



VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

**Departamento de Medicina
Preventiva y Salud Pública, Ciencias
de la Alimentación, Toxicología y
Medicina Legal**

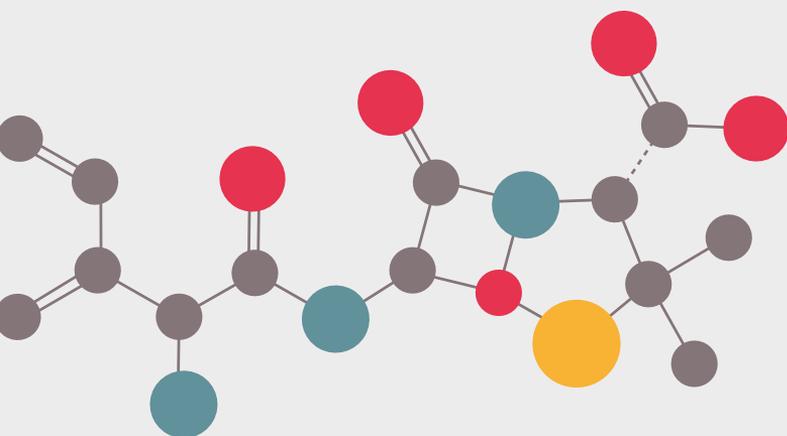
Programa de Doctorado:
Ciencias de la Alimentación

TESIS DOCTORAL

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

Carmen Igualada Cañas
Diciembre 2021

Directores:
Dra. Guillermina Font Pérez
Dr. Vicent Yusà Pelechà





TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA,
CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN, TOXICOLOGÍA Y
MEDICINA LEGAL

Programa de doctorado: Ciencias de la Alimentación

**ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS DE
ORIGEN ANIMAL, AGUA DE BEBIDA PARA ANIMALES Y
PIENSOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA
A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA Y ALTA
RESOLUCIÓN**

Carmen Igualada Cañas

Directores

Dra. Guillermina Font Pérez
Dr. Vicent Yusà Pelechà

Diciembre 2021

La Dra. Guillermina Font Pérez, Catedrática de Toxicología de la Universitat de València y el Dr. Vicent Yusà Pelechà, Jefe de Sección del Laboratorio de Salud Pública de Valencia e Investigador de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO)

CERTIFICAN QUE:

La licenciada en Farmacia Carmen Iguialada Cañas ha realizado bajo su dirección la Tesis Doctoral que lleva por título ANÁLISIS DE ANTIBIÓTICOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL, AGUA DE BEBIDA PARA ANIMALES Y PIENSOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA Y ALTA RESOLUCIÓN, y autorizan su presentación para optar al título de Doctor por la Universitat de València.

Y para que así conste, expiden y firman el siguiente certificado.

Burjassot (València), diciembre de 2021

Dra. Guillermina Font Pérez

MARIA
GUILLERMI
NA|FONT|
PEREZ

Firmado digitalmente por MARIA GUILLERMINA|FONT|PEREZ
Fecha: 2021.12.16 13:59:32 +01'00'

Dr. Vicent Yusà Pelechà

YUSÀ I
PELECHÀ,
VICENT
(AUTENTICAC
IÓN)

Firmado digitalmente por YUSÀ I PELECHÀ, VICENT (AUTENTICACIÓN)
Fecha: 2021.12.16 13:53:14 +01'00'

A mis padres

Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores Guillermina Font y Vicent Yusà haber confiado en mí para la realización de este trabajo. Muchas gracias por vuestra gran ayuda. Vuestras inyecciones de energía, vuestros sabios consejos, vuestras revisiones y vuestra extraordinaria paciencia con mi lentitud en la redacción han sido cruciales para la finalización de esta tesis.

A Francisco Moragues, por su gran ayuda, por los debates técnicos, por las risas, por los lloros, por su valía, en fin, son tantos los momentos a lo largo de estos años... Una cosa tengo clara, el haberte conocido y trabajar contigo es un regalo que me ha hecho la vida.

A Nuria León, también por su gran ayuda, especialmente en el DoE, que tenía miga y por los debates técnicos. También son muchos años compartiendo momentos en el laboratorio y te agradezco tu disposición y responsabilidad. Eres una luchadora campeona.

A Carmen Forcada, tan responsable, perfeccionista y buena compañera, y a Yovana, toda bondad y responsabilidad, por estar ahí, por vuestros ánimos y vuestro apoyo.

A los demás compañeros, que están y han estado en la Unidad de Residuos de Medicamentos Veterinarios (RMV), Baltasar, Carmen Navarro (toda una vida trabajando juntas), Carmen Gargallo, Gemma, Joaquina, Sandra, Xavi y Maru, por vues-

tra ayuda, por trabajar en equipo y porque vuestra labor siempre ha hecho que la Unidad de RMV brille en el laboratorio.

También al resto de compañeros del laboratorio que contribuyen a que me sienta bien en el trabajo y, en definitiva, a mi felicidad laboral.

A Miguel, mi marido y compañero de viaje desde la adolescencia, a mis hijos, Laura y Miguel, mis tres amores, por estar ahí, apoyándome siempre en mis decisiones, animándome con los retos, y por haberme dado los momentos más felices de mi vida. También a Félix, el amor de Laura, por haber aportado su grano de arena, con comidas deliciosas, en mis momentos intensos de redacción de esta tesis.

Y, finalmente, a mis padres, por haberme dado la vida y haberme inculcado valores como la honestidad, el sentido de la responsabilidad y el esfuerzo. Mamá, sé que, desde donde estés, te sentirás orgullosa.

Resumen

La utilización de agentes antimicrobianos en producción animal es uno de los principales riesgos para la salud debido a su potencial presencia como residuos en los alimentos en cualquier etapa de la cadena alimentaria. Según datos de la Agencia Europea de Medicamento, España es uno de los países en que las ventas de agentes antimicrobianos para animales productores de alimentos son más elevadas. Los principales efectos adversos producidos por los antibióticos son reacciones alérgicas, destrucción de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal y el aumento de la selectividad de bacterias multiresistentes o producción de resistencias antimicrobianas. Actualmente, la resistencia a los agentes antimicrobianos (RAM) se ha convertido en un problema a nivel global en el ámbito de la Salud Pública, debido a su gran impacto sobre la salud humana y la salud animal.

El control de la presencia de antibióticos en los alimentos de origen animal es, por lo tanto, una actividad relevante en el campo de la seguridad alimentaria que viene impulsada por la legislación europea y que para garantizar su eficacia requiere de potentes métodos analíticos que permitan detectar, confirmar y cuantificar la presencia de trazas de estas sustancias en las diferentes matrices de origen animal.

La tendencia actual de los métodos para el análisis de residuos en los alimentos es la de desarrollar metodologías genéricas que permitan determinar un gran número de sustancias pertenecientes a distintas familias de compuestos, con diferentes propiedades físico-químicas, y que permitan, en la medida de lo posible, la incorporación de nuevos compuestos al método para ampliar su alcance. Este es el reto que se aborda en la presente Tesis, con el desarrollo de diversos métodos para el

análisis de varias familias de antibióticos en distintas matrices alimentarias, aguas de bebida para animales y pienso.

Específicamente, en esta tesis, se han desarrollado y validado dos métodos de cribado por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de alta resolución con analizador Orbitrap (LC-HRMS), uno cualitativo, aplicable a las matrices músculo y riñón, y, otro cualitativo y cuantitativo, aplicable a la leche. Asimismo, se han desarrollado y validado cuatro métodos de confirmación cuantitativos por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de baja resolución con analizador de triple cuadrupolo (LC-MS/MS), aplicables al agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso. Los métodos desarrollados incluyen en su ámbito de aplicación distintas familias de antibióticos como anfenicoles, β -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), diaminopirimidinas, lincosamidas, macrólidos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas y antibióticos poliénicos.

Durante el desarrollo de los mismos se llevó a cabo la optimización de los parámetros de la fuente de ionización del equipo de LC-HRMS mediante diseño de experimentos en dos etapas, una de cribado mediante un diseño de Placket-Burman (PB) y otra de optimización de los parámetros relevantes mediante Diseño Central Compuesto (CCD). También se realizó una selección de distintas combinaciones de solventes de extracción y para la preparación de las muestras previamente a la Extracción en Fase Sólida. Además, se evaluó el método QuEChERS UNE-EN-15662 aplicándolo a las matrices músculo y riñón, no obteniéndose buenos resultados para gran número de compuestos.

Previa a la validación de los métodos, se realizó un estudio del efecto matriz y se demostró la necesidad de utilizar rectas de calibrado en matriz extraída y patrones internos para su corrección. La validación de los métodos se llevó a cabo de acuerdo

con los criterios vigentes en la Unión Europea, y que se detallan en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE.

Con objeto de mostrar su adecuación para el control oficial de alimentos, los métodos fueron aplicados al análisis de un elevado número de muestras y permitieron la detección de antibióticos que fueron utilizados fuera de las prescripciones. También se detectaron antibióticos autorizados en muestras de agua y de pienso, lo que indica que las medidas higiénicas tomadas en las explotaciones y en la fabricación de piensos no son eficaces.

Todos los métodos desarrollados cumplen los requisitos establecidos en la legislación vigente europea y, por lo tanto, son aplicables al control oficial de antibióticos en las matrices estudiadas.

Índice general

1.Introducción	37
1.1. Medicamentos veterinarios. Marco legislativo y control oficial	39
1.2. Uso de antibióticos en producción animal y su interés en salud pública	51
1.2.1. Resistencias a los antibióticos	55
1.3. Métodos de análisis de antibióticos utilizados en producción animal	57
1.3.1. Preparación de la muestra	62
a) Etapa de extracción	62
b) Etapa de purificación	66
1.3.2. Análisis Instrumental	71
a)Separación cromatográfica	71
b)Espectrometría de Masas	74
1.3.3. Efecto matriz	78
2.Objetivos	89
3.Material y métodos	93
3.1. Material, reactivos, patrones y equipos	95
3.1.1. Material	95

3.1.2. Reactivos	96
3.1.3. Patrones certificados	97
3.1.4. Equipos	98
3.2. Muestras	99
3.3. Experimental	100
3.3.1. Desarrollo y validación de un método de cribado cualitativo en músculo y riñón y de un método de cribado cualitativo y cuantitativo en leche para análisis de antibióticos por LC-HRMS.	102
3.3.1.1. Optimización de los parámetros de la fuente de ionización	105
3.3.1.2. Selección de las condiciones cromatográficas	106
3.3.1.3. Selección de los solventes de extracción	197
3.3.1.4. Evaluación método QuEChERS aplicado a músculo y riñón	109
3.3.1.5. Evaluación del efecto matriz y la recuperación	110
3.3.1.6. Validación de los métodos de cribado por LC-HRMS	112
a) Especificidad. <i>Threshold value T</i>	112
b) <i>Cut-off Factor Fm</i> y $CC\beta$	113
c) Veracidad	114
d) Precisión/repetibilidad	114
e) Precisión/reproducibilidad intralaboratorio	115
3.3.2. Desarrollo y validación de métodos de confirmación cuantitativos para la determinación de antibióticos en agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS	116

3.3.2.1. Selección de las condiciones de la fuente de ionización	121
3.3.2.2. Selección de las condiciones cromatográficas	121
3.3.2.3. Selección de los solventes para la preparación de la muestra previa a la etapa de purificación para la matriz agua	122
3.3.2.4. Selección de los solventes para la etapa de hidrólisis previa a la etapa de purificación para la matriz miel	123
3.3.2.5. Selección de los solventes de extracción para la matriz huevo	124
3.3.2.6. Selección de los solventes de extracción para la matriz pienso	125
3.3.2.7. Evaluación del efecto matriz y la recuperación	126
3.3.2.8. Validación de los métodos de confirmación cuantitativos para agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso por LCMS/MS	127
a) Especificidad	128
b) Veracidad	128
c) Precisión/ repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio	129
d) CC α o Límite de decisión	129
e) CC β o Capacidad de detección	130
4. Resultados y discusión	131
4.1. Desarrollo y validación de un método de cribado cualitativo en músculo y riñón y de un método de cribado cualitativo y cuantitativo en leche para análisis de antibióticos por LC-HRMS	133

4.1.1. Optimización de los parámetros de la fuente de ionización	133
4.1.2. Selección de las condiciones cromatográficas	143
4.1.3. Selección de los solventes de extracción y evaluación del método QuEChERS	148
4.1.3.1. Músculo	148
4.1.3.2. Riñón	152
4.1.3.3. Leche	155
4.1.4. Evaluación del efecto matriz y la recuperación	158
4.1.4.1. Músculo	158
4.1.4.2. Riñón	160
4.1.4.3. Recuperaciones y compensación del efecto matriz en las matrices músculo y riñón	162
4.1.4.4. Leche	164
4.1.4.5. Recuperaciones y compensación del efecto matriz en la matriz leche	169
4.1.5. Validación de los métodos	171
4.1.5.1. Validación cualitativa	171
a) Especificidad. <i>Threshold value T</i>	176
b) <i>Cut-off Factor Fm y CCβ</i>	180
4.1.5.2. Validación cuantitativa en leche	180
a) Rectas de calibrado y rango de trabajo	185
b) Veracidad	186

c)Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intralaboratorio	187
4.1.5.3. Relación efecto matriz-reproducibilidad intralaboratorio	187
4.1.6. Análisis de muestras	191
4.1.6.1. Músculo y riñón	193
4.1.6.2. Leche	198
4.2. Desarrollo y validación de métodos de confirmación cuantitativos para la determinación de antibióticos en agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS	201
4.2.1. Selección de las condiciones de la fuente de ionización	201
4.2.2. Selección de las condiciones cromatográficas	203
4.2.3. Selección de los solventes para la preparación de la muestra previa a la etapa de purificación para la matriz agua	205
4.2.4. Selección de los solventes para la etapa de hidrólisis previa a la etapa de purificación para la matriz miel	208
4.2.5. Selección de los solventes de extracción para la matriz huevo	211
4.2.6. Selección de los solventes de extracción para la matriz pienso	216
4.2.7. Evaluación del efecto matriz y la recuperación	219
4.2.7.1. Agua	220
4.2.7.2. Miel	222
4.2.7.3. Huevo	224
4.2.7.4. Pienso	226

4.2.7.5. Recuperaciones y compensación del efecto matriz	228
a) Agua	228
b) Miel	229
c) Huevo	229
d) Pienso	230
4.2.8. Validación de los métodos	231
4.2.8.1. Especificidad	251
a) Agua	251
b) Miel	252
c) Huevo	252
d) Pienso	252
4.2.8.2. Rectas de calibrado y rango de trabajo	261
4.2.8.3. Veracidad	262
a) Agua	262
b) Miel	263
c) Huevo	263
d) Pienso	263
4.2.8.4. Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intralaboratorio	264
a) Agua	264
b) Miel	265
c) Huevo	265

d) Pienso	266
4.2.8.5. Límite de decisión o $CC\alpha$ y Capacidad de detección o $CC\beta$	266
4.2.8.6. Relación efecto matriz-reproducibilidad intralaboratorio	270
4.2.9. Análisis de muestras	272
4.2.9.1. Agua	272
4.2.9.2. Miel	275
4.2.9.3. Huevo	275
4.2.9.4. Pienso	276
5. Conclusiones	283
Bibliografía	289

Abreviaturas

AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AESAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AG	<i>Auxiliary Gas</i>
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica
ASE	Extracción Acelerada con Solvente
CC α	Límite de decisión
CC β	Capacidad de detección
CCD	Diseño Central Compuesto
CG	Cromatografía Gaseosa
CL	Cromatografía Líquida
CRLs	Laboratorios Comunitarios de Referencia
CT	<i>Capillary Temperature</i>
CV	<i>Capillary Voltage</i>
CV%	Coefficiente de variación %
CVMP	Comité de Medicamentos de Uso Veterinario
DDA	Dosis Diaria Admisible
DoE	Diseño de Experimentos
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFS	Extracción en Fase Sólida
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EM	Efecto Matriz
EMA	Agencia Europea del Medicamento
ESI	Ionización por ElectroSpray
ESVAC	<i>European Surveillance of Veterinarian Antimicrobial Consumption</i>

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
Fm	<i>Cut-off factor</i>
FWHM	<i>Full Widht at Half Maximum</i>
HCD	<i>Higher Energy Induced Dissociation</i>
HESI	<i>Heat Electrospray</i>
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HILIC	Cromatografía Líquida de Interacción Hidrofílica
HLB	Balance Hidrofílico-Lipofílico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HT	<i>Heater Temperature</i>
LC-HRMS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (Orbitrap)
LC-(IT)-TOF-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de trampa de iones y analizador de Tiempo de Vuelo
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas
LC-Q-Orbitrap	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas con cuadrupolo y analizador Orbitrap
LC-QqQ	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas/masas de triple cuadrupolo.
LC-Q-TOF-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de cuadrupolo y analizador de Tiempo de Vuelo
LC-TOF-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas con analizador de Tiempo de Vuelo
LMR	Límite Máximo de Residuos
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Diseño Plackett-Burman
PCOCA	Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria
PCU	Unidad de Corrección de la Población
PLE	Extracción Líquida Presurizada
PNIR	Plan Nacional de Investigación de Residuos
PSA	Amina Primaria Secundaria

PTFE	Politetrafluoroetileno
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RAM	Resistencia a los Agentes antimicrobianos
RE	Recuperación absoluta
RIA	Abundancia de Relación Isotópica
rpm	Revoluciones por minuto
RSD _F %	Desviación estándar relativa en repetibilidad %
RSD _R %	Desviación estándar relativa en reproducibilidad intralaboratorio %
SD	Desviación estándar
SGP	<i>Sheath Gas Pressure</i>
SKV	<i>Skimmer Voltage</i>
SPME	MicroExtracción en Fase Sólida
SRM	<i>Selected Reaction Monitoring</i>
SV	<i>Spray Voltage</i>
T	<i>Threshold value</i>
UHPLC	Cromatografía Líquida de Ultra-Alta Resolución
UE	Unión Europea
VAV	Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antibióticos
VISAVET	Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria
WOS	Web of Science

Índice de tablas

Tabla 1.1	Número de muestras analizadas para cada grupo de sustancias, el número de muestras no conformes y el número de resultados no conformes en 2019. EFSA, 2019.	49
Tabla 1.2	Antibióticos estudiados en esta tesis de cada familia, sus estructuras químicas, LMR y los valores de pKa.	80
Tabla 3.1	Antibióticos, fórmula molecular, masa monoisotópica y masa molecular de los iones diagnósticos, estudiados en músculo, riñón y leche por LC-HRMS.	103
Tabla 3.2	Antibióticos estudiados para agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS, modo de ionización, ion precursor, iones producto, energías de colisión y los patrones internos utilizados.	118
Tabla 4.1	Matriz del diseño Plackett-Burman para la optimización de los parámetros de la fuente de ionización HESI-II. Equipo LC-HRMS Exactive.	134
Tabla 4.2	Efectos estimados y <i>p-values</i> (entre paréntesis) de los 7 parámetros de la fuente de ionización del diseño Plackett-Burman. Equipo LC-HRMS Exactive.	136
Tabla 4.3	Condiciones experimentales del experimento CCD para cada <i>run</i> cromatográfico. Optimización de los parámetros de la fuente. Equipo LC-HRMS Exactive.	138
Tabla 4.4	Valores optimizados de los 7 parámetros de la fuente de ionización. LC-HRMS.	143

Tabla 4.5	Resultados de los parámetros de validación cualitativa músculo. Respuesta media de blancos (B), <i>Threshold value</i> T, <i>Cut-off factor</i> Fm, CCβ.	171
Tabla 4.6	Resultados de los parámetros de validación cualitativa riñón. Respuesta media de blancos (B), <i>Threshold value</i> T, <i>Cut-off factor</i> Fm, CCβ.	173
Tabla 4.7	Resultados parámetros de validación cualitativa leche. Respuesta media de blancos (B), <i>Threshold value</i> T, <i>Cut-off factor</i> Fm, CCβ.	174
Tabla 4.8	Resultados parámetros de validación cuantitativa leche y tiempo de retención. CCβ/Límite de cuantificación (LC), rango de concentración, coeficiente de determinación (R ²), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD _r %) y reproducibilidad intralaboratorio (RSD _R %).	181
Tabla 4.9	Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para el método de cribado en músculo. Periodo 2016-2020.	197
Tabla 4.10	Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para método de cribado en leche.	199
Tabla 4.11	Valores seleccionados de los parámetros de la fuente de ionización. LC-MS/MS.	202
Tabla 4.12	Resultados parámetros de validación en agua y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R ²), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD _r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD _R %), CCα y CCβ.	232

Tabla 4.13	Resultados parámetros de validación en miel y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.	237
Tabla 4.14	Resultados parámetros de validación en huevo y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.	242
Tabla 4.15	Resultados parámetros de validación en pienso y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.	247
Tabla 4.16	Analitos detectados en las muestras de agua para ave por encima del $CC\alpha$ y concentraciones obtenidas.	274
Tabla 4.17	Analitos detectados en las muestras de pienso por encima del $CC\alpha$ y concentraciones obtenidas.	278
Tabla 4.18	Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para métodos LC-MS/MS. Matrices miel, huevo y pienso. Periodo 2017-2021.	280

