	3
	MLX	7	98	8
	CPF	5	100	5
	TOLF	8	97	9

Tabla 4.44.- Resumen del cálculo del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) ( $\mu\text{g/Kg}$ ) del FLU en hígado de las diferentes especies.

<b>Analito</b>	<b>Especie</b>	<b>LMR</b>	<b>+ 1,64 x s<sub>LMR</sub></b>	<b>CC<math>\alpha</math></b>
<b>FLU</b>	Bovino	300	59	359
<b>FLU</b>	Equino	100	14	114
<b>FLU</b>	Porcino	200	43	243

Para el FLU en aves y conejos se realizó, como en ocasiones anteriores (sustancias sin LMR), un estudio experimental para el cálculo de este límite. Se inyectaron soluciones patrón de FLU en concentraciones decrecientes en el equipo HPLC-MS<sup>n</sup> para valorar la respuesta obtenida. Posteriormente, se adicionaron las muestras blanco en niveles crecientes, y en pequeños incrementos, hasta que se llegó a una concentración que nos permitió identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

Se comprobó experimentalmente adicionando sobre tres blancos de matriz la concentración en muestra más baja, que en un principio permitía identificar el analito, que era la de 50  $\mu\text{g/Kg}$  (100 ng/mL en extracto). Se comprobó que en las tres repeticiones se identificaba correctamente el analito con los criterios de la tabla 3.10 del apartado 2 de material y métodos.

Para aceptar ese valor como  $CC\alpha$  del FLU en hígado de aves y conejos, se repitió la adición sobre blancos de matriz, a ese nivel de concentración, 7 veces más. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia del analito, por tanto, ese valor de concentración corresponde al límite de decisión del FLU en esa matriz.

Para el resto de analitos, en hígado de especies con LMR se analizaron 20 muestras blanco adicionadas en el nivel LMR. El  $CC\alpha$  es igual a la concentración en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar ( $s$ ) de dicha concentración. En tabla 4.45 se muestra el cálculo del límite de decisión para MLX, CPF y TOLF en hígado de las especies con LMR.

Tabla 4.45.- Resumen del cálculo del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) ( $\mu\text{g/Kg}$ ) del MLX, CPF y TOLF en hígado de las diferentes especies.

<b>Analito</b>	<b>Especie</b>	<b>LMR</b>	<b>+ 1,64 x s<sub>LMR</sub></b>	<b>CC<math>\alpha</math></b>
MLX	Bovino			
	Equino	65	9	76
	Porcino			
CPF	Bovino	1.000	90	1.090
	Equino			
TOLF	Bovino	400	86	486
	Porcino			

Para la determinación del  $CC\alpha$  en hígado de aves y conejos para MLX, CPF y TOLF, en hígado de equino para el TOLF y en hígado de porcino para CPF, (sustancias sin LMR en esas especies) se ha realizado de forma experimental. Se adicionaron muestras blanco en niveles próximos al intervalo inferior de trabajo (0,5 LMR de estas sustancias en otras especies). Se comprobó experimentalmente adicionando sobre tres blancos de matriz la concentración en muestra más baja que en un principio permitía identificar el analito, que era la de 32,5  $\mu\text{g/Kg}$  para el MLX, 500  $\mu\text{g/Kg}$  para el CPF y 200  $\mu\text{g/Kg}$  para el TOLF. Se comprobó que en las tres repeticiones se identificaba correctamente el analito con los criterios de la tabla 3.10 del apartado 2 de material y métodos.

Para aceptar ese valor como  $CC\alpha$  de estas sustancias en estas matrices, se repitieron las adiciones sobre blancos de matriz, a ese nivel de concentración, 7 veces más. Tras el análisis de las muestras, se identificó en el 100% de ellas la presencia de los analitos, por tanto, esos valores de concentración corresponden a los límites de decisión de MLX, CPF y TOLF en esas matrices.

#### **4.6. Capacidad de detección ( $CC\beta$ ):**

El cálculo de la capacidad de detección se ha realizado de forma experimental para todas las sustancias, tanto en aquellas especies con y sin LMR.

Se han analizado 20 muestras adicionadas a la concentración del CC $\alpha$  de las sustancias. La capacidad de detección es igual al valor del límite de decisión más 1,64 veces la desviación estándar (s), en valor de concentración en muestra, de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medido en esas 20 muestras.

En la tabla 4.46 se resume el cálculo para la determinación de la capacidad de detección ( $\mu\text{g/Kg}$ ) del MLX, FLU, CPF y TOLF y se muestran los valores aceptados de CC $\alpha$  ( $\mu\text{g/Kg}$ ) para todas las sustancias en las distintas especies estudiadas.

Tabla 4.46.- Resumen del cálculo de la capacidad de detección para MLX, FLU, CPF y TOLF, que es igual a la desviación estándar (s) del límite de decisión (CC $\alpha$ ) por 1,64 más la concentración del límite de decisión (CC $\alpha$ ).

<b>Analito</b>	<b>Especie</b>	<b>s del CC<math>\alpha</math> x 1,64</b>	<b>+ CC<math>\alpha</math> (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	<b>CC<math>\beta</math> (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>
MLX	Bovino	10	76	86
	Equino			
	Porcino			
	Aves y conejos	5	33	38
FLU	Bovino	59	359	418
	Equino	15	114	129
	Porcino	42	243	285
	Aves y conejos	4	50	54
CPF	Bovino	103	1.090	1.193
	Equino			
	Porcino	57	500	557
	Aves y conejos			
TOLF	Bovino	82	486	568
	Equino	26	200	226
	Porcino	57	486	568
	Aves y conejos	26	200	226

Durante y tras la validación de este ensayo, se ha realizado el control oficial de estos residuos en hígados de distintas especies de la Comunidad Valenciana y de otras comunidades que han solicitado la colaboración del LSPV para la realización del análisis. La figura 4.34 muestra un cromatograma de una muestra oficial de hígado de bovino (toro de lidia) que resultó ser no conforme por superar la concentración del CC $\alpha$  (por tanto también la del LMR) del TOLF con una concentración de 746,9  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . En la figura 4.35 se muestra el espectro de masas del TOLF obtenido en la muestra no conforme que confirma la identidad del analito.

Fig. 4.34.- Cromatogramas de un hígado de bovino no conforme por superar el CC $\alpha$  del TOLF. (EIC 244 m/z **TOLF**, EIC 228 m/z **CPF**, EIC 279 m/z **FLU**, EIC 115 m/z **MLX**, EIC 282 m/z **FLU-D3** y EIC 115 m/z **MLX-D3**).