Índice de figuras

Figura 1.1	Mecanismos por los que pueden aparecer residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.	40
Figura 1.2	Porcentaje de muestras No conformes por especies y productos. Datos 2019 EFSA.	50
Figura 1.3	Distribución espacial de las ventas de todos los agentes antimicrobianos para animales productores de alimentos, en mg/PCU para 31 países en 2018 (EMA).	53
Figura 1.4	Distribución de ventas de antimicrobianos, expresado como % del total de ventas, para animales productores de alimentos por familia de antimicrobianos en 2018 en 31 países europeos (EMA).	54
Figura 1.5	Evolución del número de artículos publicados desde 2008 hasta 2021. Fuente: WOS. Búsqueda: “veterinary drug” AND “analysis” AND “mass spectrometry”.	60
Figura 1.6	Evolución del número de artículos publicados desde 2008 hasta 2021. Fuente: WOS. Búsqueda: “veterinary” AND “analysis” AND “mass spectrometry” AND “antibiotic”.	61
Figura 3.1	Experimentos llevados a cabo para el desarrollo y validación de los métodos por LC-HRMS y LC-MS/MS.	101
Figura 3.2	Esquema general de los métodos propuestos para las matrices músculo, riñón y leche por LC-HRMS.	102
Figura 3.3	Esquema general de los métodos propuestos para agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS.	117

Figura 4.1	Selección de las condiciones experimentales para <i>Capillary T</i> , <i>Heater T</i> y <i>Sheath Gas Pressure</i> . Valores de <i>D</i> (<i>desirability</i>) para los analitos seleccionados.	141
Figura 4.2	Superficies de respuesta obtenidas en el proceso de optimización para Sulfadiazina, Tilmicosina, Ceftiofur y Doxiciclina. Equipo LC-HRMS Exactive.	142
Figura 4.3	Cromatograma de una solución de 40 ng/ml. Amoxicilina, Sulfadiazina, Espiramicina y Neospiramicina. Fase móvil Ácido acético 0,1%/metanol (ácido acético 0,1%). Columna Hypersil Gold (C ₁₈) (100 x 2,1 mm d.i. 1,9 μm).	145
Figura 4.4	Cromatogramas de solución de 40 ng/ml de antibióticos representativos de distintas familias. Columna a) Hypersil Gold (C ₁₈) (100 x 2,1 mm d.i. 1,9 μm) y columna b) Kinetex C ₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2.6 μm). Fase móvil: Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido fórmico 0,1 %).	146
Figura 4.5	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción y el método QuEChERS. Músculo bovino fortificado a 20 μg/Kg.	149
Figura 4.6	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción y el método QuEChERS. Riñón bovino fortificado a 20 μg/Kg.	153
Figura 4.7	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción. Leche caprino fortificada a 1/2 LMR.	156
Figura 4.8	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en músculo. n=3. Fortificación al LC.	159
Figura 4.9	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en riñón. n=3. Fortificación al LC.	161

Figura 4.10	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en leche. n=3. Nivel bajo.	165
Figura 4.11	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en leche. n=3. Nivel medio.	166
Figura 4.12	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en leche. n=3. Nivel superior.	167
Figura 4.13	Cromatograma de una muestra blanco de músculo de porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCB en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	177
Figura 4.14	Cromatograma de una muestra blanco de riñón de porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCB en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	178
Figura 4.15	Cromatograma de una muestra blanco de leche de caprino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCB en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	179
Figura 4.16	Relación entre %EM corregido (valor absoluto) y RSDR%. Nivel límite de cuantificación. Matriz leche.	188
Figura 4.17	Número de muestras (músculo+riñón) con resultado >CCB para cada compuesto. 100 muestras analizadas.	192

Figura 4.18	Porcentaje de muestras con resultado >CCβ y <CCβ para las matrices músculo y riñón.	193
Figura 4.19	Porcentaje de muestras con resultado >CCβ y <CCβ para la matriz músculo.	194
Figura 4.20	Porcentaje de muestras con resultado >CCβ y <CCβ para la matriz riñón.	195
Figura 4.21	Cromatogramas obtenidos con las dos combinaciones de fase móvil ensayadas, Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido fórmico 0,1%) (a) y Ácido fórmico 0,1%/Metanol/Acetonitrilo (50/50) (ácido fórmico 0,1%) (b). Columna Kinetex C ₁₈ XB (100 x 2,1 mm d.i. 2.6 μm).	204
Figura 4.22	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes previos a la EFS. Agua de bebida animales fortificada a 10 μg/l.	206
Figura 4.23	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes para hidrólisis. Miel multifloral fortificada a 10 μg/Kg.	209
Figura 4.24	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción. Huevo de gallina fortificado a 2xLC.	213
Figura 4.25	Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción. Pienso de porcino fortificado al LC.	217
Figura 4.26	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en agua. Nivel bajo.	221
Figura 4.27	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en miel multiflores. Nivel bajo.	223

Figura 4.28	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en huevo. Nivel bajo.	225
Figura 4.29	% Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorregido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorregida) en pienso de porcino. Nivel bajo.	227
Figura 4.30	Cromatograma de una muestra blanco de agua para porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	254
Figura 4.31	Cromatograma de una muestra blanco de miel de romero (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	256
Figura 4.32	Cromatograma de una muestra blanco de huevo de gallina (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	258
Figura 4.33	Cromatograma de una muestra blanco de pienso para ovino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.	260
Figura 4.34	Relación entre %EM corregido (valor absoluto) y $RSD_R\%$. Nivel límite de cuantificación. Matriz pienso.	271
Figura 4.35	Porcentaje de muestras $> CC\alpha$ y $< CC\alpha$. Muestras analizadas 73. Matriz agua.	273

Figura 4.36	Número de muestras con resultados $> CC\alpha$ por cada analito. Matriz agua.	273
Figura 4.37	Porcentaje de muestras $> CC\alpha$ y $< CC\alpha$. Muestras analizadas 44. Matriz pienso.	276
Figura 4.38	Número de muestras con resultados $> CC\alpha$ por cada analito. Matriz pienso.	277

1.

Introducción

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

1. Introducción

1.1. Medicamentos veterinarios. Marco legislativo y control oficial

La salud humana está relacionada directamente con el medioambiente y con la calidad de los alimentos y, concretamente, los alimentos de origen animal son una de las grandes preocupaciones de las agencias de salud pública a nivel mundial debido a que los medicamentos veterinarios juegan un papel muy importante en producción animal y en la industria agroalimentaria, siendo uno de los mayores problemas en la contaminación de los alimentos (Beyene, 2016; Ortelli, Spörri, & Edder, 2018).

Los medicamentos veterinarios son utilizados en los animales tanto para tratar sus enfermedades como para prevenirlas, siendo necesaria su utilización para garantizar la adecuada cantidad de alimentos para la población mundial. Sin embargo, su utilización puede dar lugar a residuos de las diferentes sustancias en los productos obtenidos de los animales tratados y la presencia de estos debe ser controlada.

En 1984 la FAO y la OMS definieron medicamento veterinario como “cualquier sustancia aplicada o administrada a los animales productores de alimentos, tales como animales productores de carne, aves, pescados o abejas, con fines terapéuticos, profilácticos o de la modificación de las funciones fisiológicas, y para la prevención y tratamiento de las enfermedades” (Joint FAO/WHO, 1985) .

La figura 1.1. muestra los mecanismos por los que pueden aparecer residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal.

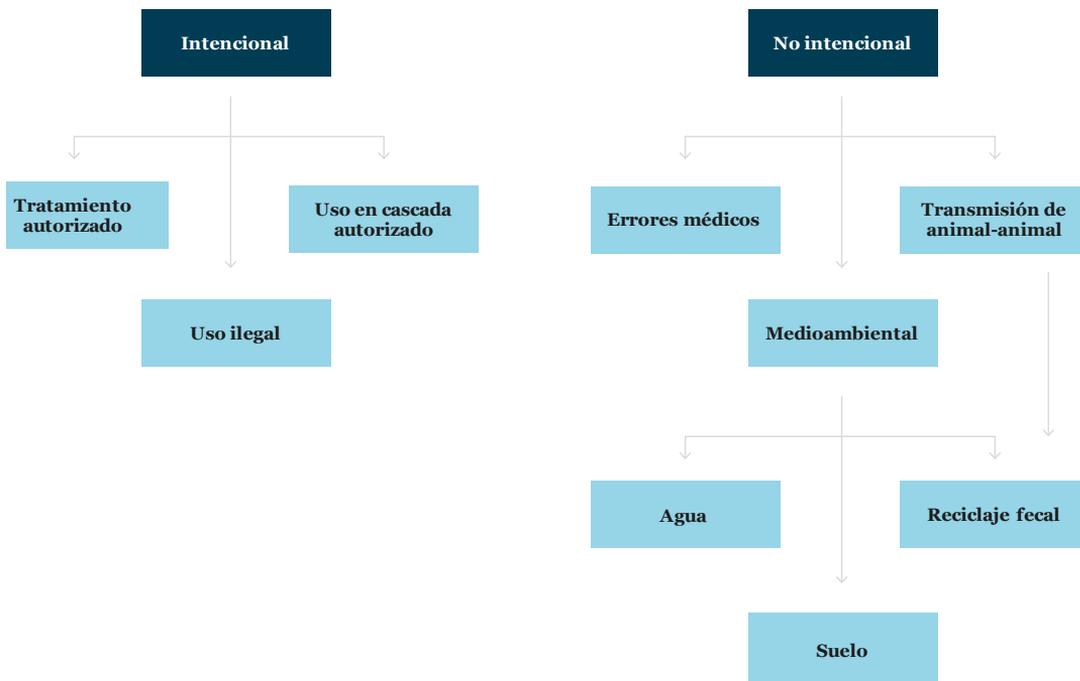


Figura 1.1. Mecanismos por los que pueden aparecer residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal (Bedale, 2019).

Los medicamentos veterinarios podrían encontrarse en los alimentos de origen animal porque de una forma no intencionada entren en el animal. La contaminación medioambiental, el reciclaje fecal, la transmisión animal-animal y los errores humanos son formas en que un residuo de medicamento veterinario puede estar

presente en un alimento de origen animal. Por otro lado, también podrían aparecer a través de los tratamientos terapéuticos autorizados o por prescripción excepcional por vacío terapéutico o prescripción en cascada o bien, porque se haga un uso ilegal de.

Los principales factores de riesgo para la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos son:

- a. Edad del animal, que puede afectar a la disposición del medicamento.
- b. Alimentación animal. La dieta puede afectar a la biodisponibilidad de los medicamentos.
- c. Estado de la enfermedad, que puede afectar a la farmacocinética de los medicamentos administrados.
- d. Farmacocinética: absorción, distribución, metabolismo y excreción.
- e. Utilización de medicamentos no acorde a las instrucciones del prospecto.
- f. Inadecuado tiempo de espera.

Ello implica que se debe llevar a cabo una ardua tarea para prevenir la aparición de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos (Beyene, 2016).

Además de la prevención, hay que tener en cuenta que debido a que la mayoría de productos de origen animal no se consumen crudos, los niveles en los mismos se pueden ver reducidos. Tratamientos como pasteurización, esterilización, cocción al vapor, ebullición, fritura o asado pueden producir una reducción de los niveles por evaporación o por degradación térmica. Además, la fermentación, el nivel de pH y tiempo de almacenaje tienen un impacto considerable sobre la reducción de niveles de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos (Rana, Lee, Kang, & Hur, 2019).

En España, la base de la normativa sobre medicamentos de uso humano y de uso veterinario se encuentra en el Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de Julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios (Real Decreto Legislativo 1/2015, de 24 de julio). En él 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”. Además, en el capítulo III, se establecen las garantías exigibles a los medicamentos veterinarios elaborados industrialmente y las condiciones de prescripción y dispensación de los mismos.

La Agencia Europea del Medicamento (EMA) es la responsable en el territorio de la Unión Europea de la evaluación científica, la supervisión y el control de seguridad de los medicamentos desarrollados por empresas farmacéuticas para su uso en la UE. Se encarga de facilitar el desarrollo de medicamentos y el acceso a los mismos, evaluar las solicitudes de autorización de comercialización, controlar la seguridad de los medicamentos en todo su ciclo de vida y facilitar información a los profesionales sanitarios y los pacientes. Dentro de ésta, el Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CVMP) lleva a cabo una evaluación de la seguridad de cada sustancia y emite un dictamen científico. Basándose en este dictamen, la Comisión Europea adopta un Reglamento jurídicamente vinculante que establece el Límite Máximo de Residuo para cada sustancia (European Medicines Agency, 2021).

En España, es la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) la que garantiza a la sociedad, desde una perspectiva de servicio público, la calidad, seguridad, eficacia y correcta información de los medicamentos y productos sanitarios, desde su investigación hasta su utilización, en interés de la protección y promoción de la salud de las personas y de los animales. También garantiza que se establezca un tiempo de espera para cada uno de los medicamentos veterinarios destinados a usarse en animales productores de alimentos. Dicho tiempo de espera es el plazo que hay que respetar antes de su sacrificio para que el animal metabolice el medicamento de tal forma que los residuos del medicamento estén por debajo de los Límites Máximos de Residuos y, en consecuencia, se puedan obtener de él los distintos alimentos (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021).

En Europa, la primera legislación aplicable al control de medicamentos de uso veterinario data de 1981 en que se publica la Directiva 81/602/CEE referente a la prohibición de la administración de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático en animales de explotación, así como la comercialización y sacrificio de dichos animales, la comercialización y transformación de sus carnes y de los productos cárnicos elaborados a partir de éstas (Directiva 81/602/CEE, 1981). Posteriormente, fue complementada por las Directivas 85/358/CEE, 85/649/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE que seguían regulando la prohibición de sustancias con acción hormonal, siendo todas ellas, posteriormente, derogadas por la Directiva 96/22/CE del Consejo que es la que actualmente está en vigor referente a la prohibición de la utilización de sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias b-agonistas en la cría del ganado (Directiva, 85/358/CEE, 1985; Directiva, 85/649/CEE, 1985; Directiva, 88/146/CEE; Directiva, 88/299/CEE; Directiva, 96/22/CE).

En lo que respecta a las sustancias autorizadas, con el fin de proteger la salud del consumidor de los productos alimenticios de origen animal, incluidos la carne, el pescado, la leche, los huevos y la miel y para facilitar la comercialización de dichos productos, el 26 de junio de 1990 el Consejo adoptó el Reglamento (CEE) n° 2377/90 apoyado en un proceso comunitario destinado al establecimiento de los límites máximos de residuos (LMR) para los medicamentos veterinarios en productos alimenticios de origen animal (Reglamento (CEE) n° 2377/90, 1990).

El Límite Máximo de Residuos (LMR) es “el contenido máximo resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/Kg o en mg/Kg sobre la base en peso fresco) autorizada en la Comunidad o reconocida como admisible en un producto alimenticio. Dicho límite se basará en el tipo y en la cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana tal como expresa la dosis diaria admisible (DDA), o sobre la base de un DDA temporal que utilice un factor de seguridad adicional. Tomará, asimismo, otros riesgos relativos a la salud pública así como los aspectos de tecnología alimentaria. Cuando se establezca un LMR, se tomarán en consideración igualmente los residuos que aparezcan en alimentos de origen vegetal o que procedan del medio ambiente. Además, podrá reducirse el LMR con objeto de que sea coherente con las prácticas correctas de utilización de medicamentos veterinarios y ello en la medida en que se disponga de métodos de análisis prácticos”.

Dicho Reglamento quedó derogado por el Reglamento (CE) n° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo que fue complementado por el Reglamento (UE) n° 37/2010 de la Comisión relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, actualmente en vigor (Reglamento (CE) n° 470/2009, 2009; Reglamento (UE) n° 37/2010; 2010). En dicho Reglamento se in-

cluyeron dos tablas, en la tabla 1 se incluyeron las sustancias autorizadas indicando sus Límites Máximos de Residuos y, en la tabla 2, las sustancias prohibidas viéndose esta última complementada por las prohibiciones establecidas en la Directiva 96/22/CE del Consejo.

Es importante mencionar que, para la correcta interpretación del Reglamento (UE) nº 37/2010, se debe tener en cuenta lo que se denomina “prescripción excepcional por vacío terapéutico o prescripción en cascada”. Actualmente, el Reglamento (UE) 2017/880 de la Comisión es el que establece normas sobre el uso de un límite máximo de residuos establecido para una sustancia farmacológicamente activa en un producto alimenticio determinado para otro producto alimenticio derivado de la misma especie y de un límite máximo de residuos establecido para una sustancia farmacológicamente activa de una o más especies en otras. La extrapolación de los LMR es el procedimiento mediante el cual los niveles de residuos en tejidos o productos alimenticios en una especie destinada a la producción de alimentos para la que se han establecido LMR se utilizan para estimar los niveles de residuos y establecer en tejidos o productos alimenticios en otras especies, en otros tejidos o en otros productos alimenticios de la misma especie para la cual no se dispone de datos sobre los residuos convencionales, o dichos datos están incompletos (Reglamento(UE) 2017/880, 2017).

En Europa, actualmente, la Directiva 96/23/CE referente a las medidas de control aplicables a las sustancias de uso en producción animal y sus residuos en animales vivos, sus excrementos y líquidos biológicos, sus tejidos, productos animales, piensos y agua de bebida para animales es la que regula el control de los medicamentos veterinarios. En dicha disposición se establece la necesidad de llevar a cabo Planes

de Vigilancia por parte de cada Estado miembro, incluyendo las estrategias, niveles y frecuencia de muestreo, así como las medidas a adoptar en caso de infracciones. Las sustancias y grupos de sustancias a controlar son las siguientes (Directiva, 96/23/CE, 1996).

Grupo A. Compuestos anabolizantes y sustancias no autorizadas.

1. Estilbenos, sus derivados, sales y esteres.
2. Compuestos antitiroideos.
3. Hormonas esteroides.
4. Lactonas del ácido resorcílico (incluido el zeranol).
5. Agonistas b-adrenérgicos.
6. Las sustancias que debido a su peligrosidad, como los nitrofuranos y el cloranfenicol, no se les puede asignar un límite máximo de residuos en los alimentos de origen animal.

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

1. Fármacos antibacterianos, incluidas sulfamidas y quinolonas.
2. Otros medicamentos veterinarios:
 - a. Antihelmínticos.
 - b. Anticoccidianos incluyendo nitroimidazoles.
 - c. Carbamatos y piretroides.
 - d. Tranquilizantes.
 - e. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).
 - f. Otras sustancias de acción farmacológica.

3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales.
 - a. Compuestos organoclorados.
 - b. Compuestos organofosforados.
 - c. Elementos químicos.
 - d. Micotoxinas.
 - e. Colorantes.
 - f. Otros.

En España, el Real Decreto 1749/1998, actualmente en vigor, es en el que se establecieron las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en animales vivos y sus productos para llevar a cabo la transposición de la Directiva del Consejo 96/23/CE, de 29 de abril (R.D.1749/1998, 1998).

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) contribuye a la seguridad de la cadena alimentaria de la UE proporcionando asesoramiento científico a los gestores de riesgos sobre riesgos existentes y emergentes, comunicando los riesgos para el público y cooperando con los Estados miembros y otras partes para proporcionar un sistema de seguridad alimentaria coherente y fiable en la UE. Su asesoramiento se aplica en la legislación y las políticas europeas y, de este modo, contribuye a proteger a los consumidores frente a riesgos en la cadena alimentaria (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, 2021).

En España, es la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) la que desempeña las funciones relacionadas con la promoción y el fomento de los derechos de los consumidores y usuarios en bienes y servicios, así como la seguridad alimentaria y la nutrición saludable. Dentro del Plan Nacional de Control Oficial de la Cadena Alimentaria (PCOCA) se incluye el programa de Residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias en alimentos de ori-

gen animal cuyo objeto es describir el modo en que deben organizarse y realizarse los controles establecidos en el Real Decreto 1749/1998, transposición de la Directiva 96/23/CE, para detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y otras sustancias no autorizadas o autorizadas por encima de los límites máximos de residuos (LMR) legalmente establecidos en los alimentos de origen animal por parte de autoridades competentes de la AESAN y de las Comunidades Autónomas (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2021).

Con la publicación del Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y sobre las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios (Reglamento (UE) 2017/625) se derogó la Directiva 96/23/CE anteriormente mencionada pero se indicó que dicha Directiva seguiría teniendo aplicación hasta el 14 de diciembre de 2022 o hasta la aprobación de un acto delegado. En la actualidad se está trabajando en actos delegados donde se separará el control de medicamentos veterinarios de otras sustancias en los alimentos, tales como contaminantes o ingredientes tecnológicos entre otros (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2021).

El informe de EFSA de 2019 sobre datos de resultados del Control Oficial de los grupos de residuos establecidos en la Directiva 96/23/CE en los animales vivos y sus productos resume los datos recopilados de todos los Estados Miembros de la Unión Europea, incluidos Islandia y Noruega.

La tabla 1.1 muestra el número de muestras analizadas para cada grupo de sustancias, el número de muestras no conformes y el número de resultados no conformes

en 2019 de acuerdo al Informe de EFSA arriba mencionado, que fue aprobado el 5 de enero de 2021.

Tabla 1.1. Número de muestras analizadas para cada grupo de sustancias, el número de muestras no conformes y el número de resultados no conformes en 2019. (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, 2021).

Substance group ^(a)	Samples analysed ^(b)	% samples analysed	Non-compliant samples ^(c)	% Non-compliant samples	Non-compliant results ^(d)
A	206,606	56.1	341	0.17	370
A1	25,909	7	0	0	0
A2	9,908	2.7	57	0.58	57
A3	44,297	12	244	0.55	261
A4	22,422	6.1	25	0.11	36
A5	36,698	10	0	0	0
A6	106,882	29	15	0.01	16
B	242,437	65.8	860	0.35	966
B1	104,367	28.3	150	0.14	185
B2	121,965	33.1	121	0.1	127
B2a	31,463	8.5	36	0.11	39
B2b	38,793	10.5	21	0.05	22
B2c	13,236	3.6	0	0	0
B2d	9,718	2.6	0	0	0
B2e	24,387	6.6	46	0.19	47
B2f	31,725	8.6	18	0.06	19
B3	46,490	12.6	592	1.27	654
B3a	15,248	4.1	26	0.17	32
B3b	11,839	3.2	2	0.02	2
B3c	12,448	3.4	524	4.21	579
B3d	10,613	2.9	14	0.13	14
B3e	1,478	0.4	16	1.08	17
B3f	5,659	1.5	10	0.18	10
Total	368,594	100	1,191	0.32	1,336

(a): as detailed in Appendix E;

(b): number of samples analysed for one or more substances of the respective group;

(c): number of non-compliant samples for one or more substances in the respective group;

(d): number of non-compliant results; one sample can be non-compliant for more substances therefore the number of non-compliant results can be higher than the number of non-compliant samples of the same group.

Por otro lado, la figura 1.2 muestra el porcentaje de muestras no conformes para cada una de las especies y productos analizados y para todos los grupos de sustancias.

% Muestras No conformes por especie. Datos 2019 EFSA.

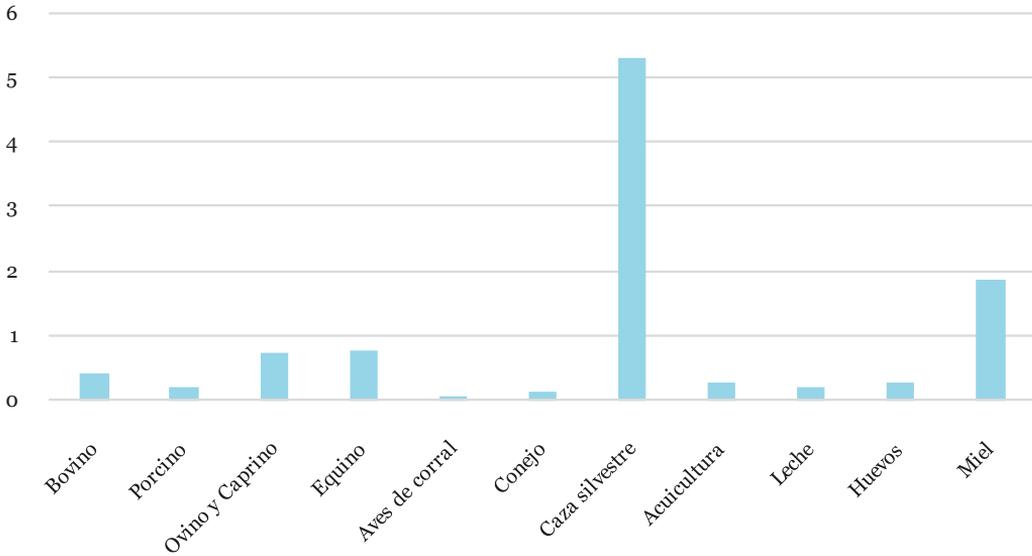


Figura 1.2. Porcentaje de muestras No conformes por especies y productos. Datos 2019 EFSA (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria, 2021).

Los valores elevados para caza silvestre, equino y ovino y caprino, se deben fundamentalmente a los resultados No conformes del grupo B3c) de metales pesados.

De acuerdo a dicho informe de EFSA, el % de muestras No conformes en 2019 fue comparable a los 11 años anteriores. Para el grupo B1 (antibacterianos), el % de muestras No conformes (0,14%) disminuyó ligeramente respecto a los años anteriores y su valor, se debió, fundamentalmente, al % de muestras No conformes en miel (0,98%) en las que se detectó la presencia de compuestos de las familias tetraciclinas, sulfonamidas y el macrólido tilosina A.

1.2. Uso de antibióticos en producción animal y su interés en Salud Pública

El primer uso de agentes anti-infecciosos en sanidad animal se remonta a inicios del siglo XX para tratar mastitis en bovino (Lees, Pelligand, Giraud, & Toutain, 2021). A partir de ahí, dentro de los medicamentos veterinarios, el grupo de agentes antiinfecciosos o antibacterianos es el más utilizado. La Unión Europea, a través del Reglamento (UE) n° 37/2010 de la Comisión, establece LMRs para estos compuestos en tejido y en productos de origen animal.

Los antibióticos se usan en sanidad animal con tres fines claramente definidos:

- Con fines terapéuticos, como tratamiento de una infección documentada.
- Con fines profilácticos, solamente en aquellos casos en que esté demostrada su importancia para prevenir una infección (por ejemplo, en los ciclos iniciales de crecimiento de animales, especialmente sensibles a agentes infecciosos muy particulares).
- Como promotores del crecimiento, favoreciéndose de esta forma el control de la flora bacteriana del animal, produciéndose un mayor aprovechamiento de los nutrientes y un aumento considerable de peso (Domínguez Rodríguez, Moreno Romo, Porrero Calonge, & Peña, 2010; Ibrahim et al., 2020). Con la publicación del Reglamento n° 1831/2003/CEE quedó prohibido el uso de antibióticos distintos de los coccidiostáticos y los histomonóstatos a partir del 1 de enero de 2006 y se indicó la supresión progresiva de los coccidiostáticos e histomonóstatos como aditivos para alimentación animal, a más tardar el 31 de diciembre de 2012 (Reglamento (CE) n°1831/2003, 2003).

En la Unión Europea, actualmente, hay algo más de 100 antibióticos autorizados para uso en producción animal pertenecientes a las familias de β -lactámicos (peni-

cilinas y cefalosporinas), tetraciclinas, aminoglucósidos, lincosamidas, macrólidos, sulfonamidas, anfenicoles, quinolonas, polipéptidos, polimixinas, pleuromutilinas, derivados de la diaminopirimidina e inhibidores de la β -lactamasa.

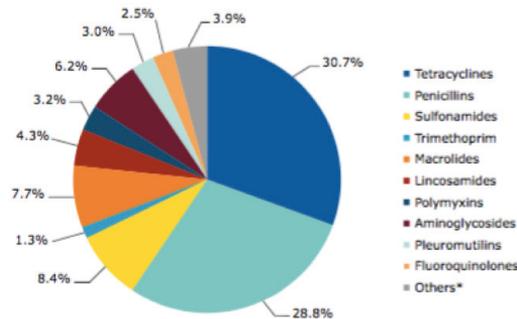
Los procedimientos para su autorización y uso son equivalentes a los utilizados para uso humano siendo imprescindible:

- a. La autorización previa a su puesta en el mercado,
- b. La prescripción veterinaria y,
- c. Que las entidades dedicadas a su distribución y dispensación estén previamente autorizadas.

La expansión global de la producción intensiva ha conducido a un aumento de uso de agentes antimicrobianos. Se estima que un 73% de todos los antimicrobianos vendidos en el mundo se usan en animales destinados al consumo humano. Algunos autores (Tiseo, Huber, Gilbert, Robinson, & Van Boeckel, 2020) estimaron que el consumo global de agentes antimicrobianos utilizados en producción animal fue de 93.309 toneladas en 2017 y que se prevé un aumento de un 11,5% antes de 2030.

Desde septiembre de 2009 España participa en el proyecto ESVAC (*European Surveillance of Veterinarian Antimicrobial Consumption*) creado para la monitorización del uso de antimicrobianos en animales, a propuesta de la Comisión a la EMA. El décimo informe del proyecto ESVAC presenta los datos de ventas de agentes antimicrobianos utilizados en veterinaria en 31 países europeos (incluida Suiza) en 2018, así como, la descripción de los cambios en el consumo de antimicrobianos utilizados en veterinaria entre los años 2010 y 2018 y el riesgo de transferencia de resistencias a humanos (*European Medicines Agency, 2021*).

La figura 1.4. muestra las ventas de antimicrobianos, expresado como porcentaje del total de ventas, utilizados en veterinaria en 31 países europeos en 2018 en, mg/PCU, distribuidas por familias de compuestos.



* Amphenicols, cephalosporins, other quinolones and other antibacterials (classified as such in the ATCvet system).

Figura 1.4. Distribución de ventas de antimicrobianos, expresado como % del total de ventas, para animales productores de alimentos por familia de antimicrobianos en 2018 en 31 países europeos (European Medicines Agency, 2021).

Se aprecia que el mayor porcentaje de ventas en 2018 se produjo para agentes anti-microbianos de la familia de tetraciclinas, seguida de penicilinas y de sulfonamidas.

El informe también indica la tendencia en las ventas de antimicrobianos utilizados en animales productores de alimentos en el periodo 2010-2018 para los distintos países. En España se alcanzó un máximo en 2014 debido a que los datos de los años anteriores se habían subestimado ya que no se habían recogido datos de los medicamentos más vendidos en 2014. Desde entonces, está disminuyendo paulatinamente a lo largo de los años.

Los principales efectos adversos debidos al uso de antibióticos son la toxicidad directa, reacciones alérgicas, efectos carcinogénicos, efectos mutagénicos, nefropatías, hepatotoxicidad, desórdenes reproductivos, toxicidad en médula ósea, des-

trucción de la microbiota presente en el tracto gastrointestinal, especialmente en niños, ancianos, embarazadas e inmunodeprimidos y aumento de la selectividad de bacterias multiresistentes o producción de resistencias antimicrobianas (Oliveira, Gonçalves, Lee, Oliveira, & Corassin, 2020).

1.2.1. Resistencias a los antibióticos

Actualmente, la resistencia a los agentes antimicrobianos (RAM) se ha convertido en un problema a nivel global en el ámbito de la Salud Pública, debido a su gran impacto sobre la salud humana y la salud animal (Martinez-Martinez & Calvo, 2010). La resistencia es la capacidad de un microorganismo para no verse afectado por los efectos de un antibiótico al que previamente era sensible. La RAM es una consecuencia de la selección natural y mutaciones genéticas y para que se desarrolle es necesario un contacto persistente del microorganismo con el antibiótico. El contacto se debe producir en una concentración de antibiótico que permita la supervivencia del microorganismo. Los mecanismos de producción pueden ser genéticos y bioquímicos.

La resistencia antimicrobiana intrínseca es una peculiaridad tanto de los microorganismos patógenos como no patógenos requerida para la supervivencia y la evolución de las bacterias en un entorno dinámico. Los principales mecanismos de la resistencia bacteriana intrínseca dependen de la impermeabilidad de la célula bacteriana a las moléculas de antibiótico, la falta de moléculas objetivo o la inactivación de los antibióticos por enzimas (Palma, Tilocca, & Roncada, 2020).

Debido al potencial de los alimentos y aguas de consumo humano para ser vehículos de microorganismos de origen animal y ambiental, se considera que la transmisión

de bacterias por los alimentos de origen animal puede tener un importante papel en la aparición de resistencias a antibióticos en los seres humanos, si bien también es muy preocupante el fenómeno desde el punto de vista de la sanidad animal (Dominguez Rodríguez, Moreno Romo, Porrero Calonge, & Peña, 2010).

En España, la coordinación del proyecto ESVAC la realiza la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS), en colaboración con la Red de Vigilancia Veterinaria de Resistencias a Antibióticos (VAV) del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid. Los datos obtenidos mediante el programa de la Red se reflejan en los correspondientes informes emitidos a los Organismos implicados que remiten dicha información a la EFSA. Esta información se incluye en el informe anual que la EFSA y el ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) realizan con la información de todos los países de la Unión Europea (VISAVET, 2021).

La Red VAV fue creada en 1996 y se orientó a estudiar las bacterias de mayor interés en Salud Pública, que son las bacterias zoonóticas presentes en los animales sacrificados en los mataderos. En la actualidad el programa incluye las especies animales de mayor producción cárnica (cerdos, pollos y bovinos), en las que se investiga la presencia de bacterias zoonóticas (*Salmonella entérica*, *C. jejuni* y *C. coli*) y comensales intestinales (*E. coli*, *Enterococcus faecium* y *E. faecalis*) y su resistencia asociada. Actualmente se está prestando gran atención a la aparición y difusión de resistencias a antimicrobianos del grupo de los β -lactámicos tras la identificación de β -lactamasas de espectro extendido y las carbapenemasas. También la reciente aparición de los genes plasmídicos ligados a la resistencia a colistina ha disparado las alertas sobre este antimicrobiano (VISAVET, 2021).

Palma et al. propusieron las siguientes acciones para prevenir el desarrollo de RAM (Palma et al., 2020):

- a. Prudente uso y manejo de antibióticos.
- b. Programas adecuados de inmunización.
- c. Uso de probióticos y/o prebióticos que pueden actuar directamente sobre la flora bacteriana, así mejorar la tasa de conversión de alimento y aumentar la competencia contra la colonización de patógenos.
- d. Uso de péptidos bioactivos con efecto bacteriostático o bactericidal, como la Nisina A, producida de forma natural por bacterias lácticas.
- e. Uso de bacterias predadoras.

Estas acciones deberían ir acompañadas de investigación científica para aumentar el conocimiento y descubrir nuevas clases de antimicrobianos y de medidas legislativas que garanticen y aseguren la salud pública.

1.3. Métodos de análisis de antibióticos utilizados en producción animal

Con el objetivo de garantizar la calidad y comparabilidad de los resultados analíticos de los laboratorios de control oficial de residuos en Europa el 17 de agosto de 2002 se publicó la Decisión de la Comisión 2002/657/CE por la que se aplicaba la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002). Se vio necesaria la utilización de sistemas de calidad y de métodos validados de acuerdo a procedimientos y criterios de funcionamiento comunes, así como, garantizar la trazabilidad con arreglo a normas comunes y consensuadas. Se establecieron criterios de veracidad, precisión, así como de criterios para la confirmación de los compuestos, estableciendo tolerancias máximas para las intensidades rela-

tivas de iones dependiendo de la técnica empleada y para el tiempo de retención relativo e implantando un sistema de puntos de identificación según la técnica y el modo de adquisición.

Por otro lado, se introdujeron los conceptos de:

-Error alfa (α): probabilidad de que la muestra analizada sea realmente conforme, aunque se haya obtenido una medición no conforme (“decisión de falso no conforme”). $\alpha = 1\%$ en sustancias no autorizadas y $\alpha = 5\%$ en sustancias autorizadas.

-Error beta (β): probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme (“decisión de falso conforme”). $\beta < 5\%$ en métodos de cribado.

-Límite de decisión ($CC\alpha$): límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error α , que una muestra no es conforme. Debe establecerse según los 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 β . Debe establecerse según los requisitos definidos de cribado, de identificación o de identificación más cuantificación.

De acuerdo a dicha Decisión, los métodos pueden ser:

-Métodos de cribado: métodos utilizados para detectar la presencia de una sustancia, o tipo de sustancias, al nivel de interés. Están diseñados para cribar grandes cantidades de muestras en busca de posibles resultados no con-

formas y para evitar resultados de falso conforme.

- Métodos de confirmación: métodos que proporcionan información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia a nivel de interés.

El 21 de mayo de 2021 se publicó el Reglamento de ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como los métodos que deben utilizarse para el muestreo (Reglamento de ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión, 2021). El Reglamento aplica a animales vivos productores de alimentos, partes y fluidos de su cuerpo, excrementos, tejidos, productos de origen animal, subproductos animales, piensos y aguas. A pesar de que con su publicación queda derogada la Decisión 2002/657/CE, se indica que ésta seguirá teniendo validez hasta el 10 de junio de 2026, en lo que respecta a los requisitos establecidos, para aquellos métodos que hayan sido validados antes de la entrada en vigor de dicho Reglamento.

En las últimas décadas, son muchísimos los artículos publicados para proponer métodos relacionados con residuos de medicamentos veterinarios en un gran número de matrices.

Entre las metodologías utilizadas para su determinación, la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (LC) acopladas a la espectrometría de masas se ha establecido como técnica de referencia.

La figura 1.5. muestra la evolución del número de artículos publicados desde 2008 hasta 2021 de acuerdo a Web of Science (WOS) usando las palabras clave “*veterinary drug*” AND “*analysis*” AND “*mass spectrometry*” (Web of Science, 2021).

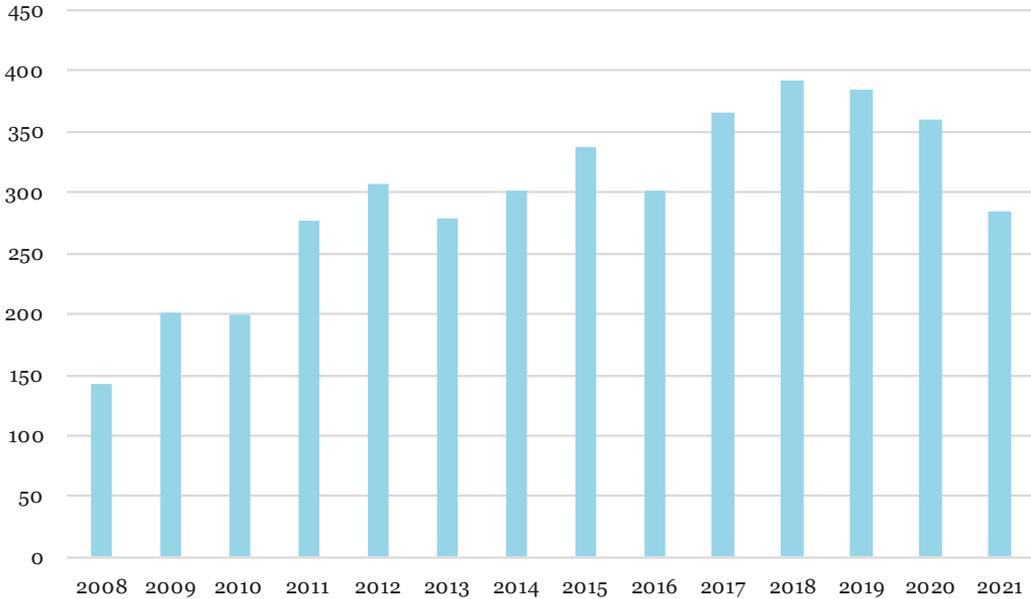


Figura 1.5. Evolución del número de artículos publicados desde 2008 hasta 2021. Fuente: WOS. Búsqueda: “*veterinary drug*” AND “*analysis*” AND “*mass spectrometry*”.

El número de artículos encontrados fue de 4.146 y fue en 2018 cuando se publicaron mayor número de trabajos, triplicando el valor más bajo, producido en 2008.

La figura 1.6. muestra la evolución del número de artículos publicados desde 2008 hasta 2021 de acuerdo a Web of Science (WOS) usando las palabras clave “*veterinary*” AND “*analysis*” AND “*mass spectrometry*” AND “*antibiotic*” (Web of Science, 2021).

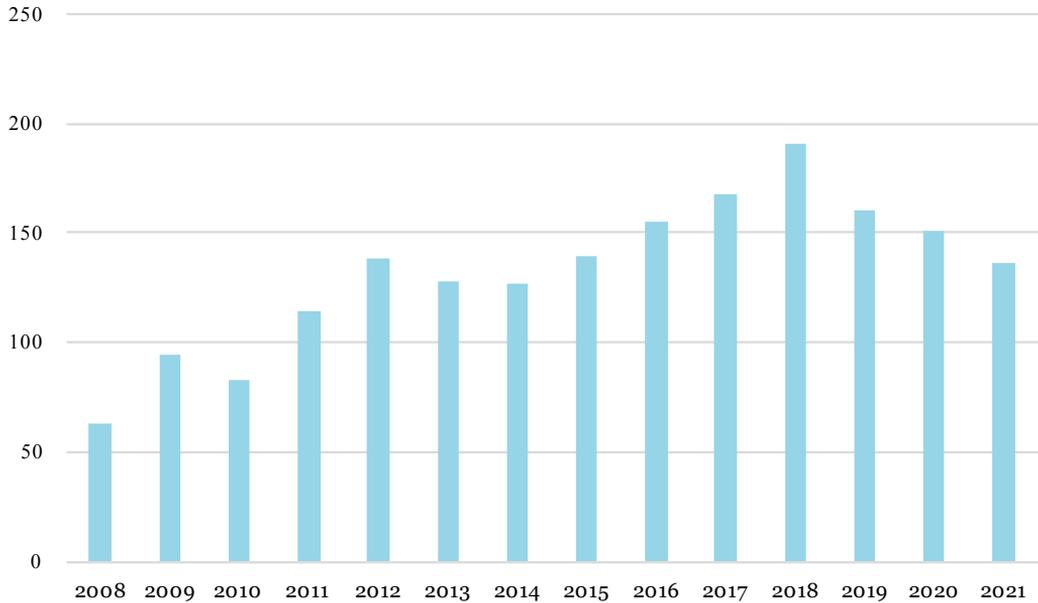


Figura 1.6. Evolución del número de artículos publicados desde 2008 hasta 2021. Fuente: WOS. Búsqueda: “*veterinary*” AND “*analysis*” AND “*mass spectrometry*” AND “*antibiotic*”.

Cuando la búsqueda se limitó al grupo de antibióticos, el número de documentos publicados en dicho periodo fue de 1.854, mostrándose una evolución similar, de manera que fue en 2018 cuando se publicaron el mayor número de artículos y también se triplicó el dato respecto al año 2008 en que se produjo el menor número de artículos publicados de ese periodo.

La tendencia actual de los métodos es la de desarrollar métodos genéricos de manera que se puedan determinar distintos residuos de contaminantes y pertenecientes a familias diferentes de compuestos con diferentes propiedades físico-químicas y que permitan, en la medida de lo posible, la incorporación de nuevos compuestos al método para ampliar su alcance. Es lo que se denominaría análisis multi-residuo y análisis multi-clase. Este es el reto que se quiso abordar al desarrollar los métodos

de esta tesis, aplicados, concretamente, al análisis de distintas familias de antibióticos en distintas matrices alimentarias, aguas de bebida para animales y pienso.

Además, para hacer la revisión de los métodos de análisis de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal, agua y piensos, propuestos por los distintos y numerosos autores, se tuvieron en cuenta las distintas etapas que componen estas metodologías analíticas:

- a. Preparación de la muestra.
- b. Análisis instrumental, que comprende tanto la separación cromatográfica como la detección por espectrometría de masas.