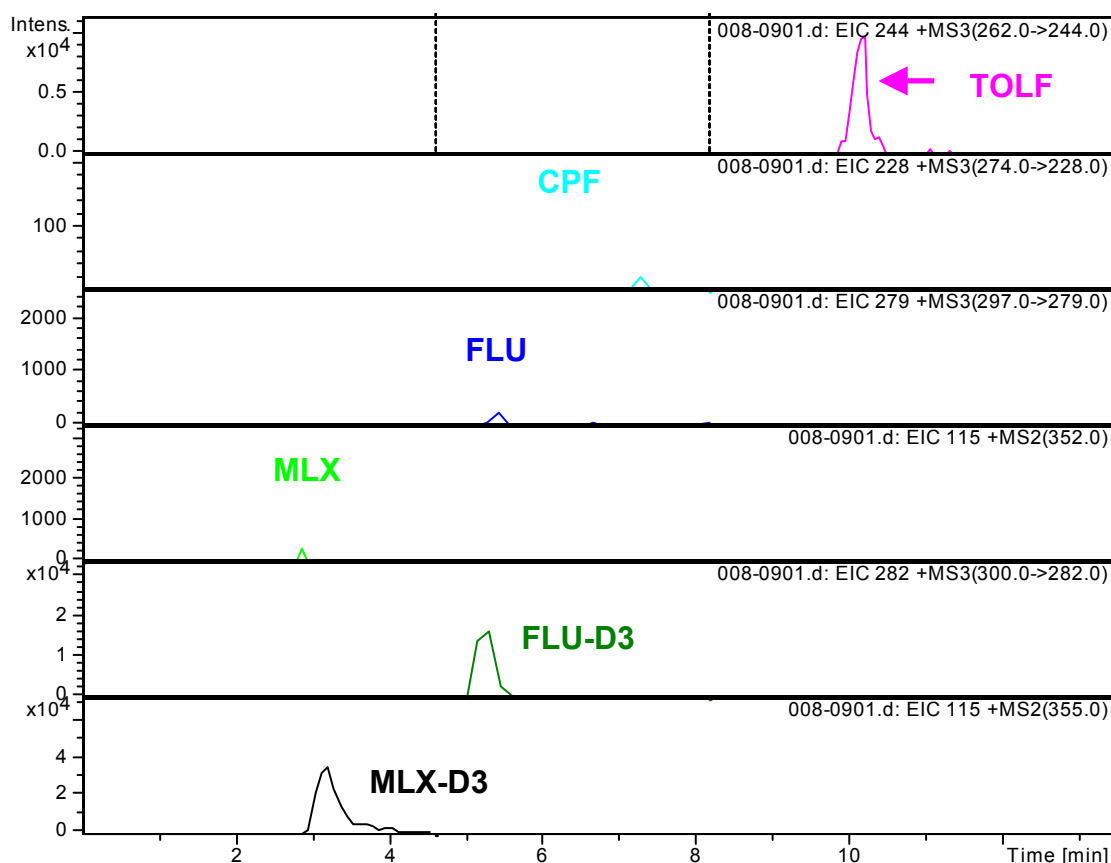
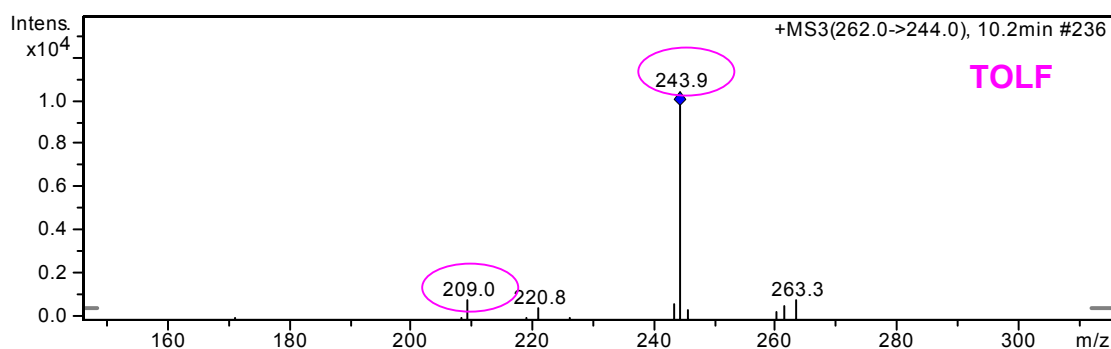


Fig. 4.35.- Espectro de masas del **TOLF** del cromatograma de la figura 4.34.

El presente método se ha validado según el procedimiento de validación de métodos analíticos de residuos de medicamentos veterinarios desarrollado en el apartado 1 de material y métodos. El método se aplicó a varias muestras de hígado de especies diferentes y no se encontraron interferencias en los tiempos de retención de MLX, FLU, CPF y TOLF. Se han elaborado diez curvas de calibrado extraídas en matriz realizadas por operadores diferentes y en distintos días, se han determinado los intervalos de aceptación de la pendiente y de la ordenada en el origen para cada analito. Las exactitudes medias obtenidas en cada nivel de calibración, así como la reproducibilidad intralaboratorio (medida como coeficiente de variación) cumplen con los requisitos de validación de la Decisión 657/2002/CEE.

En el muestreo aleatorio de los servicios de inspección veterinarios de sanidad para el control de estas sustancias, se ha detectado la presencia de alguna de estas sustancias (TOLF) por encima del LMR establecido para bovino. Este hecho pone en evidencia el uso de estos medicamentos sin respetar los tiempos de supresión recomendados, quedando residuos, que son fácilmente cuantificables con el método validado en este estudio.



**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Con la finalidad de cuantificar agonistas  $\beta$ -adrenérgicos en hígado y en orina, cloranfenicol en leche, miel, tejido, huevos y ovoproductos, y AINEs con y sin LMR en hígado y orina, se han puesto a punto cinco métodos sensibles y sencillos para la realización de los programas de control oficial de residuos de medicamentos veterinarios en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV).
2. Los métodos, que son cuantitativos y de identificación, se han validado según las recomendaciones de la Decisión 657/2002/CEE, requiriéndose para ello un equipo HPLC con espectrometría de masas que da información estructural de las moléculas analizadas.
3. Como resultado de las validaciones se han obtenido los parámetros (selectividad/especificidad,  $R^2$ , pendiente y ordenada en el origen de la curva de calibrado, exactitud, precisión/reproducibilidad, límite de decisión y capacidad de detección) que demuestran que los métodos cumplen los requisitos técnicos establecidos en la legislación mediante la Decisión 657/2002/CEE.
4. Estos parámetros han servido para establecer unos criterios de aceptación para los controles de calidad internos. Estos controles son requisito de los ensayos químicos que se incluyen en el sistema de calidad establecido en el LSPV, acorde a la Norma ISO 17025.
5. El uso de un equipo HPLC-MS<sup>n</sup> ha permitido alcanzar una buena sensibilidad para todos los analitos, facilitando su identificación inequívoca y aportando, en todos los métodos, al menos cuatro puntos de identificación.

6. La validez de estos métodos se ha comprobado sobre muestras reales que contenían los analitos. Estas muestras se han obtenido mediante ejercicios de intercomparación, animales tratados o pertenecientes al muestreo aleatorio realizado por los servicios de inspección en el control oficial de residuos zoonosarios.

## **BIBLIOGRAFÍA**



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria.  
[http://www.europa.eu.int/eur-lex/es/com/wpr/1999/com1999\\_0719es01.pdf](http://www.europa.eu.int/eur-lex/es/com/wpr/1999/com1999_0719es01.pdf)  
Consultado el 22 de febrero de 2003.
2. Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J. Drugs residues in foods, pharmacology, food safety, and analysis, edición no. 1, Marcel Dekker, New York (Basel), USA (2001).
3. Marcos Beltrán, J. Reflexiones acerca del Medicamento Veterinario. Información Veterinaria, 214, (2000).  
[http://www.colvet.es/infovet/may00/ciencias\\_v/articulo1.htm](http://www.colvet.es/infovet/may00/ciencias_v/articulo1.htm)  
Consultado el 22 de febrero de 2003.
4. Ley 29/2006, de 26 de Julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE nº 178 de 27 de Julio de 2006.
5. Reglamento (CEE) nº2377/90 del Consejo de 26 de junio de 1990 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (DO nº L 67 de 7. 3 1997, p. 1).
6. Reglamento (CE) nº 544/2003 de la comisión de 27 de marzo de 2003 que modifica los anexos I y II del Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.
7. FAO Manual on the Submission and Evaluation of Pesticide Residues Data for the Estimation of Maximum Residue Levels in Food and Feed Food and Agriculture Organization of the United Nations Roma, 1997  
<http://www.fao.org/docrep/X5848E/X5848E00.htm>. Consultado el 13 de Marzo de 2005.
8. Tamames, L., Tamames, R. Introducción a la Constitución Española. Edición de los XXV años de la Constitución (1978-2003) (Textos y Comentarios) Alianza Editorial. (2003).
9. Somoano, J. ¿Qué ha pasado con la Constitución? 25 años después. Conversación con los padres de la Carta Magna Española. Maeva. (2003).

10. Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos BOE nº 188 del 7 de Agosto de 1998.
11. Regulación de la Comisión (EC) Nº 74/2003 de 22 de Septiembre de 2003 (OJ NºL 262, 14 de Octubre de 2003).
12. Draft Council Decision concerning the placing on the market and administration of bovine somatotropin (BST) and repealing Council Decision 90/218/EEC. (20654) 12458/99 COM(99) 544.(1999).
13. Regulación de la Comisión (EC) Nº 86/469 de 16 de Septiembre de 1986 (OJ NºL 275, 26 de Septiembre de 1986).
14. Real Decreto 1262/1989, de 20 de octubre de 1989, por el que se aprueba el Plan Nacional de Investigación de Residuos en los Animales y Carnes Frescas BOE nº 188 del 26 de Octubre de 1989.
15. Abalaka, J. A. Conferencia sobre Comercio Internacional de alimentos a partir del año 2000: decisiones basadas en criterios científicos, armonización, equivalencia y reconocimiento mutuo. Melbourne, Australia, (1999).
16. Decisión de la Comisión (EC) Nº 2002/657 de 12 de Agosto de 2002 (OJ NºL 221, 17 de Agosto de 2002).
17. Council regulation (EEC) No 2377/90 of 26<sup>th</sup> june of 1990. Laying down a Community procedure for the establishment of maximun residues limits of veterinary medicinal in foodstuffs of animal origin.
18. MLR assessments in the context of council regulation (EEC) No 2377/90. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicines and Inspections (emea). [www.emea.eu](http://www.emea.eu) Consultado el 18 de mayo de 2008.
19. Mersmann, H., J. Overview of the effects of  $\beta$ -adrenergic receptor agonists on animal growth including mechanisms of action. Journal of Animal Science, 76, 160-172 (1998).
20. Hernández-Carrasquilla, M. External contamination of bovine hair with  $\beta$ -agonist compounds: evaluation of decontamination strategies. Journal of Chromatography A, 767, 235-243 (2002).



21. Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J. Screening procedures for clenbuterol residue determination in bovine urine and liver matrices using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 483, 61-67 (2003).
22. Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J.  $\beta$ -Adrenergic agonists. En *Drug Residues in Foods*. Ed. Marcel Dekker, New York, 1077-1087 (2001).
23. Fente, C.A., Vázquez, B.I., Franco, C., Cepeda, A., Gigoso, P.G. Determination of clenbuterol residues in bovine hair by using diphasic dialysis and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 726, 133-139 (1999).
24. Whaites, L.X., Murby, E.J. Determination of clenbuterol in bovine urine using gas chromatography-mass spectrometry following clean-up on an ion-exchange resin. *Journal of Chromatography A*, 728, 67-73 (1999).
25. Cristino, A., Ramos, F., Silveira, M.I.N. Control of the illegal use of clenbuterol in bovine production. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32, 311-316 (2003).
26. Koole, A., Bosman, J., Franke, J.P., de Zeeuw, R.A. Multiresidue analysis of  $\beta$ -agonist in human and calf urine using multimodal solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 726, 149-156 (1999).
27. Petersson, M., Wahlund, K.G., Nilsson, S. Miniaturised on-line solid-phase extraction for enhancement of concentration sensitivity in capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 841, 249-261(1999).
28. Zhou, T., Hu, Q., Yu, H., Fang, Y. Separation and determination of  $\beta$ -agonists in serum by capillary zone electrophoresis with amperometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 441, 23-29 (2001).
29. Andrea, P., Miroslav, S., Silvia, S., Stanislav, M. A solid binding matrix/molecularly imprinted polymer-based sensor system for the determination of clenbuterol in bovine liver using differential-pulse voltammetry. *Sensors Actuators B*, 76, 286-294 (2001).
30. Ramos, F.J.  $\beta$ -agonist extraction procedures for chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 880, 69-83 (2000).