1.3.1. Preparación de la muestra

La etapa de preparación de la muestra comprende tanto la extracción de los analitos desde la matriz como la etapa de eliminación de interferencias de la matriz, llamada etapa de purificación, previas a la introducción del extracto en el sistema cromatográfico. En muchos casos, ambas etapas se unifican para producir la extracción de los analitos a la vez que se eliminan sustancias interferentes de la muestra. Lógicamente, todas las etapas son importantes, pero la etapa de preparación de la muestra se considera crucial ya que la composición del extracto puede tener un alto impacto en los resultados tanto desde el punto de vista cualitativo como cuantitativo.

a) Etapa de extracción

Los solventes más habituales para llevar a cabo la etapa de extracción de las muestras homogeneizadas son las mezclas acuosas y orgánicas en medio ácido. El objetivo es, además de extraer los analitos, producir la precipitación de las proteínas. La combinación de agua con acetonitrilo en medio ácido, bien ácido acético o bien áci-

do fórmico es muy frecuentemente utilizada en métodos donde se analizan distintas familias de antibióticos junto a residuos de otros compuestos como plaguicidas u otros residuos zoonosanitarios (Albero, Tadeo, Perez, Albero, Tadeo et al., 2019^a; Desmarchelier et al., 2018; Jia, Chu, Ling, Huang, & Chang, 2014; Gómez-Pérez, Romero-González, Martínez-Vidal, & Garrido Frenich, 2015a; Mol et al., 2008; Steiner, Sulyok, Malachová, Mueller, & Krska, 2020). También la combinación de solventes acetonitrilo y agua es utilizada con buenos resultados para analizar gran cantidad de compuestos (Hurtaud-Pessel, Jagadeshwar-Reddy, & Verdon, 2011; Moretti, Cruciani, Romanelli, Rossi, & Saluti, 2016; Ninga, Sapozhnikova, Lehotay, Lightfield, & Monteiro, 2020). La presencia de acetonitrilo en las combinaciones de solventes para la etapa de extracción favorece la precipitación de las proteínas, mientras que el metanol, en general, produce extractos más turbios debido a la incompleta precipitación de las proteínas. En cuanto a la acetona, esta produce buenos resultados en leche en la extracción de numerosos compuestos tanto del grupo de antibióticos como de otros contaminantes (Mol et al., 2008). Sin embargo, el acetonitrilo como único solvente de extracción puede dificultar la extracción de las familias de antibióticos más polares como, tetraciclinas, macrólidos, cefalosporinas y alguna penicilina (Boix et al., 2014; Smith, Giesecker, Reimschuessel, Decker, & Carson, 2009; Tasci, Canbay, & Doganturk, 2021; Zhan et al., 2013).

Para el análisis de algunas familias de antibióticos, como son los anfenicoles, en ocasiones se hace uso de otros disolventes orgánicos como acetato de etilo en medio básico amoniacal (Guidi, Tette, Fernandes, Silva, & Gloria, 2017; Moragues, Igualada, & León, 2016) o de 4-metil-2-pentanona (Pastor-Belda, Campillo, Arroyo-Manzanares, Hernández-Córdoba, & Viñas, 2020). También el acetato de etilo en medio ácido fue utilizado para la fase de extracción previa a la purificación para la determinación de 19 antibióticos de las familias sulfonamidas, penicilinas, qui-

nolonas, macrólidos y lincosamidas desde la matriz músculo de ave (Oyededeji, Msa-gati, Williams, & Benson, 2019).

Por otro lado, la adición de EDTA o Na_2EDTA en el solvente de extracción se hace imprescindible, especialmente para prevenir que determinados compuestos (entre ellos las tetraciclinas y macrólidos) formen quelatos con iones divalentes del medio. Este se añade bien como sólido o en disolución acuosa (Bian et al., 2019; Blasco, Corcia, & Picó, 2009; Kaufmann, Butcher, & Maden, 2012^a; Lou et al., 2020; Moretti et al., 2016; Ouma, J., Gachanja, A., Mugo, S., & Gikunju, J., 2021; Tao et al., 2012) y también añadido al llamado tampón McIlVaine (solución acuosa formada por fosfato disódico anhidro y ácido cítrico), incluso en disolución acuosa como único solvente de extracción como paso previo a la purificación mediante extracción en fase sólida (Jin, H. et al., 2010; Lu et al., 2019; Patyra, Kwiatek, Patyra, & Kwiatek, 2017).

En algunos casos, también se propone una extracción en medio básico, como es el caso de la extracción de antibióticos polipeptídicos propuesta por Bladek et al. (2020) que al ser compuestos anfipróticos, se cambia el estado de ionización de los mismos a un estado más apolar, de manera que se plantea una extracción con una combinación de acetonitrilo/agua/amoniaco 25%, 80/10/10 (v/v/v).

Cuando se trata de analizar la familia de aminoglucósidos se requiere un medio fuertemente ácido debido a que son compuestos que se unen a las proteínas de la matriz, con lo que el ácido que suele utilizarse es el ácido tricloroacético incluso al 10% de concentración para producir la rotura de enlaces covalentes y favorecer la precipitación de las proteínas (Kaufmann, Butcher, & Maden, 2012^b; Lehotay et al., 2013; Lou et al., 2020).

Otro ácido utilizado en la etapa de extracción es el ácido trifluoroacético propuesto por algunos autores para el análisis de antibióticos polipeptídicos (Boison, Lee, & Matus, 2015; Wu, Turnipseed, Andersen, & Madson, 2020).

En ocasiones, se propone realizar una hidrólisis enzimática para permitir discriminar la forma libre de los compuestos y su forma conjugada como el método propuesto por Pastor-Belda et al. (2020) para el análisis de anfenicoles y sus metabolitos glucurónidos. También la hidrólisis es necesaria cuando los analitos se unen a los azúcares, como es el caso de las sulfonamidas cuando son analizadas en la matriz miel ya que los grupos amino libres de estas se unen a los azúcares reductores como D-glucosa y D-fructosa (El Hawari et al., 2017; Hammel, Mohamed, Gremaud, LeBreton, & Guy, 2008; Louppis, Kontominas, & Papastephanou, 2017; von Eyken et al., 2019; Zhang et al., 2019).

En otros casos, se lleva a cabo una hidrólisis y derivatización para formar derivados estables. Este el caso de la hidrólisis realizada con piperidina para formar derivados más estables en β -lactámicos por Berendsen et al.(2013) o la realizada por Mompelat et al. (2015) mediante una hidrólisis con solución de 1,4-ditioeritritol a pH básico y posterior derivatización con una solución de iodoacetamida para formar derivados estables de ceftiofur y sus metabolitos, si bien, estas reacciones sólo pueden ser aplicables a pocos compuestos con estructuras muy similares pero tienen la ventaja de mejorar la exactitud y reproducibilidad del método.

Para llevar a cabo la etapa de extracción, se recurre en ocasiones a técnicas como la extracción líquida presurizada (PLE) también llamada extracción acelerada con solvente (ASE), en que la muestra homogeneizada con tierra de diatomeas conteniendo EDTA, se introduce en una celda por la que se hace pasar el solvente a alta temperatura, normalmente superior al punto de ebullición del solvente, en un siste-

ma sometido a presión, de manera que los factores influyentes son la temperatura, presión, tratamiento de la arena o tierra de diatomeas, tiempo y número de ciclos, así como, el tamaño de la celda (Blasco et al., 2009; Jiménez, Rubies, Centrich, Companyó, & Guiteras, 2011).

También se utilizan, en ocasiones, equipos de ultrasonidos o aplicación de ondas sonoras de baja frecuencia y energía mecánica en forma de cavitaciones que aumentan la eficiencia de la extracción (Bohm, Stachel, & Gowik, 2012; El Hawari et al., 2017; Magalhaes, D., Freitas, A., Vila Pouca, A.S. & Barbosa, J., 2020; Wang et al., 2014). Y la extracción asistida por microondas (MAE) ha sido propuesta de algunos autores por facilitar la extracción evaporando el agua contenida en la muestra y produciendo rotura de las paredes celulares. En este caso los factores influyentes son el tipo y concentración del solvente, la proporción sólido/líquido, la temperatura, la presión, tamaño de partículas de la muestra, así como, el número de ciclos (Albero, Tadeo, Perez, Albero, Tadeo et al., 2019b; Vanhaecke, Bussche, Wille, Bekaert, & De Brabander, 2011).

b)Etapa de purificación

La etapa de purificación es crítica debido a que el objetivo es eliminar eficazmente compuestos interferentes de la matriz sin causar pérdidas de los analitos de interés. Cuando se quiere desarrollar un método multi-residuo o multi-clase, esta etapa debe ser lo suficientemente genérica de manera que permita el análisis de compuestos con distintas propiedades físico-químicas buscando una situación de compromiso que ofrezca resultados aceptables para todos los compuestos objetivo.

La técnica más utilizada en el análisis de residuos de contaminantes y medicamentos veterinarios es la extracción en fase sólida (EFS). El grado de selectividad de-

pende de las fuerzas de atracción entre los analitos y los grupos funcionales de la superficie del sorbente. Pueden darse interacciones hidrofóbicas, hidrofílicas o de intercambio iónico. Existe una gran variedad de sorbentes que ofrecen distintas polaridades, pueden ser de fase no polar o fase reversa, de fase polar o fase normal, de intercambio iónico y de inmunoespecificidad. Elegir unos sorbentes u otros depende de las propiedades físico-químicas de los compuestos a analizar, solubilidad, pKa, estabilidad y polaridad. En general, las fases no polares son adecuadas para la extracción de compuestos orgánicos hidrofóbicos o polares desde matrices acuosas (Rossi et al., 2018).

Los sorbentes basados en sílice, como por ejemplo, de C₁₈, C₈ y NH₂ tienen el inconveniente de que tienen grupos silanoles (-SiOH) libres que pueden producir interacciones y quedar unidos a determinados compuestos. Pese a ello, han sido ampliamente utilizados en el pasado, pero en la última década, en el campo de residuos de medicamentos veterinarios, no son muchos los autores que proponen su uso. Lou et al. (2020) proponen el uso de cartuchos de C₁₈ sin realizar fase de acondicionamiento ni lavado (el llamado modo *pass-through*) para analizar aminoglucósidos en piensos para peces obteniendo buenos resultados debido a que estos compuestos altamente polares no quedaron retenidos en el cartucho de C₁₈ pero sí lo hicieron los compuestos interferentes. Sin embargo, Lu et al. (2019) ensayaron columnas C₁₈ para analizar quinolonas en carne de pollo y huevo y no obtuvieron buenos resultados para algunos compuestos como difloxacina, norfloxacina, pefloxacina y lomefloxacina. Tampoco Wang et al. (2014) obtuvieron buenas recuperaciones cuando ensayaron las columnas de C₁₈ para analizar sustancias prohibidas en piensos.

En algún caso, se ha propuesto el uso de fase normal de florisil® (gel de sílice y magnesia o silicato de magnesio activado) en modo *pass-through*, para analizar

residuos de medicamentos veterinarios y pesticidas en pienso (Gómez-Pérez et al., 2015a).

Debido a los inconvenientes de los sorbentes basados en sílice, poco a poco han ido siendo desplazados por sorbentes poliméricos que ofrecen buena capacidad de retención, tanto para compuestos polares como no polares, y estabilidad en mayor rango de pH. Estos combinan mecanismos de retención hidrofóbicos e hidrofílicos (balance hidrofílico-lipofílico o HLB). Su composición consiste en una proporción equilibrada de dos compuestos, N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica). De este tipo de sorbentes los más ampliamente utilizados son los llamados OASIS HLB® (Blasco et al., 2009; Bohm et al., 2012; Dasenaki & Thomaidis, 2015; (Harrabi, Aloulou, Rodríguez-Mozaz, Verela, & Elluech, 2018; Jin et al., 2010; Kaufmann & Widmer, 2013; Magalhaes, D., Freitas, A., Vila Pouca, A.S. & Barbosa, J., 2020; Ouma, J., Gachanja, A., Mugo, S., & Gikunju, J., 2021; Senta, Krizman-Matasic, Terzic, & Ahel, 2017; Spisso et al., 2009; Zhi et al., 2020) y los Strata X® (Berendsen, Bjorn JA, Essers, & Nielen, 2011; Berendsen et al., 2013; Dmitrovic & Durden, 2013; Lopez, Pettis, Smith, & Chu, 2008; Nozal et al., 2008; Oyedeji et al., 2019; Sollicec, Roy-Lachapelle, & Sauvé, 2015) ambos equivalentes, conteniendo los polímeros arriba indicados, pero comercializados por distintas empresas.

Hay autores que obvian la extracción en fase sólida por dar lugar a procesos tediosos de preparación de la columna, de carga del extracto, lavado y elución, además, de producir pérdidas de compuestos y tener un coste elevado (Bladek et al., 2020; Moretti et al., 2016; Ninga et al., 2020). Gaspar et al. (2019), proponen extraer con acetonitrilo y EDTA y utilizar n-hexano para purificar con extracción líquido-líquido para eliminar la grasa contenida en el salmón, en un método para analizar 44 antibióticos.

La extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) es una técnica similar a la extracción en fase sólida. En este caso la muestra se mezcla con un soporte sólido basado en sílice o polimérico y puede colocarse en una columna para la elución de los analitos o bien, mezclar con el solvente, agitar y centrifugar para obtener el extracto purificado. Esta técnica aporta las ventajas de posibilitar el análisis multi-residuo al tratarse de un método genérico, reducir el tiempo de extracción, utilización de menor cantidad de solventes, reducción de la posibilidad de formación de emulsiones y reducción del coste del análisis. Los sorbentes NH_2 y PSA son efectivos eliminando compuestos lipofílicos de alimentos de alto contenido en grasa. C_8 se emplea para eliminar compuestos no polares en alimentos de bajo contenido en grasa (Di Rocco et al., 2017). La PSA no es adecuada para análisis de B-lactámicos ya que el grupo carboxilo puede quedar retenido por la amina (Mastovska & Lightfield, 2008). Por otro lado, los sorbentes basados en dióxido de Zirconio tampoco dan buenos resultados en el análisis de B-lactámicos porque este podría reaccionar con los grupos carboxilo y hidroxilo presentes en la estructura de dichos compuestos.

El sorbente mayormente utilizado es el C_{18} (Di Rocco et al., 2017; Jank et al., 2017; Kang et al., 2017; Schneider, Lehotay, & Lightfield, 2012) si bien la PSA (amina primaria secundaria) también se utiliza con frecuencia (El Hawari et al., 2017; Song et al., 2019).

El método QuEChERS (*quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) es una forma de extracción en fase sólida dispersiva en la que se combinan distintos tipos de sorbentes, cada uno con una función determinada en el proceso de purificación del extracto. Este método fue aplicado originalmente al análisis de residuos de pesticidas (Anastassiades, Lehotay, Štajnbaher, & Schenck, 2003) y desde entonces, ha ido evolucionando para poder ser aplicado a otros residuos de contaminantes y de medicamentos veterinarios. En su versión original se realizaba una extracción con

acetonitrilo y se eliminaba el agua y proteínas de la muestra por adición de una concentración elevada de sales como NaCl y MgSO_4 (fenómeno llamado *salting out* o precipitación salina) y, posteriormente, se llevaba a cabo una extracción en fase sólida dispersiva mediante varios sorbentes como MgSO_4 , amina primaria secundaria (PSA), C_{18} y/o carbón grafitizado (este último para eliminar pigmentos vegetales). Tras el proceso de purificación, el sobrenadante se inyectaba en el sistema cromatográfico. Para poder aplicarse al análisis de residuos de medicamentos veterinarios, el método ha ido sufriendo modificaciones que consisten en seleccionar el tipo o la cantidad de sales a adicionar, ajustar la cantidad de sorbente a la cantidad de muestra, seleccionar la utilización de PSA y/o carbón grafitizado, entre otros. Por ejemplo, el uso de acetonitrilo acidificado puede producir degradación de algunos compuestos, la PSA puede adsorber compuestos ácidos y la formación de quelatos del ión Mg^{+2} con las tetraciclinas dando lugar a bajas recuperaciones, son algunos de los inconvenientes a los que enfrentarse de manera que agrupar compuestos de diferentes clases en un único método es una tarea difícil (Blasco, Masiá, Morillas, & Picó, 2011; Rejczak & Tuzimski, 2015). Pese a ello son muchos los autores que han propuesto métodos basados en QuEChERS para analizar residuos de medicamentos veterinarios, incluyendo los antibióticos en gran variedad de matrices (Abdallah, Arnaudguilhem, Jaber, & Lobinski, 2014; Aguilera-Luiz, Vidal, Romero-González, & Frenich, 2008; Chen & Schwack, 2013; De Carlo et al., 2015; Filigenzi, Ehrke, Aston, & Poppenga, 2011; Freitas, S. K. B., Paim, & de Souza e Silva, Paula Tereza, 2013; Freitas, A., Barbosa, & Ramos, 2014; Hu et al., 2014; Jin et al., 2017; Kanda et al., 2011; Lucatello et al., 2015; Orso et al., 2015; Rocha, Santos, da Silva, Júlio César C, Augusti, & Faria, 2015; Stubbings & Bigwood, 2009; Xu et al., 2021).

Otra técnica que también ha sido ensayada por algunos autores es la microextracción en fase sólida (SPME). En este caso, se produce una extracción de los analitos

desde el medio utilizando fibra de sílice fundido modificado y posteriormente, se produce una desorción de los analitos desde la fibra. Aporta la ventaja de la reducción del tiempo de preparación de la muestra, se produce no sólo la extracción, sino, además, la concentración y la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico en un solo paso. Se requiere la adecuada selección del material de cobertura dependiendo de la polaridad de los compuestos de interés siendo la combinación de divinylbenceno, carboxeno y polidimetilsiloxano la que cubre mayor rango de polaridad de los compuestos (El Hawari et al., 2017; Khaled, Belinato, & Pawliszyn, 2020; Tang, J., Wang, Shi, Hu, & Yuan, 2018).

1.3.2. Análisis Instrumental

El análisis instrumental comprende la separación de los compuestos en un sistema cromatográfico y el sistema de detección.

a) Separación cromatográfica

Para llevar a cabo la separación cromatográfica cuando se trata de desarrollar métodos multi-residuo y multi-clase que incluyan a los antibióticos, la técnica de elección es la cromatografía líquida de alta resolución. La elección de la columna cromatográfica, sus dimensiones y el tamaño de partícula son cruciales para obtener una adecuada resolución de los picos cromatográficos. La retención cromatográfica de los compuestos ionizables depende de la diferencia entre el pH de la fase móvil y el pKa del analito en la misma fase móvil y ambas magnitudes están condicionadas por el efecto del modificador orgánico sobre los valores del pKa del analito y del compuesto utilizado para tamponar la fase móvil (Subirats i Vila, Rosés Pascual, & Bosch, 2009).

Los avances en cromatografía líquida se han dirigido a disminuir el tamaño de partícula de las columnas (por debajo de 2 μm) para obtener mejores resoluciones de pico y mayor selectividad, es lo que se denomina cromatografía líquida de ultra-alta resolución o UHPLC. Esta permite aumentar la resolución incluso a flujos elevados de fase móvil, lo que produce a su vez una disminución del tiempo de análisis.

En general, en este campo, la separación cromatográfica se lleva a cabo mediante columnas de fase reversa, en que el relleno de sílice se modifica con diferentes grupos funcionales. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar.

En lo que respecta a la fase estacionaria, las más frecuentemente utilizadas están basadas en mecanismos de fase reversa de C_{18} , lo que le confiere un carácter marcadamente apolar a la columna (Bian et al., 2019; Di Rocco et al., 2017; Hurtaud-Pessel, Jagadeshwar-Reddy, & Verdon, 2011; Kang et al., 2017; Gómez-Pérez et al., 2015a; Mastovska & Lightfield, 2008; Mompelat et al., 2015) si bien el relleno puede ser modificado para darle un carácter más polar lo que, en principio, podría favorecer la separación de compuestos polares sin perjudicar la separación de los menos polares (Chiesa et al., 2015; 2018; Jia, Chu, Ling, Huang, & Chang, 2014; Turnipseed et al., 2014; Zhang et al., 2021).

Debido a la evolución de los espectrómetros de masas con su alta velocidad de adquisición de datos, se ha conseguido hacer compatible la cromatografía líquida de ultra-alta resolución con los actuales sistemas de detección. La utilización de columnas con tamaños de partícula por debajo de 2 μm y elevados flujos en sistemas cromatográficos que soportan altas presiones (>20.000 psi) han hecho posible el aumentar la eficacia de las separaciones cromatográficas. Son numerosos los autores que han propuesto estas condiciones de trabajo en los métodos aplicados a

residuos de medicamentos veterinarios (Desmarchelier et al., 2018; Gaspar et al., 2019; Ninga, Sapozhnikova, Lehotay, Lightfield, & Monteiro, 2020; Tasci, Canbay, & Doganturk, 2021; Wang et al., 2019; Xu, Y. et al., 2012).

Por otro lado, las columnas llamadas de núcleo duro, también han dado buenos resultados y su comportamiento es comparable al de columnas de tamaño de partícula $< 2 \mu\text{m}$ (Jank et al., 2017; Kaufmann, Butcher, Maden, Walker, & Widmer, 2014; Lefeuvre et al., 2017; Moretti, Cruciani, Romanelli, Rossi, & Saluti, 2016; Steiner, Sulyok, Malachová, Mueller, & Krska, 2020).

En aquellos métodos en que se incluye la familia de aminoglucósidos, al ser compuestos muy hidrofílicos, son muy difíciles de retener en las columnas convencionales por lo que se requiere fase reversa de par iónico, por ejemplo con ácido heptafluorobutírico (Kaufmann, Butcher, & Maden, 2012; Lehotay et al., 2013; Mompelat et al., 2015) o cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC) en la que la fase estacionaria es fuertemente polar y la fase móvil contiene fase orgánica en alto porcentaje y fase acuosa en bajo porcentaje (Gaugain-Juhel et al., 2009; Lou et al., 2020; Martos et al., 2010; Tao et al., 2012).