31. Van Vyncht, G., Preece, S., Gaspar, P., Maghuin-Rogister, G., DePauw, E. Gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the multiresidue analysis of  $\beta$ -agonists in biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 750, 1-2, 43-49 (1996).
32. Guy, P.A., Savoy, M.C., y Stadler, R.H. Quantitative analysis of clenbuterol in meat products using liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 736, 209–219 (1999).
33. Kootstra, P.R., Kuijpers, C.J.P.F., Wubs, K.L., Van Doorn, D., Sterk, S.S., Van Ginkel, L.A. and Stephany, R.W. The analysis of  $\beta$ -agonists in bovine muscle using molecular imprinted polymers with ion trap LCMS screening. *Analytica Chimica Acta*, 529, 1-2, 75-81 (2005).
34. Fiori, M., Civitareale, C., Mirante, S., Magarò, E., Brambilla, G. Evaluation of two different clean up steps, to minimise ion suppression phenomena in ion trap liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multi-residue analysis of  $\beta$ -agonist in calves urine. *Analytica Chimica Acta*, 529, 1-2, 207-210 (2005).
35. Reig, M., Battle, N., Navarro, J.L. y Toldra, F. Stability of  $\beta$ -agonist methyl boronic derivatives before gas chromatography-mass spectrometry analysis, *Analytica Chimica Acta*, 529, 1-2, 293-297 (2005).
36. Whaites, L., Murby, E.J. Determination of clenbuterol in bovine urine using gas chromatography-mass spectrometry following clean-up on an ion-exchange resin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 728, 1, 67-73, (1999).
37. Ramos, F., Santos, C., Silva, A., Noronha da Silveira, M.I. [ $\beta$ 2]-Adrenergic agonist residues: simultaneous methyl- and butylboronic derivatization for confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 716, 1-2, 366-370, (1998).
38. Keskin, S., Ozer, D., Temizer, A. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of clenbuterol from urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18, 4-5, 639-644 (1998).

39. Hernandez-Carrasquilla, M. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of  $\beta$ -agonists in bovine retina. *Analytica Chimica Acta*, 408, 1-2, 285-290 (2000).
40. Cai, J., Henion, J. Quantitative multi-residue determination of  $\beta$ -agonists in bovine urine using on-line immunoaffinity extraction-coupled column packed capillary liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 691, 357-370 (1997).
41. Antignac, J.P., Marchand, P., Bizec, B., Andre, F. Identification of ractopamine residues in tissue and urine samples at ultra-trace level using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 774, 59-66 (2002).
42. Shishani, E., Chai, S.C., Jamokha, S., Aznar, G., Hoffman, M.K. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 483, 137-145 (2003).
43. Thevis, M., Opfermann, G., Schanzer, W. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric screening and confirmation methods for  $\beta$ -agonists in human or equine urine. *Journal of Mass Spectrometry*, 38, 1197-1206 (2003).
44. Blanca, J., Muñoz, P., Morgado, M., Mendez, N., Aranda, A., Reuvers, T. y Hooghuis, H. Determination of clenbuterol, ractopamine and zilpaterol in liver and urine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529, 1-2, 199-205 (2005).
45. Williams, L.D., Churchwell, M.I., Doerge, D.R. Multiresidue confirmation of B-agonist in bovine retina and liver using LC-ES/MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 813, 35-45, (2004).
46. Posyniak, A., Zmudzki, J., Niedzielska, J. Evaluation of sample preparation for control of chloramphenicol residues in porcine tissues by ELISA and LC. *Analytica Chimica Acta*, 483, 307-311 (2003).

47. Hormazábal, V., Yndestad, M., Simultaneous determination of chloramphenicol and ketoprofen in meat and milk and chloramfenicol in egg, honey and urine using LC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 24, 2477-2486 (2001).
48. Pensabene, J.W., Fiddler, W., Donoghue, D.J. Isolation of chloramphenicol from whole eggs by SFE with in-line collection. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 82, 1334-1339 (1999).
49. Roudaut, B. HPLC with UV detection and scanning UV confirmation of chloramphenicol in fatty liver, *Journal of Liquid Chromatography*, 19, 1097-1105 (1996).
50. Gantverg, A., Shishani, I., Hoffman, M. Determination of chloramfenicol in animal tissues and urine: LC-tandem MS versus GC-MS. *Analytica Chimica Acta*, 483, 125-135 (2003).
51. Impens, S., Reybroeck, W., Vercammen, J., Courtheyn, D., Ooghe, S., DeWasch, K., Smedts, W., DeBrabander, H. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS<sup>2</sup> and LC-MS<sup>2</sup>. *Analytica Chimica Acta*, 483, 153-163 (2003).
52. Mottier, P., Parisod, V., Gremaud, E., Guy, P.A., Stadler, R.H. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 994, 75-84 (2003).
53. Thorsen Ronning, H., Einarsen, K., Asp, T.N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1118, 226-233 (2006).
54. Nicolich, R.S., Werneck-Barroso, E., Sipoli Marques, M.A. Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 565, 97-102 (2006).