Respecto a las fases móviles utilizadas, estas suelen contener ácido fórmico o ácido acético en la fase acuosa y acetonitrilo, metanol o mezcla de ambos, acidificados o no con los ácidos anteriores, en la fase orgánica (Bian et al. 2019; Chiesa et al., 2015; 2018; Gaspar et al. 2019; Kang et al., 2017; Mastovska et al., 2017; Moretti et al., 2016; Tasci et al., 2021; Turnipseed et al., 2014; Steiner et al., 2020; Xu et al. 2012; Zhang et al. 2021). También se utilizan con frecuencia sales volátiles como el formiato amónico o el acetato amónico para tamponar la fase acuosa o también añadirlas a la fase orgánica (Desmarchelier et al., 2018; Di Rocco et al., 2018; Gómez-Pérez et al., 2015a; Jank et al., 2017; Jia et al., 2014; Lefeuvre et al., 2017).

b) Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas es una técnica esencial para la confirmación de compuestos, ya que ofrece información estructural sobre ellos. Un espectrómetro de masas trabaja con iones en forma gaseosa, con lo se requiere previamente la formación de iones en una fuente de ionización. La fuente de ionización por excelencia en el campo de residuos de medicamentos veterinarios es la de ionización por electrospray (ESI) y, de los trabajos revisados, sólo se ha propuesto la fuente de ionización química (APCI) en el análisis de anfenicoles en modo negativo (Alechaga, Moyano, & Galceran, 2013).

El acoplamiento de cromatografía líquida con espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS o LC-QqQ) es la herramienta habitual para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios debido a su fiabilidad para cuantificar y a que los criterios de confirmación están claramente definidos (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002). El trabajo en los modos *multiple reaction monitoring* (MRM) y *selected reaction monitoring* (SRM) son los métodos cuantitativos más comunes.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de alta resolución (LC-HRMS) ha ido creciendo en popularidad tanto con analizador de tiempo de vuelo (LC-TOF) como con analizador orbitrap (LC-Orbitrap). Ambos son capaces de obtener elevadas resoluciones (20.000-100.000 FWHM) y exactitud de masas < 3 ppm y permiten el análisis retrospectivo al adquirir en modo de barrido completo pero, a pesar del alto poder de resolución y de la exactitud de masa, es necesario aumentar la selectividad que ofrece la fragmentación de los iones. Esto se ha conseguido al acoplar un cuadrupolo previo para seleccionar los iones precursores creándose así equipos híbridos de LC-Q-TOF-MS y LC-Q-Orbitrap, si bien, hay que tener en cuenta que

en un equipo LC-HRMS Orbitrap, también es posible la fragmentación de iones en la llamada celda de colisión HCD (*Higher Energy Induced Dissociation*) aplicando un determinado voltaje. Los equipos con analizador de tiempo de vuelo tienen menor poder de resolución que los de analizador orbitrap y su poder de resolución es constante a lo largo de todo el rango de masas pero, en el caso del analizador orbitrap, como el poder de resolución es inversamente proporcional al cuadrado de la relación m/z , opera con poder de resolución variable, de manera que es mayor a bajas relaciones m/z (Rossi et al., 2018).

Algunos autores demuestran que cuando se utiliza un equipo de espectrometría de masas de alta resolución a resolución 70.000 FWHM (*Full Width at Half Maximum*) y una ventana de ancho de masa de 3 mDa, el desempeño para la confirmación es similar al producido por un equipo de baja resolución de triple cuadrupolo en modo SRM (Kaufmann, Butcher, Maden, Walker, & Widmer, 2015).

Aunque, en general, se considera que los equipos de triple cuadrupolo y los híbridos de alta resolución son los adecuados para desarrollar métodos de cribado y de confirmación y que los equipos LC-TOF-MS y LC-HRMS lo son solamente para métodos de cribado, aplicando los criterios de funcionamiento para la espectrometría de masas establecidos tanto en la Decisión 2002/657/CE (con validez hasta 10 de junio de 2026) (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002) como en el reglamento que la deroga, Reglamento de ejecución (UE) 2021/808 (Reglamento de ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión, 2021), también estos últimos son herramientas adecuadas de confirmación si se lleva a cabo fragmentación, aunque no se haya seleccionado previamente el ión precursor, pudiéndose calcular el *ion ratio* entre los iones diagnóstico y obteniéndose los puntos de identificación necesarios para la confirmación. Esto, siempre que se trabaje a 20.000 FWHM de resolución o superior y con una exactitud de masa < 5 ppm y, para $m/z < 200$, inferior a 1 mDa,

criterios que ya fueron propuestos por algunos autores (Lehotay, Sapozhnikova, & Mol, 2015).

La utilización de la tecnología LC-MS/MS requiere la optimización de cada compuesto de forma individual, además, se debe tener en cuenta que puede haber limitaciones en el número de transiciones que se monitorizan en un mismo *run* cromatográfico y que deben establecerse ventanas de tiempo de adquisición a lo largo del cromatograma para aumentar el número de datos que se adquieren en cada pico. Por otro lado, solamente se pueden analizar los analitos incluidos en el método y, por lo tanto, no es posible el análisis retrospectivo (Kellmann, Muenster, Zomer, & Mol, 2009). Pese a ello es una tecnología ampliamente utilizada por muchos usuarios en este campo tanto para analizar gran cantidad de analitos pertenecientes a grupos diferentes como para analizar compuestos pertenecientes a la misma familia (Chiesa et al., 2015; Desmarchelier et al., 2018; Jank et al., 2017; Mastovska & Lightfield, 2008; Moretti et al., 2016; Ninga et al., 2020; Tao et al., 2012; Tasci, Canbay, & Doganturk, 2021; Steiner et al., 2020; Wang et al., 2019).

Por otro lado, la utilización de las tecnologías LC-TOF-MS, LC-HRMS, LC-Q-TOF-MS y LC-Q-Orbitrap requiere un mayor nivel de conocimientos y experiencia en espectrometría de masas, por parte de los analistas, y mayor poder adquisitivo por parte de los laboratorios y por otro lado, ofrece las ventajas de no requerir una optimización individual de los analitos así como, la realización de análisis retrospectivo que contribuya a la detección de nuevos compuestos (Hird, Lau, Schuhmacher, & Krska, 2014; Kaufmann, Butcher, Maden, Walker, & Widmer, 2010; 2011a; 2011b; Kaufmann & Walker, 2013; Kaufmann, 2014; Stoev, Xuan, Peycheva, & Scigelova, 2012).

Son muchos los autores que las han aplicado cuando se trata de abordar análisis de residuos de medicamentos veterinarios.

Los equipos con analizador de tiempo de vuelo LC-TOF-MS y LC- Q-TOF MS han sido la elección para muchos autores, aplicando dicha tecnología al análisis de gran número de compuestos (Amelin et al., 2020; Boix et al., 2014; Gaspar et al., 2019; Peters, Bolck, Rutgers, Stolker, & Nielen, 2009; Turnipseed et al., 2014). Aunque menos habitual, algunos autores hicieron uso de un equipo con analizador de tiempo de vuelo al que previamente se le acopló una trampa de iones (LC-(IT)-TOF-MS) de manera que se pudiera realizar una selección del ión precursor para posteriormente fragmentarlo (Freitas et al., 2013; Kang et al., 2017).

En los últimos años, con el aumento de la disponibilidad de equipos LC- HRMS Orbitrap y LC-Q-Orbitrap, la técnica se ha popularizado y son muchas las propuestas de métodos con estas tecnologías (Chiesa et al., 2018; Gómez-Pérez, Plaza-Bolaños, Romero-González, Martínez-Vidal, & Garrido-Frenich, 2012; Gómez-Pérez, M. L. et al., 2014; Gómez-Pérez, Romero-González, Martínez-Vidal, & Garrido-Frenich, 2015c; Kaklamanos, Vincent, & Von Holst, 2013; Lefeuvre et al., 2017; Lou et al., 2020; Paoletti et al., 2021; Zhang et al., 2021).

Algunos autores llevaron a cabo un análisis retrospectivo tras haber analizado muestras reales. Tras el reprocesado de las muestras haciendo uso de la base de datos creada y habiendo establecido criterios para la exactitud de masa y para la abundancia de relación isotópica (RIA), entre otros, detectaron compuestos que previamente no habían sido buscados. Algunos autores detectaron sulfadiazina, trimetoprim y un plaguicida en muestras de pienso analizadas por LC-HRMS Orbitrap (León, Pastor, & Yusà, 2016) y otros detectaron un metabolito y un compuesto

de transformación de los analitos objetivo mediante LC-HRMS Orbitrap en matrices alimentarias (Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, Vidal, & Frenich, 2015b).

1.3.3.Efecto matriz

Es conocido que uno de los principales problemas de la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas es la susceptibilidad a verse afectada por componentes de la matriz que pueden alterar la eficiencia de la ionización, es el llamado efecto matriz (Furey, Moriarty, Bane, Kinsella, & Lehane, 2013). Este puede ser positivo, produciéndose un aumento de la respuesta en el equipo, es la denominada mejora o exaltación iónica, o negativo, en el que se produce una disminución de la respuesta en el equipo, y entonces se denomina, supresión iónica, producida mucho más frecuentemente que la anterior. Los diferentes mecanismos que explicarían estos fenómenos han sido propuestos por algunos autores:

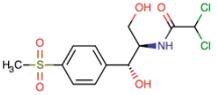
- a. Existencia de una competición entre los iones de los analitos y los iones de componentes de la matriz que coeluyen y compiten por acceder a la superficie de la gota del spray donde se produce el paso a la fase gaseosa (Freitas, L. G., Götz, Ruff, Singer, & Müller, 2004; Manini, Andreoli, & Niessen, 2004; Tang & Kebarle, 1993).
- b. Co-precipitación de los componentes de la matriz con los analitos (Annesley, 2003).
- c. Neutralización de los analitos por componentes de la matriz (Chin, Zhang, & Karnes, 2004).
- d. Presencia de altas concentraciones de aditivos en la fase móvil (Choi, Hercules, & Gusev, 2001) .
- e. El diseño de los equipos y la fuente de ionización utilizada (Mortier, Verstraete, Zhang, & Lambert, 2004).
- f. La presencia de moléculas con carga múltiple en la C-trap de los equi-

pos Orbitrap antes de la entrada en el analizador, fenómeno denominado “*post-interface ion suppression*” (Giusepponi et al., 2019; Gómez-Pérez, Romero-González, Martínez-Vidal, & Garrido Frenich, 2015a; Kaufmann, Widmer, & Maden, 2010).

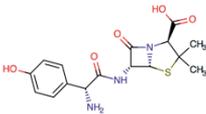
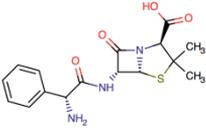
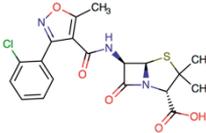
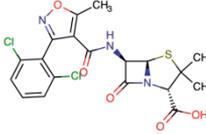
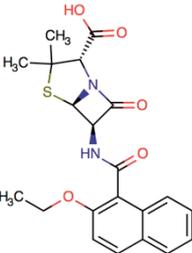
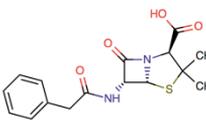
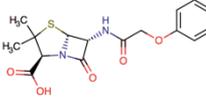
Las consecuencias directas analíticas en los casos en que tiene lugar el fenómeno son que la exactitud, la precisión, la sensibilidad y la selectividad pueden verse limitadas, especialmente, cuando se analizan cantidades bajas de compuestos en matrices complejas (Antignac et al., 2005) . Por ello, en el desarrollo de los métodos analíticos, se hace necesaria la evaluación del efecto matriz con el objeto de reducirlo, minimizarlo o compensarlo en la medida de lo posible aplicando las estrategias propuestas por algunos autores como, la extracción selectiva de los analitos, la mejora en la purificación de los extractos, la utilización de rectas de calibrado en matriz, aplicar el método de adición *standard*, utilización de patrones internos y dilución de los extractos (Ferrer, Lozano, Agera, Girn, & Fernández-Alba, 2011; Furey et al., 2013; Moragues & Igualada, 2009).

La tabla 1.2. muestra los antibióticos estudiados en esta tesis de cada familia, sus estructuras químicas y los valores de pKa de algunos de sus grupos funcionales ionizables.

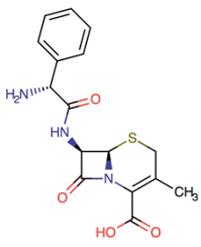
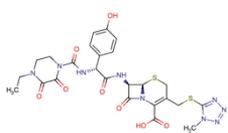
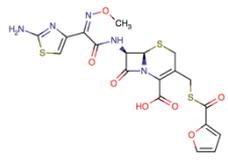
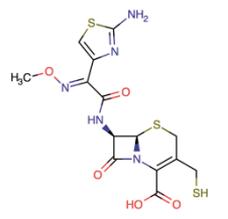
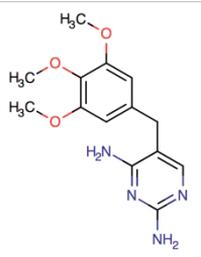
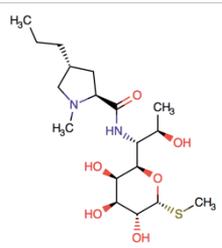
Tabla 1.2. Antibióticos estudiados en esta tesis. Sus estructuras químicas y pKa.

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
ANFENICOLES	Florfenicol		8,49
	Tianfenicol		8,75

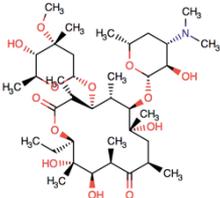
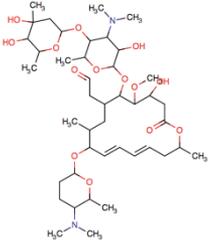
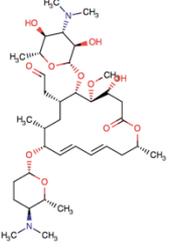
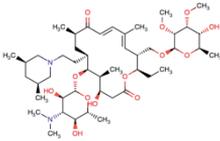
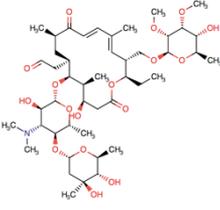
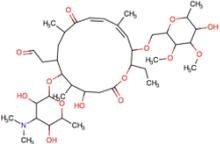
¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
	Amoxicilina		3,23/7,22
	Ampicilina		3,24/7,23
	Cloxacilina		3,75
	Dicloxacilina		3,75
β-LACTÁMICOS/ Penicilinas	Nafcilina		3,31
	Oxacilina		3,75
	Penicilina G o Benzilpenicilina		3,53
	Penicilina V o Fenoximetilpenicilina		3,39

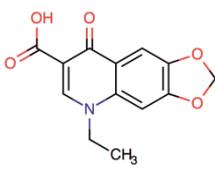
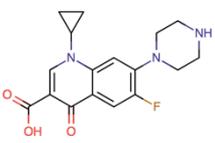
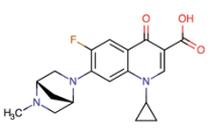
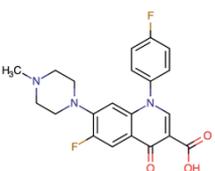
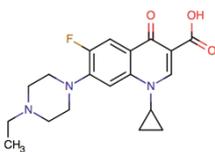
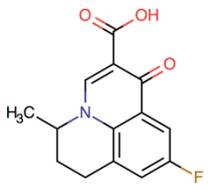
¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
β-LACTÁMICOS/ Cefalosporinas	Cefalexina		3,26/7,23
	Cefoperazona		3,19
	Ceftiofur		2,52/3,49
	Desfuroylceftiofur		2,75/3,61
DIAMINOPYRIMIDINAS	Trimetoprim		7,16
LINCOSAMIDAS	Lincomicina		7,97/12,37

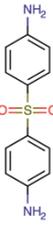
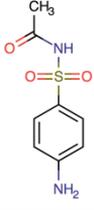
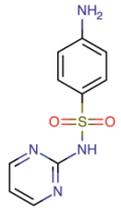
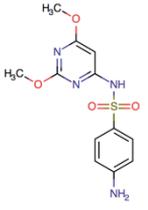
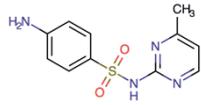
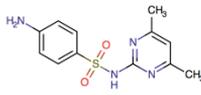
¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
MACRÓLIDOS	Eritromicina A		9,00/12,45
	Espiramicina 1		9,33/12,53
	Neospiramicina		9,34/12,65
	Tilmicosina		10,16/12,55
	Tilosina A		8,43/12,45
	Tilosina B		8,47/12,55

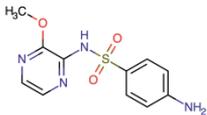
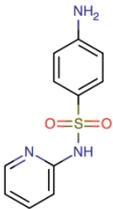
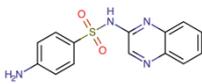
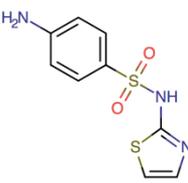
¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
	Ácido oxolínico		5,39
	Ciprofloxacina		5,56/8,77
	Danofloxacina		5,49/7,31
QUINOLONAS			
	Difloxacina		5,52/6,99
	Enrofloxacina		5,55/7,24
	Flumequina		5,81

¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
SULFONAMIDAS	Dapsona		1,57/2,39
	Sulfacetamida		2,14/4,3
	Sulfadiazina		2,01/6,99
	Sulfadimetoxina		1,99/6,91
	Sulfamerazina		2,00/6,99
	Sulfametazina		2,00/6,99

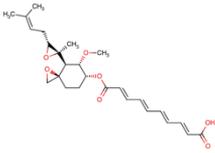
¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
SULFONAMIDAS	Sulfametoxipiridazina		1,98/5,91
	Sulfapiridina		2,14/6,24
	Sulfaquinoxalina		2,13/6,79
	Sulfatiazol		2,04/6,93

¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
TETRACICLINAS	Clortetraciclina		6,27/7,05
	Doxiciclina		5,99/7,38
	4-epi-clortetraciclina		6,27/7,05
	4-epi-oxitetraciclina		5,99/7,31
	4-epi-tetraciclina		6,31/7,24
	Oxitetraciclina		5,99/7,31
	Tetraciclina		6,31/7,24

¹ (Chemicalize, 2021)

FAMILIA	ANTIBIÓTICO	ESTRUCTURA QUÍMICA ¹	pKa ¹
ANTIBIÓTICOS POLIÉNICOS	Fumagilina		4,64

¹ (Chemicalize, 2021)

2.

Objetivos

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

2. Objetivos

Objetivo general

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y la validación de métodos analíticos para la determinación simultánea de distintas familias de antibióticos en productos de origen animal, agua de bebida para animales y pienso utilizando la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas de baja y alta resolución.

Para llevar a cabo este objetivo general, se plantean los siguientes objetivos específicos:

Objetivos específicos

1. Desarrollo y validación de un método analítico de cribado cualitativo para el análisis multi-clase de antibióticos en músculo y riñón mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de alta resolución LC-HRMS Orbitrap.
2. Desarrollo y validación de un método analítico de cribado cualitativo y cuantitativo para el análisis multi-clase de antibióticos en leche mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución LC-HRMS Orbitrap.

3. Desarrollo y validación de un método analítico de confirmación y cuantitativo para el análisis multi-clase de antibióticos en agua de bebida para los animales mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de baja resolución de triple cuadrupolo LC-MS/MS.
4. Desarrollo y validación de un método analítico de confirmación y cuantitativo para el análisis multi-clase de antibióticos en miel mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de baja resolución de triple cuadrupolo LC-MS/MS.
5. Desarrollo y validación de un método analítico de confirmación y cuantitativo para el análisis multi-clase de antibióticos en huevo mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de baja resolución de triple cuadrupolo LC-MS/MS.
6. Desarrollo y validación de un método analítico de confirmación y cuantitativo para el análisis multi-clase de antibióticos en pienso mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas de baja resolución de triple cuadrupolo LC-MS/MS.
7. Aplicación de los métodos desarrollados a muestras reales para su control y declaración de su conformidad de acuerdo a la legislación europea.

3.

Material y métodos

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

3. Material y métodos

3.1. Material, reactivos, patrones y equipos

3.1.1. Material

- Matraces aforados clase A de 1, 10, 25, 50 y 500 ml.
- Probetas graduadas Clase A de 100 ml.
- Tubos de polipropileno de 50 ml y fondo cónico con tapón de rosca.
- Tubos de polipropileno de 15 ml con tapón de rosca.
- Pipetas pasteur de vidrio.
- Columna de extracción en fase sólida STRATA X[®] (6 cc., 200 mg) (Phenomenex[®]).
- Columna de extracción en fase sólida STRATA X[®] (6 cc., 100 mg) (Phenomenex[®]).
- Columna cromatográfica Kinetex C₁₈ XB, Phenomenex[®] 2.6 µm (50 x 3,0 mm d.i.).
- Columna cromatográfica Kinetex C₁₈ XB, Phenomenex[®] 2.6 µm (100 x 2,1 mm d.i.).
- Vial filtrador para extracto redissuelto PTFE tamaño de poro 0,2 µm (Mini-Uniprep de Whatman[®]).
- Tubos eppendorf[®] con filtro de 0,22 µm de PVDF para centrífuga de Millipore[®].