55. Forti, A.F., Campana, G., Simonella, A., Multari, M., Scortichini, G. Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529, 257-263 (2005).
56. Ramos, M., Muñoz, P., Aranda, A., Rodriguez, I., Diaz, R., Blanca, J., Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 791, 31-38 (2003).
57. Clark, S.B., Turnipseed, G.J., Nandrea, M.R., Madson, J. Determination of Phenylbutazone residues in bovine kidney by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, 85, 1009-1014 (2002).
58. Aarbakke, J. Clinical Pharmacokinetics of Phenylbutazone. *Clinical Pharmacology*, 3, 369-380 (1978).
59. Lees, P., Taylor, J.B., Maitho, T.E., Millar, J.D., Higgins, A.J. Metabolism, excretion, pharmacokinetics and tissue residues of phenylbutazone in the horse. *Cornell Veterinarian*, 77, 192-211 (1987).
60. Vermeulen, B., Remon, J.P. Validation of high-performance liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen enantiomers in plasma of broiler chickens. *Journal of Chromatography B*, 749, 243-251 (2000).
61. Rupp H.S., Holland, D.C., Munns, R.K., Turnipseed, S.B., Long, A.R. Determination of flunixin in milk by liquid chromatography with confirmation by gas chromatography-mass spectrometry and selected ion monitoring. *Journal of Official Analytical Chemists International* 78 (4), 959-967 (1995).
62. Ian De Veau, E.J. Determination of non-protein bound phenylbutazone in bovine plasma using ultrafiltration and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 721 (1), 141-145 (1999).
63. Stanley, S.M.R., Owens, N.A., Rodgers, P. Detection of flunixin in equine urine using high-performance liquid chromatography with particle beam and atmospheric pressure ionization mass spectrometry after solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*, 667(1), 95-103 (1995).

64. Singh, A.K., Jang, Y., Mishra, U. Granley, K. Simultaneous analysis of flunixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urine by high-performance liquid chromatography and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 568, 2, 351-361 (1991).
65. Taylor, M.R., Westwood, S.A. Quantitation of phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine plasma by high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 697 (1-2), 389-396 (1995).
66. Kim, K-R., Yoon, H-R. Rapid screening for acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by gas chromatography-mass spectrometry in the selected-ion monitoring mode. *Journal of Chromatography B*, 682 (1), 55-66 (1996).
67. Yamamoto, K., Hagino, M., Kotaki, H., Iga, T. Quantitative determination of domperidone in rat plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 719, 251-255 (1996).
68. Gowik, P., Jülicher, B., Uhlig, S. Multi-residue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma using high-performance liquid chromatography–photodiode-array detection: Method description and comprehensive in-house validation *Journal of Chromatography B*, 716, 221-232 (1998).
69. E. de Jong, G., Kiffers, J., Maes, R.A.A. The determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by GC–MS–MS in equine urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7, 1617-1622 (1989).
70. Owen, S.G., Roberts, M.S., Friesen, W.T. Rapid high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous analysis of non-steroidal antiinflammatory drugs in plasma. *Journal of Chromatography B*, 416, 293-302 (1999).
71. González, G., Ventura, R., Smith, A., de la Torre, R., Segura, J. Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 719, 251-264 (1996).