3.1.2. Reactivos

- Agua ultrapura calidad para HPLC (tipo I o 18,2 MΩ).
- Metanol grado HPLC y LC-MS.
- Acetonitrilo grado HPLC y LC-MS.
- Fase sólida dispersiva Octadecilsilano (C₁₈) (50 μm).
- Acido fórmico para análisis de trazas (98-100%).
- Solución acido fórmico 0,1 % en agua.
- Solución acido fórmico 0,1% en metanol.
- Solución metanol/agua (50/50) para preparación de soluciones patrón madres e intermedias necesarias.
- Solución agua/acetonitrilo (20/80) para preparación de soluciones patrón de adición.
- Tampón McIlvaine: se pesan $10,93 \pm 0,1$ g de Na₂HPO₄ y se disuelven en 385 ml de agua ultrapura. Por otro lado, se pesan $12,9 \pm 0,1$ g de ácido cítrico y se disuelven en 615 ml de agua ultrapura. Se mezclan las dos soluciones y se comprueba que el pH presenta un valor de $4 \pm 0,3$.
- Tampón McIlvaine/EDTA: se añaden $3,72 \pm 0,1$ g de etil diamina tetra acetato disódico (EDTA.Na₂) a 1 L de tampón McIlvaine, mezclando bien la solución.
- Tampón ácido acético/acetato sódico: se pesan 16,4 g de acetato sódico trihidrato y se llevan a un volumen de 1 l con agua ultrapura. Ajustar el pH a 5,2 con ácido acético glacial.
- QuEChERS extraction salt kit EN-15662 (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g citrato sódico, 0,5 g citrato de sodio sesquihidrato) de Agilent Technologies® .
- Homogeneizadores cerámicos para tubos de 50 ml y uso en extracción con kit QuEChERS de Agilent Technologies® .
- QuEChERS fatty dispersive-SPE kit EN-15662 (150 mg PSA, 150 mg C₁₈ y 900 mg MgSO₄) de Agilent Technologies® .

3.1.3. Patrones certificados

Todos los patrones son certificados y de elevada pureza (>90%) y provienen de distintos fabricantes.

Amoxicilina, ampicilina, penicilina G, penicilina V, oxacilina, cloxacilina, dicloxacilina, cefalexina, cefoperazona, nafcilina, ceftiofur, penicilina G-D7, tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina, demeclociclina, ciprofloxacina, enrofloxacin, flumequina, ácido oxolínico, difloxacina, danofloxacina, eritromicina A, espiramicina 1, tilmicosina, tilosina A, sulfatiazol, sulfadiazina, sulfamerazina, sulfacetamida, sulfadimetoxina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfapiridina, sulfaquinoxalina, sulfametazina-fenil-¹³C₆, dapsona, fumagilina, trimetoprim, florfenicol y tianfenicol, de Sigma-Aldrich® (St.Louis, MO, USA).

Lincomicina y Roxitromicina, de Honeywell Riedel-de Haën ®, AG. (Seelze, Germany).

Desfuroylceftiofur, amoxicilina-D4, neospiramicina y Tilosina B o Desmicosina de Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá).

4-epi-tetraciclina, 4-epi-clortetraciclina y 4-epi-oxitetraciclina, Acros Organics® (Geel, Belgium).

Norfloxacina-D5 y sulfadimetoxina-D6, de WITEGA® (Berlin, Germany).

Las soluciones madre de cada patrón individual tienen una concentración que oscila entre 200-1000 µg/ml y se disuelven en distintos solventes según los casos. Todas las soluciones madre de β-lactámicos se disuelven en una mezcla agua/metanol

(50/50) y las soluciones madre restantes en metanol. Se conservan todas ellas en congelación a una $T^a \geq -18^\circ\text{C}$ y por un período que oscila entre 2 meses en el caso de las soluciones de β -lactámicos y 6 meses para las restantes.

3.1.4. Equipos

- Pipeta automática 10 -100 μl , resolución 0,1 μl .
- Pipeta automática 20-200 μl , resolución 0,1 μl .
- Pipeta automática 100 - 1000 μl , resolución 1 μl .
- Pipeta automática 1-5 ml, resolución 5 μl .
- Pipeta automática 1-10 ml, resolución 5 μl .
- Balanza analítica de resolución 0,1 mg (Mettler-Toledo®)
- Balanza granatario de resolución 0,01 g.
- Centrífuga refrigerada de gran capacidad (8 x 50 ml) (5.000 rpm y 12.000 rpm) (Allegra X-15 ® Beckman Coulter ®, Barcelona, Spain).
- Microcentrífuga refrigerada (13.000 rpm) (Eppendorf®)
- Picadora (Moulinex®)
- Ultra-turrax T25 ®(IKA® Werke Gmgh & Co KG, Staufen, Germany).
- Agitatubos orbital Vortex®(IKA® Werke Gmgh & Co KG, Staufen, Germany).
- Multiagitador de tubos de rodillos Roller 10®(IKA® Werke Gmgh & Co KG, Staufen, Germany).
- Sistema de extracción en fase sólida conectado a bomba de vacío (Supelco®).
- Sistema de evaporación con corriente de Nitrógeno TurboVap LV ®(Zy-mark® Corporation, Framingham, MA).
- Congelador $\leq -20^\circ\text{C}$.
- Frigorífico $\leq 8^\circ\text{C}$.

- Equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de espectrometría de masas de alta resolución y sistema informático de tratamiento de datos cromatográficos y espectrales. El equipo consta de bomba Accela™ de UHPLC Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany), desgasificador a vacío, inyector, horno para columnas termostaticado, espectrómetro de masas Orbitrap Exactive™ (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) equipado con fuente de ionización *Heated Electrospray* (HESI-II) y software de adquisición y procesado de datos Trace Finder™.
- Equipo de cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo y sistema informático de tratamiento de datos cromatográficos y espectrales. El equipo consta de bomba de UHPLC Ultimate 3000® (Thermo Scientific Dionex, Germering, Germany), desgasificador a vacío, inyector, horno para columnas termostaticado, espectrómetro de masas de triple cuadrupolo TSQ Quantiva® (Thermo Scientific, San José CA, USA) equipado con fuente de ionización *Heated Electrospray* (HESI) y software de adquisición y procesado de datos Trace Finder™.

3.2. Muestras

Todas las muestras fueron tomadas por inspectores veterinarios en el marco del Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR) (R.D.1749/1998).

Las muestras de músculo y riñón utilizadas fueron tomadas en mataderos de toda la Comunidad Valenciana. Las muestras de músculo fueron de las especies bovino, porcino, ovino, equino, ave y cunícola y las de riñón de las especies bovino, porcino, ovino y equino.

Las muestras de leche fueron tomadas en granjas de la Comunidad Valenciana por inspectores veterinarios y también obtenidas de fábricas de quesos de la Comunidad Valenciana. Fueron muestras de las especies bovino, caprino y ovino.

Las muestras de agua de bebida para animales y de pienso fueron tomadas en explotaciones ganaderas, las de huevo, en centros de envasado de huevos de gallina y las de miel, tanto en comercio minorista como en explotaciones apícolas de toda la Comunidad Valenciana.

Todas las muestras fueron tomadas por triplicado y, siguiendo lo establecido en el Real Decreto 1945/1983 (R.D. 1945/1983) y Real Decreto 1749/1998 (R.D.1749/1998), se mantuvieron en congelación (-20°C) en el caso de tejido, leche, agua; en refrigeración (8°C) en el caso de huevo y a T^a ambiente en el caso de piensos y miel hasta el momento del análisis. A las muestras de tejido, tras su descongelación, se les eliminó la parte visible de grasa y fueron homogeneizadas mediante picadora. Por su parte, las muestras de leche y agua, tras ser atemperadas fueron homogeneizadas por agitación del envase. Las muestras de huevo fueron homogeneizadas mediante equipo Ultraturrax ®. Las muestras de miel fueron homogeneizadas manualmente en su propio envase, antes de ser pesadas y, finalmente, las muestras de pienso fueron molidas en picadoras tipo Moulinex ®.

3.3. Experimental

La figura 3.1 esquematiza los experimentos llevados a cabo de forma secuencial en esta tesis para el desarrollo y validación los distintos métodos, en las distintas matrices, realizados con las tecnologías LC-HRMS y LC-MS/MS.

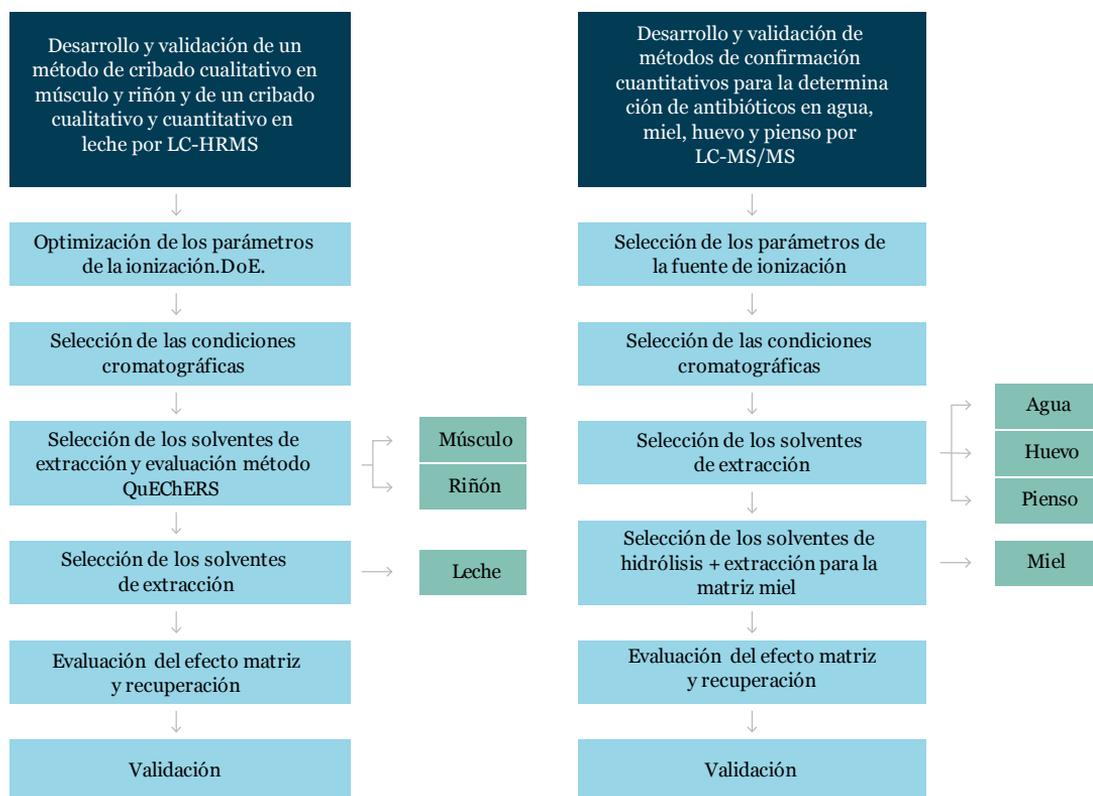


Figura 3.1. Experimentos llevados a cabo para el desarrollo y validación de los métodos por LC-HR-MS y LC-MS/MS.

3.3.1. Desarrollo y validación de Un método de cribado cualitativo en músculo y riñón y de Un método de cribado cualitativo y cuantitativo en leche para análisis de antibióticos por LC-HRMS.

La figura 3.2 muestra el esquema general de los métodos propuestos para las matrices músculo, riñón y leche por LC-HRMS incluyendo las distintas etapas de los mismos hasta la obtención del extracto final previa al análisis instrumental.

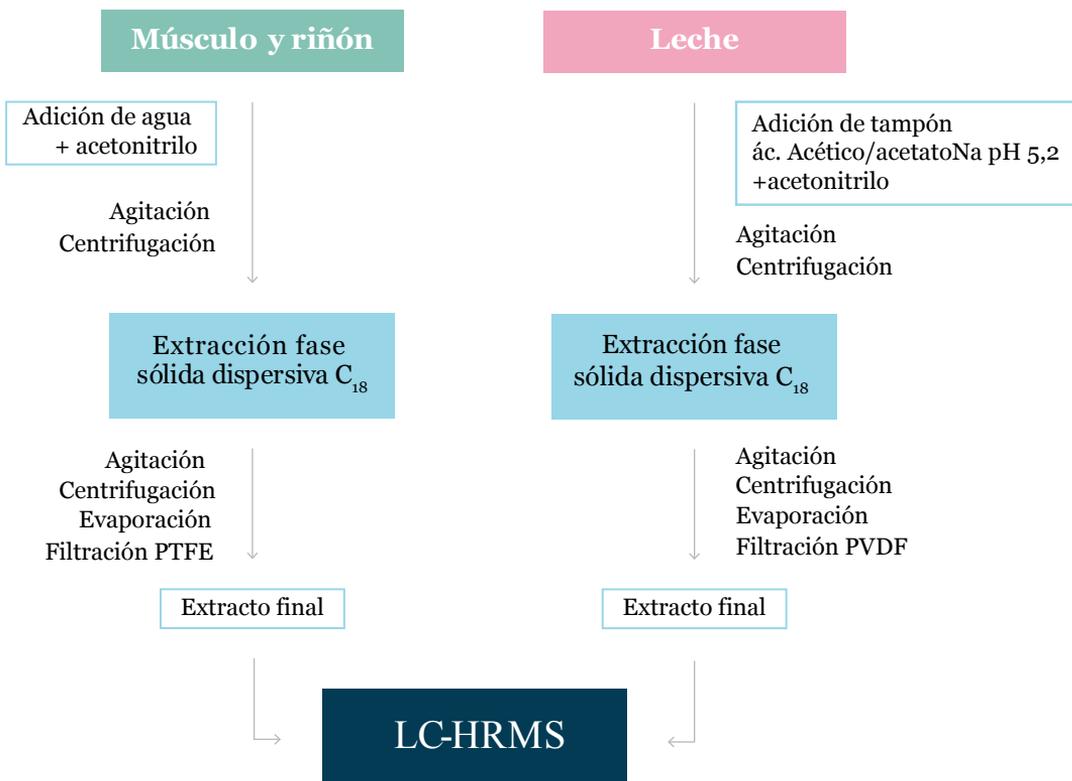


Figura 3.2. Esquema general de los métodos propuestos para las matrices músculo, riñón y leche por LC-HRMS.

La tabla 3.1. incluye los antibióticos estudiados para músculo, riñón y leche por LC-HRMS, así como su fórmula molecular, masa monoisotópica y masa molecular de los iones diagnóstico para cada uno de ellos.

Tabla 3-1. Antibióticos, fórmula molecular, masa monoisotópica y masa molecular de los iones diagnósticos, estudiados en músculo, riñón y leche por LC-HRMS.

Familia	Antibiótico	Patrón Interno	Fórmula molecular	Masa monoisotópica	Ión diagnóstico	
Macrólidos	Espiramicina 1		$C_{43}H_{74}N_2O_{14}$	842,51455	$[M+2H]^{+2}$ 422,26427	
	Neospiramicina		$C_{36}H_{62}N_2O_{11}$	698,43481	$[M+2H]^{+2}$ 350,22496	
	Tilosina A	Roxitromicina	$C_{46}H_{77}NO_{17}$	915,51970	$[M+H]^+$ 916,52643	
	Eritromicina A		$C_{37}H_{67}NO_{13}$	733,46124	$[M+H]^+$ 734,46852	
	Tilmicosina		$C_{46}H_{80}N_2O_{13}$	868,56658	$[M+H]^+$ 869,57332	
	Lincosamidas	Lincomicina	Roxitromicina	$C_{18}H_{34}N_2O_6S$	406,21376	$[M+H]^+$ 407,22104
Sulfonamidas	Sulfatiazol		$C_9H_9N_3O_2S_2$	255,01417	$[M+H]^+$ 256,02089	
	Sulfapiridina		$C_{11}H_{11}N_3O_2S$	249,05775	$[M+H]^+$ 250,06447	
	Sulfametoxipiridacina		$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	310,07412	$[M+H]^+$ 311,08085	
	Sulfametazina		$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278,08429	$[M+H]^+$ 279,09102	
	Sulfaquinoxalina	Sulfadimetoxina-d6	$C_{14}H_{12}N_4O_2S$	300,06865	$[M+H]^+$ 301,07537	
	Sulfadimetoxina		$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	310,07412	$[M+H]^+$ 311,08085	
	Sulfadiazina		$C_{10}H_{10}N_4O_2S$	250,05245	$[M+H]^+$ 251,05972	
	Sulfamerazina		$C_{11}H_{12}N_4O_2S$	264,06864	$[M+H]^+$ 265,07537	
	Sulfacetamida		$C_8H_{10}N_2O_3S$	214,04176	$[M+H]^+$ 215,04849	
	Quinolonas	Ácido oxolínico		$C_{13}H_{11}NO_5$	261,06427	$[M+H]^+$ 262,07100
		Flumequina		$C_{14}H_{12}FNO_3$	261,08067	$[M+H]^+$ 262,08740
		Danofloxacina		$C_{19}H_{20}FN_3O_3$	357,14942	$[M+H]^+$ 358,15615
		Ciprofloxacina	Norfloxacina-d5	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$	331,13322	$[M+H]^+$ 332,14050
		Difloxacina		$C_{21}H_{19}F_2NO_3$	399,14000	$[M+H]^+$ 400,14672
Enrofloxacina		$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	359,16507	$[M+H]^+$ 360,17180		

Familia	Antibiótico	Patrón Interno	Fórmula molecular	Masa monoisotópica	Ión diagnóstico	
Tetraciclinas	Clortetraciclina		$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	478,11429	$[M+H]^+$	
	Doxiciclina		$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444,15381	$[M+H]^+$	
	Oxitetraciclina		$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460,14818	$[M+H]^+$	
	Tetraciclina	Demeclociclina		444,15327	$[M+H]^+$	
	4-Epi-tetraciclina		$C_{22}H_{24}N_2O_8$	444,15327	$[M+H]^+$	
	4-Epi-oxitetraciclina		$C_{22}H_{24}N_2O_9$	460,14818	$[M+H]^+$	
	4-Epi-clortetraciclina		$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$	478,11429	$[M+H]^+$	
	Amoxicilina	Amoxicilina-d4		365,10509	$[M+H]^+$	
β -lactámicos	Ampicilina		$C_{16}H_{19}N_3O_5S$	349,11018	$[M+H]^+$	
	Penicilina G		$C_{16}H_{18}N_2O_4S$	334,09928	$[M-H]^-$	
	Penicilina V		$C_{16}H_{18}N_2O_5S$	350,09419	$[M-H]^-$	
	Oxacilina		$C_{19}H_{19}N_3O_5S$	401,10509	$[M-H]^-$	
	Cloxacilina		$C_{19}H_{18}ClN_3O_5S$	435,06612	$[M-H]^-$	
	Dicloxacilina	Penicilina G-d7		469,02715	$[M-H]^-$	
	Cefalexina		$C_{16}H_{17}N_3O_5S$	347,09453	$[M+H]^+$	
	Nafticilina		$C_{21}H_{22}N_2O_5S$	414,12549	$[M-H]^-$	
	Desfurilceftiofur		$C_{14}H_{15}N_5O_5S_3$	429,02408	$[M+H]^+$	
	Ceftiofur		$C_{19}H_{17}N_5O_5S_3$	523,02846	$[M+H]^+$	
	Cefoperazona		$C_{23}H_{27}N_9O_8S_2$	645,14239	$[M-H]^-$	
	Patrones internos	Roxitromicina		$C_{41}H_{76}N_2O_{15}$	836,52457	$[M+H]^+$
Sulfadimetoxina-d6			$C_{12}H_8D_6N_2O_4S$	316,11124	$[M+H]^+$	
Norfloxacina-d5			$C_{16}H_{13}D_5FN_3O_3$	324,16460	$[M+H]^+$	
Demeclociclina			$C_{21}H_{21}ClN_2O_8$	464,09864	$[M+H]^+$	
Penicilina G-d7			$C_{16}H_{11}D_7N_2O_4S$	341,14266	$[M-H]^-$	
Amoxicilina-d4			$C_{16}H_{15}D_4N_3O_5S$	369,12965	$[M+H]^+$	

3.3.1.1. Optimización de los parámetros de la fuente de ionización

Los principales factores que afectan a la eficiencia de la fuente de iones Heat Electropray (HESI) son: *sheath gas pressure (SGP)*, *auxiliary gas (AG)*, *spray voltage (SV)*, *capillary temperature (CT)*, *capillary voltage (CV)*, *skimmer voltage (SKV)* y *heater temperature (HT)*. Teniendo en cuenta la posible interacción de estos parámetros, se decidió aplicar la metodología de optimización multivariante mediante el uso del diseño de experimentos (DoE) al igual que había sido aplicado anteriormente para otros métodos en el laboratorio (Coscollà, León, Pastor, & Yusà, 2014; León, Pastor, & Yusà, 2016; Roca, León, Pastor, & Yusà, 2014).

Los diferentes parámetros que afectan a la fuente de ionización y, por tanto, a la respuesta analítica, fueron optimizados en dos etapas:

- a. Etapa de *screening* mediante un diseño Plackett-Burman (PB) con objeto de seleccionar los parámetros que tienen una influencia en la señal.
- b. Optimización de los parámetros relevantes mediante Diseño Central Compuesto (CCD). Para ello se hizo uso del software estadístico Minitab® 14.

Los rangos investigados para los siete parámetros en el cribado Plackett-Burman fueron *sheath gas pressure* (20-60, au), *auxiliary gas* (10-20, au), *spray voltage* (2-4, KV), *capillary temperature* (100-450 ° C), *skimmer voltage* (10-50, V), *heater temperature* (100-500 ° C) y *capillary voltage* (20-70 V). El diseño PB asume que no hay interacciones y, por lo tanto, los principales efectos se calcularon con un número reducido de experimentos. En total, se llevaron a cabo 30 experimentos (15 *runs*, 2 replicados, 6 puntos centrales).