72. Cristofol, C., Perez, B., Pons, M., Valladares, J.E., Marti, G., Arboix, M. Determination of indomethacin residues in poultry by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 709 (2), 310-314 (1998).
73. Ranniko, R., Niemi, A. Determination of phenylbutazone and oxyphenbutazone in cattle urine by liquid chromatography and the effects of storage temperature on stability. *Proceedings of the Euroresidue IV Conference, Veldhoven, The Netherlands, (2): 891-896 (2000).*
74. Bakkali, A., Corta, E., Berrueta, L.A., Gallo, B., Vicente, F. Study of the solid-phase extraction of diclofenac sodium, indomethacin and phenylbutazone for their analysis in human urine by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 729, 139-145 (1999).
75. Ternes, T., Bonerz, M., Schmidt, T. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 938, 175-185 (2001).
76. Asea, P.A., Patterson, J.R., Korsrud, G.O., Dowling, P.M., Boison, J.O. Determination of Flunixin residues in bovine muscle tissue by liquid chromatography with UV detection. *Journal of Official Analytical Chemists International*, 84 (3) 659-665 (2001).
77. Hoof, N.V., De Wasch, K., Poelmans, S., Noppe, H., De Brabander, H. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine muscle: optimisation of ion trap parameters. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 18, 2823-2829 (2004).
78. Borner, P.L., Liu, D.D.W., Felly, W.F., Robinson, R.A., Wu, J. Determination of flunixin in edible bovine tissues using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7555-7559 (2003).
79. Daeseleire, E., Mortier, L., De Ruyck, H., Geerts, N. Determination of flunixin and ketoprofen in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 488, 25-34 (2003).

- 80.** Miksa, I.R., Cummings, M.R., Poppenga, R.H. Multi-residue determination of anti-inflammatory analgesics in sera by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 29, 95-104 (2005).
- 81.** Antignac, J.P., De Wasch, K., Monteu, F., De Brabander, H., Andre, F., Le Bizec, B. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta*, 529, 129-136 (2005).



**PUBLICACIONES**



## PUBLICACIONES

Parte de los resultados experimentales contenidos en este estudio se recogen en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

### 1. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Revistas internacionales

1. Igualada, C., **Moragues, F.** Determination of phenylbutazone and oxyphenbutazone in animal urine by ion trap liquid chromatography–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 529, 235-238 (2005). Se muestra en el Anexo 1.
2. Igualada, C., **Moragues, F.**, Pitarch, J. Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography–mass spectrometry with ion-trap detector. *Analytica Chimica Acta*, 585, 432-439 (2007). Se muestra en el Anexo 2.

#### 1.2. Revistas nacionales

1. Igualada, C., **Moragues, F.**, Pitarch, J. Análisis comparativo de los métodos para la determinación de AINEs prohibidos y permitidos por LC-MS<sup>n</sup> en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia. *Alimentaria*, 389, 118-119 (2008).

### 2. COMUNICACIONES A CONGRESOS

#### 2.1. Congresos internacionales

1. Igualada, C., **Moragues, F.** Determination of phenylbutazone and oxyphenbutazone in animal urine by ion trap liquid chromatography–mass spectrometry. *Proceedings EuroResidue V Conference*, Noodwijkerhout, (Holanda), 562-567 (2004). Presentación en forma de artículo y póster.

2. Igualada, C., **Moragues, F.**, Pitarch, J. Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography–mass spectrometry with ion-trap detector. 5<sup>th</sup> International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis. Amberes, (Bélgica) (2007). Presentación en forma de poster.
3. **Moragues, F.**, Igualada, C. How to decrease ion suppression in a multiresidue determination of  $\beta$ -agonist in animal liver and urine by liquid chromatography mass spectrometry with ion-trap detector. Proceedings EuroResidue VI Conference, Egmond aan Zee, (Holanda), 677-681 (2008). Presentación en forma de artículo y póster.

## 2.2. Congresos nacionales

1. Igualada, C., **Moragues, F.**, Pitarch, J. Análisis comparativo de los métodos para la determinación de AINEs prohibidos y permitidos por LC-MS<sup>n</sup> en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia. II Congreso de Laboratorios Agroalimentarios, Madrid, (2007). Presentación en forma de póster.