El CCD se utilizó para definir los valores óptimos de los parámetros más influyentes. Este tipo de diseño experimental permitió construir una superficie de respuesta

para cada compuesto y encontrar las condiciones que dan lugar a una respuesta óptima para todos los analitos. El CCD consistió en un diseño *full factorial* 2^3 (2 replicados, 16 *cube points*), 12 *axial points* y 12 *central points* en el cubo, ello implicó 40 *runs* cromatográficos aleatorizados. Las respuestas obtenidas fueron ajustadas por una ecuación de regresión múltiple, incluyendo el segundo orden (curvatura) y los términos de interacción.

3.3.1.2. Selección de las condiciones cromatográficas

Teniendo en cuenta que, cuando se trabaja con espectrómetros de alta resolución y masa exacta, pese a su alto grado de selectividad, también es crítico tener una adecuada separación cromatográfica debido a que la coelución de compuestos puede afectar a la asignación de la masa exacta en el equipo (Kaufmann, 2014; Kellmann, Muenster, Zomer, & Mol, 2009) se realizó selección de la columna cromatográfica. Los criterios de selección de la misma fueron: alta capacidad de retención de los compuestos más polares, adecuada separación cromatográfica de los 46 compuestos objeto de análisis, simetría de picos, aceptable respuesta analítica, aceptable tiempo de análisis y posibilidad de ampliación a otros compuestos en el futuro.

En base a esto se ensayó la columna Hypersil Gold (C₁₈) (100 x 2,1 mm d.i. 1,9 µm) Thermo Fisher Scientific® con un gradiente cromatográfico con 4 combinaciones de fase móvil cuya fase acuosa era ácido acético 0,1% o ácido fórmico 0,1% y la fase orgánica acetonitrilo o metanol conteniendo ácido acético 0,1% o ácido fórmico 0,1 %.

Finalmente, otra columna ensayada fue la columna Kinetex C₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2.6 µm) Phenomenex® con gradiente igual al ensayado en la columna anterior y las mismas composiciones de fase móvil.

Las experiencias se realizaron inyectando una solución patrón de 40 ng/ml de cada compuesto en solvente de composición similar a las condiciones iniciales de la cromatografía en estudio.

3.3.1.3. Selección de los solventes de extracción

Se probaron distintas combinaciones de solventes de extracción:

- a. agua/acetonitrilo (20/80)
- b. tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80)
- c. tampón McIlvaine-Na₂EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80)
- d. acetonitrilo como único solvente (sólo en matriz leche).

La combinación agua/acetonitrilo había sido utilizada por otros autores para la extracción de β-lactámicos en tejido animal (Fagerquist, Lightfield, Lehotay, 2005); el tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2 se había aplicado en la extracción de otros residuos veterinarios (Vanhaecke, Bussche, Wille, Bekaert, & Brabander, 2011) y el tampón McIlvaine- Na₂EDTA históricamente utilizado para la extracción de tetraciclinas desde tejido animal y otras matrices con el objeto de evitar la formación de quelatos de estos compuestos con iones divalentes (Oka, Ikai, Ito, Hayakawa, Harada, Suzuki, Odani, & Maeda, 1997; Oka, Ito, Ikai, Kagami, & Ken-ichi Harada, 1998; Stolker & Brinkman, 2005). Las extracciones con los distintos solventes se realizaron tras la adición de los analitos objeto de estudio a muestras de músculo y riñón de bovino de manera que su concentración fuera 20 µg/kg. En

el caso de la matriz leche, se adicionaron los analitos a muestras de leche de cabra de manera que su concentración fuera $\frac{1}{2}$ Límite Máximo de Residuo (LMR) para cada compuesto. Para los compuestos sin LMR en leche, se consideró $\frac{1}{2}$ LMR en músculo. Posteriormente se procesaron de acuerdo al método genérico ya aplicado en el laboratorio para la determinación de β -lactámicos en músculo y riñón animal (Fagerquist, Lightfield, & Lehotay, 2005) modificando el solvente de extracción. A 1 g de muestra se le añadieron 10 ml de los solventes de extracción (2 ml de fase acuosa + 8 ml de fase orgánica y para el acetonitrilo, 10 ml de este), tras agitación durante 10 minutos, se centrifugó a 5.000 rpm, 5 minutos, a 15°C. Se pasó todo el sobrenadante a un tubo conteniendo 0,5 g de C_{18} de 50 μm , se agitó 5 minutos y centrifugó de nuevo a 5.000 rpm 5 minutos a 15°C. El extracto se llevó a sequedad en corriente de N_2 y, posteriormente, se redisolvió el extracto seco con 1 ml de una solución similar a la composición de la fase móvil en las condiciones cromatográficas iniciales y ayudándose de baño de ultrasonidos. Se tomaron 0,5 ml del extracto y se filtraron mediante ultracentrifugación (13.000 rpm, 10 min, a 4°C) con filtro de 0,2 μm de tamaño de poro para inyectar 10 μl en el sistema cromatográfico. Para la matriz leche se procedió de igual forma, pero partiendo de 3 g de muestra y redisolviendo el extracto final en 300 μl , para alcanzar los límites deseados (Igualada, Giraldo, Font, & Yusà, 2021).

La selección del solvente de extracción se realizó en base a las respuestas absolutas medias de cada compuesto tras realizar tres réplicas mediante cada solvente probado, a la simplicidad de preparación de la mezcla de solventes y a la detección o no de la totalidad de los compuestos.

3.3.1.4. Evaluación método QuEChERS aplicado a músculo y riñón

Además de optimizar la extracción con diferentes mezclas de solventes y purificación posterior con extracción en fase sólida dispersiva (dSPE), también se llevó a cabo la evaluación del tratamiento de la muestra (extracción y purificación) mediante el método QuEChERS (*Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe*) utilizado por primera vez para análisis de plaguicidas en vegetales (Anastassiades, Lehotay, Stajnbaher, & Schenck, 2003) y, posteriormente, ampliamente utilizado en análisis de residuos en alimentos, productos de origen animal e incluso piensos (De Carlo, Rivoira, Ciofi, Ancillotti, Checchini, Del Bubba, & Bruzzoniti, 2015; Hu, Bian, Liu, Su, Zhou, Song, & He, 2014; León, Roca, Igualada, Martins, Pastor, & Yusà, 2012; León, Pastor, & Yusà, 2016; Rejczak & Tuzimski, 2015; Rúbies, Antkowiak, Granados, Compañó, & Centrich, 2015).

De acuerdo a experiencias previas en el laboratorio sobre la aplicación de este método en el análisis de otros grupos de residuos veterinarios, el método evaluado fue el basado en el método del *European Committee for Standardization (CEN) Standard Method UNE-EN 15662*, tanto en la fase de extracción como en la de purificación. El método consistió en añadir a 2 g de tejido homogeneizado 10 ml de acetonitrilo, 2 homogeneizadores cerámicos y las sales de extracción del método EN (4 g MgSO_4 , 1 g NaCl, 1 g citrato sódico, 0,5 g citrato de sodio sesquihidrato), agitar y centrifugar, transferir el sobrenadante a un tubo conteniendo las sales de purificación, EN *fatty dispersive-SPE* (150 mg PSA, 150 mg C_{18} y 900 mg MgSO_4), agitar y centrifugar, evaporar en corriente de nitrógeno y redisolución en 2 ml de solución de composición similar a las condiciones iniciales del método cromatográfico.

Con el objetivo de poder comparar este método con los anteriores, se realizó una adaptación en el mismo respecto a las recomendaciones del fabricante, de manera

que el extracto final contuviese la misma proporción de matriz, para ello se partió de 2 g de muestra, se tomó todo el sobrenadante para pasar a la etapa de purificación, y, tras la evaporación del extracto, el residuo fue redisolto en 2 ml de la mezcla de solventes similar a las condiciones iniciales cromatográficas.

El procedimiento se aplicó tras la adición de los analitos objeto de estudio a muestras de músculo y riñón de bovino de manera que su concentración fuera 20 µg/kg y la evaluación se realizó en base a las respuestas absolutas medias tras realizar tres réplicas.

3.3.1.5. Evaluación del efecto matriz y la recuperación

Para llevar a cabo este estudio se procedió del mismo modo que había sido aplicado con anterioridad (León et al., 2012; Moragues & Igualada, 2009). Se realizaron 3 sets de muestras con 3 replicados cada uno set 1, 2 y 3:

Set 1: consistió en 3 replicados de una solución patrón conteniendo todos los analitos (incluidos los patrones internos) a una concentración equivalente al CC β para la matriz músculo tanto para músculo como para riñón (con el fin de hacer comparables los resultados de las matrices músculo y riñón).

Set 2: consistió en 3 replicados de músculo bovino y riñón bovino extraídos por el método seleccionado y cuyo extracto final se redisolvió en 1 ml de la solución patrón anterior.

Set 3: consistió en 3 replicados de músculo bovino y 3 replicados de riñón bovino que fueron adicionados previamente a la extracción de manera que la concentración en extracto final fuera la misma que la obtenida en los sets anteriores.

Para obtener el efecto matriz (EM%), en primer lugar se calculó el % de respuesta obtenido para cada analito en el set 2 respecto al set 1, comparando la media de las áreas absolutas de cada analito en los 3 replicados obtenidos en el set 2 con la media de las áreas absolutas de los 3 replicados obtenidos en el set 1, y después se calculó el EM % por diferencia con 100. Según las fórmulas:

$$\% \text{Respuesta}_{2-1} = \frac{\text{Area set 2}}{\text{Area set 1}} \times 100$$

$$\text{EM \%} = \% \text{ Respuesta}_{2-1} - 100$$

Valores de EM % negativos se consideraron supresión iónica y valores de EM % positivos, exaltación iónica.

Para obtener la recuperación se compararon la media de las áreas absolutas de cada analito en los 3 replicados obtenidos en el set 3 con la media de las áreas absolutas de los 3 replicados obtenidos en el set 2. Según la fórmula:

$$\text{RE \%} = \frac{\text{Area set 3}}{\text{Area set 2}} \times 100$$

En el caso de la matriz leche, al tratarse de un método cuantitativo, el estudio del efecto matriz se llevó a cabo a tres niveles de concentración: nivel bajo (que coincidió con el CC β y el límite de cuantificación del método cuantitativo); nivel medio (que coincidió con el LMR para los compuestos con LMR establecido para leche y el LMR para la matriz músculo, en el caso de los compuestos para los que no existe un LMR en leche; y nivel superior (que coincidió con 2xLMR para algunos compuestos o con 4xLMR para otros). Al igual que en el caso de las matrices músculo y riñón, el estudio del efecto matriz, se llevó a cabo mediante la realización de 3 sets de muestras con 3 replicados cada uno set 1, 2 y 3 a los tres niveles de concentración

mencionados utilizando para ello leche de cabra. En el caso de los patrones internos, la concentración estudiada fue en todos los casos 100 µg/Kg.

3.3.1.6. Validación de los métodos de cribado por LC-HRMS

La validación de los métodos de cribado cualitativo (músculo y riñón) y de cribado cuantitativo (leche) se llevó a cabo atendiendo a las recomendaciones de la Guía para la validación de métodos de *screening* de los Laboratorios Comunitarios de Referencia (20/1/2010) (Community Reference Laboratories (CRLs), 2010) en lo que a métodos de screening físico-químicos se refiere, y de la Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 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.

Las especies animales incluidas en la validación fueron: bovino, equino, ovino, porcino, ave y conejo en el caso de músculo; bovino, equino, ovino y porcino, en el caso de riñón y bovino, ovino y caprino en el caso de leche.

Los parámetros estudiados fueron:

a) Especificidad. *Threshold value T*

El estudio de especificidad se llevó a cabo analizando 20 muestras de músculo (4 de bovino, 2 de equino, 3 de ovino, 5 de porcino, 4 de ave y 2 de conejo), 20 muestras de riñón (5 de bovino, 2 de equino, 5 de ovino y 8 de porcino) y 20 muestras de leche (5 de bovino, 7 de ovino y 8 de caprino). Se observó la respuesta relativa

en la región de tiempo de retención relativo de los analitos (área en el tiempo de retención de los analitos /área patrón interno) y se calculó el *Threshold value T* mediante la fórmula:

$$T = B + (1.64 \times \text{SDb}) \text{ donde,}$$

$T = \text{Threshold value } T.$

$B = \text{Valor medio de la respuesta relativa de los blancos.}$

$\text{SDb} = \text{Desviación estándar de la respuesta relativa de los blancos.}$

b) Cut-off Factor Fm y CC β

Las mismas muestras utilizadas en el estudio de especificidad fueron adicionadas a la concentración del *screening* que se estableció como 1/4 del Límite Máximo de Residuo para cada compuesto. En el caso de la matriz leche, esta se estableció, en algún caso (ampicilina, ceftiofur y desfuroilceftiofur), como 1/2 del Límite Máximo de Residuo.

El *cut-off factor* F_m se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$F_m = M - (1.64 \times \text{SD}) \text{ donde,}$$

$F_m = \text{Cut-off factor}$

$M = \text{Valor medio de las respuestas relativas en las muestras adicionadas a la concentración del } \textit{screening}.$

$\text{SD} = \text{Desviación estándar de la respuesta relativa en las muestras adicionadas.}$

También en este caso las respuestas que se tomaron fueron las respuestas relativas (área analito/área patrón interno) para cada compuesto. Tras el análisis de las muestras adicionadas, la concentración en la que el número de falsos negativos fue $\leq 5\%$ se consideró como la Capacidad de detección del método o $\text{CC}\beta$.

En el caso del método de cribado cuantitativo en leche, además, se estudiaron parámetros cuantitativos como:

c) Veracidad

El estudio de veracidad se llevó a cabo mediante matriz en blanco adicionada a cada nivel de concentración (nivel bajo, nivel medio y nivel alto) del intervalo de trabajo. Se realizaron 21 replicados distribuidos en 7 días diferentes (3 réplicas/día).

La veracidad se calculó como sesgo a partir de la media de las concentraciones obtenidas en cada nivel de concentración, mediante las siguientes expresiones:

$$\text{Veracidad}(\%) = \frac{\text{Concentración media}}{\text{Concentración esperada}} \times 100$$

$$\text{Sesgo} (\%) = \text{Veracidad} (\%) - 100$$

d) Precisión/repetibilidad

La precisión en condiciones de repetibilidad (mismo operador, mismos equipos y corto espacio de tiempo) se estimó igualmente mediante matriz en blanco adicionada a nivel bajo, medio y alto del intervalo de trabajo. Cada día de análisis se procedió al análisis por triplicado de muestras hasta completar un total de 21 datos por nivel de concentración. Tras el análisis de las muestras se obtuvo la concentración de las mismas, la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) correspondiente a cada serie de trabajo.

Se aplicó la siguiente expresión:

$$S_{rj}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1) S_{ij}^2}{\sum_{i=1}^p (n_{ij} - 1)}$$

donde:

n_{ij} : n° de datos de la serie i al nivel de concentración j .

p : n° de series.

S_{ij}^2 : desviación estándar de los datos de la serie i al nivel de concentración j .

S^2_j : varianza de la repetibilidad

e) Precisión/reproducibilidad intralaboratorio

La precisión en condiciones de reproducibilidad intralaboratorio (mismo laboratorio, distintos operadores, distintos lotes de reactivos y soluciones patrón y largos periodos de tiempos justificados) también se estimó mediante matriz blanco adicionada a nivel bajo, medio y alto del intervalo de trabajo y aprovechando los experimentos anteriores. Se obtuvieron 21 datos por cada nivel de concentración, en estas condiciones. Tras el análisis de las muestras se obtuvo la concentración de las mismas, la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%).

La desviación estándar de reproducibilidad se obtuvo a partir de la siguiente expresión matemática:

$$S_{Rj}^2 = S_{Lj}^2 + S_{rj}^2$$

donde:

S^2_{rj} : varianza de la repetibilidad

S^2_{Lj} : varianza entre series de análisis

S^2_{Rj} : varianza de la reproducibilidad

Se calcularon los CV (%) para los distintos niveles de concentración mediante la fórmula:

$$CV\% = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

donde,

S: Desviación típica para ese nivel

\bar{X} : Media de las concentraciones obtenidas para ese nivel

3.3.2. Desarrollo y validación de métodos de confirmación cuantitativos para la determinación de antibióticos en agua, miel, huevo y pienso por lc-ms/ms

La figura 3.3 muestra el esquema general de los métodos propuestos para las matrices agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS incluyendo las distintas etapas de los mismos hasta la obtención del extracto final previa al análisis instrumental.

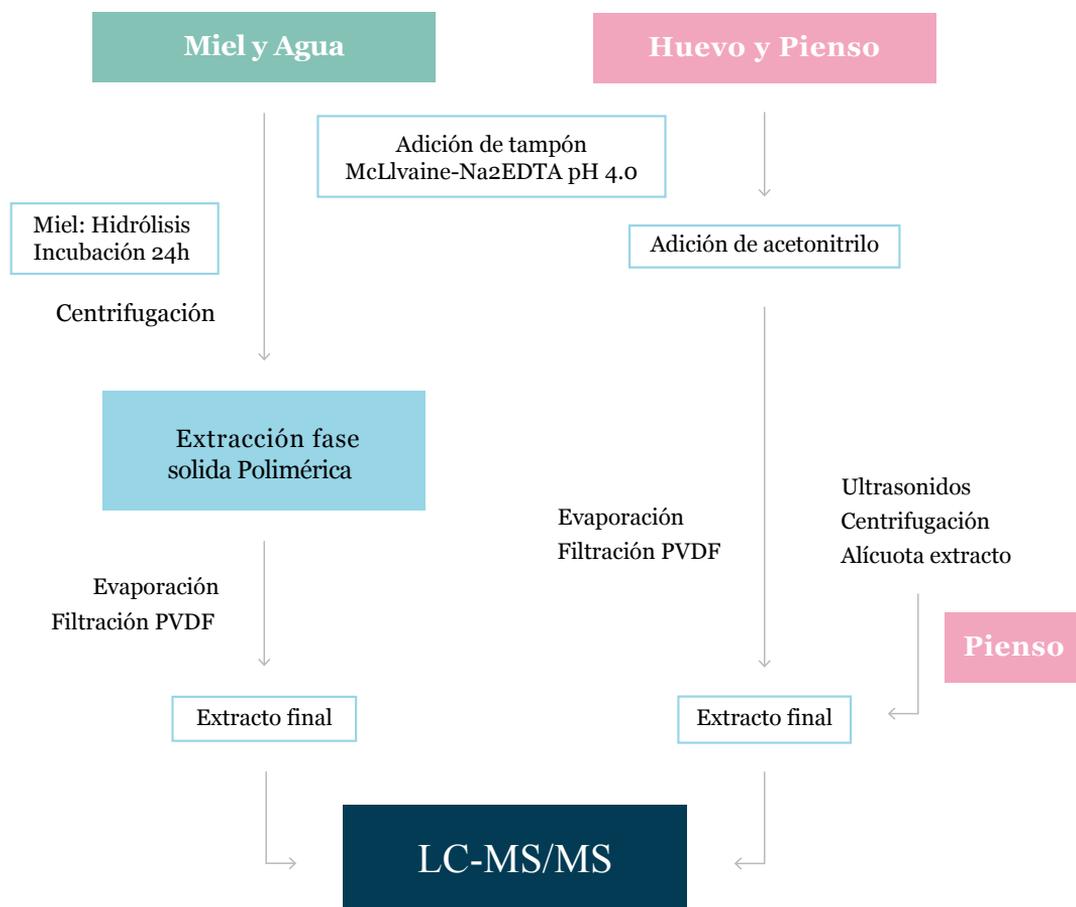


Figura 3.3. Esquema general de los métodos propuestos para agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS.

Los antibióticos estudiados para agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS, así como el modo de ionización, ión precursor, los iones producto, las energías de colisión y los patrones internos utilizados para cada uno de ellos se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Antibióticos estudiados para agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS, modo de ionización, ion precursor, ion producto, iones producto, energías de colisión y los patrones internos utilizados.

Familia	Antibiótico	Patrón Interno	Modo Ionización	Ion Precursor	Iones Producto	Energías Colisión (eV)	
Macrólidos	Espiramicina 1	Demedociclina	[M+2H] ²⁺	422	174/101/98	21/17/29	
	Neospiramicina	Demedociclina	[M+2H] ²⁺	350	174/114/118	16/29/35	
	Tilosina A	Roxitromicina	[M+H] ⁺	917	174/773/116	36/29/46	
	Tilosina B	Roxitromicina	[M+H] ⁺	774	174/98/156	29/41/34	
	Ertromicina A	Roxitromicina	[M+H] ⁺	734	158/576/558	29/19/21	
	Tilmicosina	Roxitromicina	[M+H] ⁺	870	697/174/126	39/42/54	
	Lincosamidas	Lincomicina	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	407	126/359/82	26/19/59
	Sulfonamidas	Sulfatiazol	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	256	156/92/108	15/25/24
		Sulfapiridina	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	250	156/184/108	17/19/24
		Sulfametoxipiridacina	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	281	156/108/126	17/25/20
Sulfametazina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	279	186/124/156	18/26/19	
Sulfaquinoxalina		Sulfadimetoxina-d6	[M+H] ⁺	301	156/108/92	17/25/27	
Sulfadimetoxina		Sulfadimetoxina-d6	[M+H] ⁺	311	156/108/92	22/29/29	
Sulfadiazina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	251	156/108/92	16/24/25	
Sulfamerazina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	265	172/156/108	17/18/25	
Sulfacetamida		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	215	156/108/92	11/20/21	
Dapsona		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	249	156/108/92	14/21/23	
Quinolonas	Ácido oxolímico	Norfloxacin-d5	[M+H] ⁺	262	244/130/216	18/38/29	
	Flumequina	Norfloxacin-d5	[M+H] ⁺	262	244/202	18/32	
	Danofloxacin	Norfloxacin-d5	[M+H] ⁺	358	340/283/255	23/24/38	
	Ciprofloxacina	Norfloxacin-d5	[M+H] ⁺	332	288/245/231	17/24/36	
	Difloxacina	Norfloxacin-d5	[M+H] ⁺	400	356/299/382	19/29/21	
Enrofloxacina	Norfloxacin-d5	[M+H] ⁺	360	316/245/342	19/27/22		

Familia	Antibiótico	Patrón Interno	Modo Ionización	Ión Precursor	Iones Producto	Energías Colisión (eV)	
Tetraciclinas	Clortetraciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	479	444/98/154	21/36/28	
	Doxiciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	445	321/154/410	30/27/19	
	Oxitetraciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	461	426/443/201	19/12/29	
	Tetraciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	445	410/427/154	19/13/27	
	4-Epi-tetraciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	445	410/427/201	19/13/32	
	4-Epi-oxitetraciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	461	426/443/201	19/12/29	
	4-Epi-clortetraciclina	Demeclociclina	[M+H] ⁺	479	444/98/154	21/36/28	
	β-lactámicos	Amoxicilina	Amoxicilina-d4	[M+H] ⁺	366	349/114/207	9/22/19
		Ampicilina	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ¹	[M+H] ⁺	350	106/160/192	18/14/17
Penicilina G		Penicilina G-d7	[M-H] ⁻	333	192/289	13/11	
Penicilina V		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ²	[M-H] ⁻	349	208/114/305	12/21/10	
Oxacilina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ²	[M-H] ⁻	400	259/356/322	15/10/16	
Cloxacilina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ²	[M-H] ⁻	434	293/390/257	13/11/20	
Dicloxacilina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ²	[M-H] ⁻	468	327/424	15/12	
Cefalexina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ¹	[M+H] ⁺	348	158/174/140	10/16/24	
Nafticina		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ²	[M-H] ⁻	413	272/243/322	14/26/16	
Ceftiofur		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6 ¹	[M+H] ⁺	534	241/158/285	17/23/18	
Cefoperazona		Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	646	530/143/288	12/33/15	

Familia	Antibiótico	Patrón Interno	Modo Ionización	Íon Precursor	Iones Producto	Energías Colisión (eV)
Otros	Trimetoprim	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M+H] ⁺	291	230/123/261	25/29/26
	Fumagilina	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M-H] ⁻	457	131/175/103	22/20/35
	Tianfenicol	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M-H] ⁻	354	290/119/185	15/33/22
	Florfenicol	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6	[M-H] ⁻	356	336/119/185	12/33/21
Patrones internos	Roxitromicina		[M+H] ⁺	838	680	21
	Sulfadimetoxina-d6		[M+H] ⁺	317	162	23
	Sulfametazina-fenil- ¹³ C6		[M+H] ⁺	285	186	20
	Norfloxacina-d5		[M+H] ⁺	325	281	18
	Demeclociclina		[M+H] ⁺	465	448	17
	Penicilina G-d7		[M-H] ⁻	340	199	14
	Amoxicilina-d4		[M+H] ⁺	370	353	14

¹Demeclociclina en huevo; ² Roxitromicina en huevo.

Los iones producto en primer lugar son los de cuantificación.

3.3.2.1. Selección de las condiciones de la fuente de ionización

En el caso del equipo de baja resolución LC-MS/MS de triple cuadrupolo, los principales factores que afectan a la eficiencia de la fuente de iones HESI son: *Spray voltage*, *Sheath Gas*, *Auxiliary Gas*, *Sweep Gas*, *Ion Transfer Tube Temperature* y *Vaporizer Temperature*. Dichos parámetros fueron optimizados mediante infusión de una solución mezcla de los analitos a estudiar de 1 µg/ml y trabajando en modo full scan para buscar una situación de compromiso en que la respuesta a todos los analitos fuera aceptable.

Los rangos investigados para los seis parámetros fueron: *Spray voltage* (Modo Positivo: 3000-4500 V; Modo Negativo: 2000-3000); *Sheath Gas* (35-55 Arb); *Auxiliary Gas* (12-22 Arb); *Sweep Gas* (0-2 Arb); *Ion Transfer Tube Temperature* (325-350 °C) y *Vaporizer Temperature* (275-325 °C).

3.3.2.2. Selección de las condiciones cromatográficas

Partiendo de las condiciones cromatográficas aplicadas en el método de cribado por LC-HRMS. Se ensayó una columna de mayor longitud y menor diámetro interno manteniendo el mismo tamaño de partícula, Kinetex C₁₈ XB de Phenomenex® (100 x 2,1 mm d.i., 2,6 µm). En cuanto a la fase móvil, además de la combinación ácido fórmico 0,1%/metanol (ácido fórmico 0,1%) fue necesario ensayar otra combinación compuesta por ácido fórmico 0,1% y la fase orgánica por una mezcla de metanol/acetoniitrilo 50/50 con 0,1 % de ácido fórmico.

Las experiencias se realizaron inyectando una solución patrón de 20 ng/ml de cada compuesto en solvente de composición similar a las condiciones iniciales de la cromatografía en estudio.

3.3.2.3. Selección de los solventes para la preparación de la muestra previa a la etapa de purificación para la matriz agua

Se ensayó la adición de distintos solventes a 2 ml de muestra:

- a. agua
- b. solución tampón McIlvaine- Na₂EDTA a pH 4
- c. solución tampón ac. acético/acetatoNa a pH 5,2.

Posteriormente, se hizo pasar por una columna de extracción en fase sólida polimérica Strata X[®] de 100 mg/6cc previamente preparada con 2 ml metanol y 2 ml agua ultrapura. Se lavó la columna con 3 ml agua ultrapura y se secó en corriente de N₂. Se eluyó con 3 ml de metanol. Se secó el extracto a sequedad en corriente de N₂ a 50°C. Se redisolvió el extracto seco en 1 ml de solución de resuspensión previamente a la inyección en el sistema cromatográfico.

Para el ensayo se adicionaron a las muestras los analitos objeto de estudio en una concentración en muestra de 10 µg/l.

La selección del solvente de extracción se realizó en base a las respuestas absolutas medias de cada compuesto tras realizar tres réplicas mediante cada solvente probado, al número de compuestos que ofrecían una respuesta adecuada, y al número de compuestos detectables con cada uno de ellos.

3.3.2.4. Selección de los solventes para la etapa de hidrólisis previa a la etapa de purificación para la matriz miel

La extracción en miel se abordó teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la matriz agua de bebida para animales. En el caso de la miel se debía incluir una etapa previa de hidrólisis con el objeto de romper los enlaces formados entre las sulfonamidas y los azúcares, tal y como describían algunos autores (Bernal, Nozal, Jiménez, Martín, & Sanz, 2009; Hammel, Mohamed, Gremaud, LeBreton, & Guy, 2008; Thompson & Noot, 2005) . Se compararon dos tipos de hidrólisis:

- a. HCl 1 M durante 1 h
- b. solución tampón McIlvaine/ Na₂EDTA pH₄ durante toda la noche

Brevemente, a 2 g de muestra adicionada con los analitos se le añadieron 10 ml de la solución para hidrólisis a evaluar. Se mantuvo en agitación durante el tiempo de hidrólisis. Tras centrifugación, el sobrenadante se pasó por columna de extracción en fase sólida polimérica Strata X[®] de 200 mg/6cc previamente preparada con 3 ml metanol y 3 ml agua ultrapura. Se lavó la columna con 3 ml de agua ultrapura y 3 ml de solución de agua con 5% de metanol. Se secó la columna en corriente de N₂ y se eluyó con metanol. El extracto se llevó a sequedad en corriente de N₂ a 50°C, se redisolvió en 1 ml solución de resuspensión y, tras centrifugación (13.000 rpm, 8 min, 4°C) en tubo eppendorf con filtro de PVDF de 0,22 µm, se inyectó en el sistema cromatográfico.

Para el ensayo se adicionaron a las muestras los analitos objeto de estudio en una concentración en muestra de 10 µg/Kg.

La selección de las condiciones de hidrólisis en la etapa de extracción de la matriz miel se realizó, al igual que en los casos anteriores, en base a las respuestas absolu-

tas medias de cada compuesto tras realizar tres réplicas mediante cada disolución ensayada, al número de compuestos que ofrecían una respuesta adecuada, y al número de compuestos detectables con cada una de ellas.

3.3.2.5. Selección de los solventes de extracción para la matriz huevo

Se ensayaron las mismas combinaciones de solventes de extracción que fueron evaluadas en el caso de las matrices músculo, riñón y leche:

- a. agua/acetonitrilo (20/80)
- b. tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80)
- c. tampón McIlvaine- Na₂EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80)
- d. acetonitrilo como único solvente.

Las extracciones con los distintos solventes se realizaron tras la adición de los analitos objeto de estudio a muestras de huevo, previamente homogeneizado, de manera que su concentración fuera ½ Límite Máximo de Residuo (LMR) para cada compuesto. Para los compuestos sin LMR en huevo, se adicionaron entre 5-10 µg/Kg según compuestos. Posteriormente, se procesaron mediante el método optimizado para el método de cribado para músculo y riñón, pero obviando la etapa de purificación con extracción en fase sólida dispersa.

A 2 g de muestra adicionada con los analitos se le añadieron 10 ml de los solventes de extracción a evaluar (2 ml fase acuosa y 8 ml fase orgánica y para el acetonitrilo 10 ml de este), tras agitación, sonicación durante 10 minutos, centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se tomaron 5 ml de sobrenadante y transfirieron a tubo de polipropileno de 15 ml, se evaporaron a sequedad a 50 °C en corriente de N₂ y, posteriormente, el residuo seco se redisolvió con 0,5 ml de la solución similar

a la composición de la fase móvil en las condiciones cromatográficas iniciales y, tras centrifugación (13.000 rpm, 8 min, 4°C) en tubo eppendorf con filtro de PVDF de 0,22 µm, se inyectaron 10 µl en el sistema cromatográfico.

La selección del solvente de extracción se realizó en base a las respuestas absolutas medias de cada compuesto tras realizar tres réplicas mediante cada solvente probado, al número de compuestos que ofrecían una respuesta adecuada, y al número de compuestos detectables con cada uno de ellos.

3.3.2.6. Selección de los solventes de extracción para la matriz pienso

De nuevo se ensayaron las mismas mezclas de solventes de extracción que fueron evaluadas en el caso de las matrices músculo, riñón, leche y huevo:

- e. agua/acetonitrilo (20/80)
 - a. tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80)
 - b. tampón McIlvaine- Na₂EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80)
 - c. acetonitrilo como único solvente.

Las extracciones, con los distintos solventes, se realizaron tras la adición de los analitos objeto de estudio a muestras de pienso, previamente molido y homogeneizado, de manera que su concentración correspondiera con el nivel más bajo estudiado. Este se estableció aplicando el Acuerdo de la Comisión Nacional en Materia de Alimentación Animal sobre la aceptabilidad de los controles de homogeneidad y contaminaciones cruzadas realizados por los fabricantes de piensos y premezclas, de 2014 (PDOC-CNAA 3/2014) (Comisión Nacional de Coordinación en Materia de Alimentación Animal, 2014) en el que se indicó que los límites de cuantificación

de las técnicas analíticas utilizadas en el control de los piensos no medicados debían poder detectar contaminaciones cruzadas producidas en la fabricación de los piensos medicados a los piensos no medicados inferiores al 1%. Para los antibióticos, se estableció que debían ser detectados por debajo del 1% de la dosis mínima autorizada. Por ello, los límites de cuantificación para aquellos antibióticos para los que existen premezclas autorizadas, se establecieron en $\frac{1}{2}$ del 1% de la dosis mínima autorizada. Y para aquellos compuestos, en los que no existe una premezcla autorizada se estableció 10 veces el límite máximo de residuos mínimo establecido para otras matrices de acuerdo al Reglamento (UE) 37/2010 (Reglamento (UE) n° 37/2010, 2010). Los antibióticos para los que existen premezclas autorizadas son: espiramicina, lincomicina, tilmicosina, sulfametazina, sulfadiazina, flumequina, clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, amoxicilina y penicilina V (AEMPS) (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2021).

Posteriormente, se procesaron de forma muy similar a la matriz huevo. A 2 g de muestra adicionada con los analitos se le añadieron 10 ml de los solventes de extracción a evaluar (2 ml fase acuosa y 8 ml fase orgánica y para el acetonitrilo 10 ml de este), tras agitación, sonicación durante 10 minutos, centrifugación a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se tomó 1 ml de sobrenadante y se transfirió a un vial de cromatografía para su inyección en el sistema cromatográfico.

La selección del solvente se realizó en base a los mismos criterios ya mencionados.

3.3.2.7. Evaluación del efecto matriz y la recuperación

Para llevar a cabo este estudio en estas matrices se procedió del mismo modo que para las otras matrices. Una vez optimizadas las distintas etapas de los métodos, se

realizaron 3 sets de muestras con 3 replicados cada uno, set 1, 2 y 3. En este caso el set 1 consistió en una solución patrón conteniendo los analitos (incluidos los patrones internos) a una concentración igual al límite de cuantificación del método. El set 2 consistió en 3 replicados de cada una de las matrices que fueron extraídos por los métodos seleccionados para validar y cuyos extractos fueron redisoluertos en el volumen necesario de las soluciones patrón de concentración límite de cuantificación. Y el set 3 también consistió en 3 replicados de las mismas matrices adicionadas, previamente a la extracción, con la misma concentración de manera que la concentración en el extracto final sea la misma que la obtenida en los sets anteriores. En el caso de los patrones internos, la concentración estudiada fue en todos los casos 40 µg/Kg para las matrices agua, miel y huevo y 750 µg/Kg para la matriz pienso.

Los cálculos fueron realizados como se describió en el apartado 3.3.1.5.

3.3.2.8. Validación de los métodos de confirmación cuantitativos para agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS

La validación se llevó a cabo de acuerdo a la Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 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. El nuevo Reglamento (UE) 2021/808 de la Comisión Europea (Reglamento de ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión, 2021) entra en vigor en junio de 2026, teniendo validez hasta entonces los métodos ya validados de acuerdo a la Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea.

Los parámetros a estudiar de acuerdo a dicha Decisión fueron los correspondientes a métodos cuantitativos de confirmación.

Las matrices validadas fueron agua de bebida para animales de distintas especies (ave, porcino, bovino y ovino), miel (multifloral, romero, brezo), huevo de gallina y pienso (especies bovino, ave, equino, porcino, conejo, ovino).

a. Especificidad

El estudio de especificidad se llevó a cabo analizando 24 muestras de agua de bebida para animales (6 muestras de agua para aves, 6 para porcino, 6 para bovino y 6 para ovino), 36 muestras de miel (12 de miel multifloral, 12 de romero y 12 de brezo), 21 muestras de huevo de gallina y 24 muestras de pienso (4 muestras de pienso para bovino, 4 para ave, 4 para equino, 4 para porcino, 4 para conejo y 4 para ovino). Se observó la respuesta relativa en la región de tiempo de retención de los analitos (área en el tiempo de retención de los analitos /área patrón interno). Esas mismas muestras fueron adicionadas con una concentración para cada analito igual al nivel más bajo estudiado en cada caso, es decir, el límite de cuantificación para cada analito en la matriz correspondiente. Igualmente, se observó la respuesta relativa en la región de tiempo de retención de los analitos (área en el tiempo de retención de los analitos /área patrón interno) para ser comparada con la obtenida en las muestras blanco.

b. Veracidad

La veracidad se estudió de igual modo que en el método de cribado cuantitativo aplicado a leche mediante matriz en blanco adicionada a cada nivel de concentración (nivel bajo, nivel medio y nivel alto) del intervalo de trabajo. En este caso se realizaron 30 replicados distribuidos en 6 días diferentes (5 réplicas/día) para cada una de las matrices.

Se obtuvo el sesgo para cada analito, a cada nivel estudiado y en cada una de las matrices calculado tal y como se indica en el apartado 3.3.1.6.c).

c. Precisión/ repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Al igual que para el método de cribado cuantitativo para la matriz leche, tal y como se indica en los apartados 3.3.1.6 d) y 3.3.1.6.e), una vez obtenidos, en este caso, los 30 datos para cada nivel de concentración, se obtuvieron las varianzas de repetibilidad y de reproducibilidad y los correspondientes Coeficientes de Variación en % o Desviaciones estándar relativas (RSD_r % y RSD_R %).

d. CC α o Límite de decisión

Para las combinaciones analito/matriz en las que no se ha establecido un límite permitido, el CC α se estableció, según requisitos de identificación más cuantificación, con el valor más bajo estudiado del rango de trabajo del método para cada analito en cada matriz en que, además, se garantizaba la identificación de los compuestos en el 100% de los casos.

Para las combinaciones analito/matriz en las que se ha establecido un límite permitido, el CC α se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$CC\alpha = LMR + (1,64 \times SD) \text{ donde,}$$

CC α es el Límite de decisión ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ o $\mu\text{g}/\text{l}$)

LMR es el Límite Máximo de Residuo ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ o $\mu\text{g}/\text{l}$)

SD es la Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio a nivel del LMR.

e. CC β o Capacidad de detección

Tanto para las combinaciones analito/matriz en las que se ha establecido un límite permitido, como para las que no se ha establecido ese límite, el CC β se obtuvo de la siguiente fórmula:

$CC\beta = CC\alpha + (1,64 \times SD)$ donde,

CC β es la Capacidad de detección ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ o $\mu\text{g}/\text{l}$)

CC α es el Límite de decisión ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ o $\mu\text{g}/\text{l}$)

SD es la Desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio a nivel del CC α .

A efectos prácticos, se consideró la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio en el límite de decisión igual a la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio del contenido medio en el Límite Máximo de Residuo.

4.

Resultados y discusión

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

4. Resultados y discusión

4.1. Desarrollo y validación de un método de cribado cualitativo en músculo y riñón y de un método de cribado cualitativo y cuantitativo en leche para análisis de antibióticos por LC-HRMS

Para llevar a cabo el desarrollo de los métodos se abordaron, de modo sucesivo, las etapas mostradas en la figura 3.1 del apartado de Material y Métodos.

4.1.1. Optimización de los parámetros de la fuente de ionización

Como ya se explicó en el apartado 3.3.1.1. de Material y Métodos, los diferentes parámetros que afectan a la fuente de ionización y, por tanto, a la respuesta analítica, fueron optimizados mediante un diseño de experimentos (DoE) en dos etapas:

- a. Etapa de screening mediante un diseño Plackett-Burman (PB) con objeto de seleccionar los parámetros que tienen una influencia en la señal.
- b. Optimización de los parámetros relevantes mediante Diseño Central Compuesto (CCD).

La tabla 4.1. muestra la matriz del diseño Plackett-Burman con los valores para cada parámetro de la fuente de ionización en cada una de los 30 experimentos a realizar.

Tabla 4.1. Matriz del diseño Plackett-Burman para la optimización de los parámetros de la fuente de ionización HESI-II. Equipo LC-HRMS Exactive.

RunOrder	Sheath gas Pressure	Auxiliary gas	Spray Voltage	Capillary temperature	Skimmer Voltage	Heater Temperature	Capillary Voltage
1	40	10	3	275	30	300	45
2	40	10	3	275	30	300	45
3	40	10	3	275	30	300	45
4	20	20	2	100	10	500	70
5	60	0	4	450	10	500	20
6	20	0	2	450	50	500	20
7	20	0	2	100	10	100	20
8	60	0	2	100	50	500	70
9	60	20	2	450	10	100	20
10	60	20	4	100	50	500	20
11	20	0	2	450	50	500	20
12	20	20	4	100	50	500	20
13	20	0	4	450	50	100	70
14	20	20	4	100	50	500	20
15	60	20	2	450	50	100	70
16	40	10	3	275	30	300	45
17	60	20	4	100	50	500	20
18	20	20	4	450	10	500	70
19	60	0	4	100	10	100	70
20	20	0	4	450	50	100	70
21	20	20	4	450	10	500	70
22	60	0	4	100	10	100	70
23	20	0	2	100	10	100	20
24	60	20	2	450	10	100	20
25	60	0	2	100	50	500	70
26	40	10	3	275	30	300	45

RunOrder	Sheath gas Pressure	Auxiliary gas	Spray Voltage	Capillary temperature	Skimmer Voltage	Heater Temperature	Capillary Voltage
27	60	20	2	450	50	100	70
28	40	10	3	275	30	300	45
29	60	0	4	450	10	500	20
30	20	20	2	100	10	500	70

La tabla 4.2. muestra los efectos estimados de cada uno de los 7 factores y su significación estadística para un nivel de confianza de un 95% ($<0,05$) para cada uno de los analitos.

Tabla 4.2. Efectos estimados y *p-values* (entre paréntesis) de los 7 parámetros de la fuente de ionización del diseño Plackett-Burman. Equipo LC-HRMS Exactive.

	Sheath gas Pressure		Auxiliary gas		Spray Voltage		Capillary temperature		Skimmer Voltage		Heater Temperature		Capillary Voltage	
	EFFECT	P-VALUE	EFFECT	P-VALUE	EFFECT	P-VALUE	EFFECT	P-VALUE	EFFECT	P-VALUE	EFFECT	P-VALUE	EFFECT	P-VALUE
ESPIRAMICINA	442671	0,265	-77592	0,679	-170477	0,650	-674622	0,094	307894	0,416	442322	0,285	203566	0,589
NEOSPIRAMICINA	631332	0,246	-147858	0,565	-352948	0,494	-965269	0,080	408822	0,429	664739	0,241	428365	0,408
TILOSINA	-53826	0,711	14919	0,830	102448	0,464	16382	0,909	273993	0,059	40822	0,787	-131096	0,351
ERITROMICINA	-55928	0,677	7	1,000	46937	0,715	16404	0,902	60316	0,640	-27216	0,846	-42798	0,739
LINCOMICINA	133881	0,746	238724	0,235	590759	0,146	-677994	0,109	715194	0,082	126325	0,769	-416379	0,299
SULFATIAZOL	76746	0,427	-18375	0,689	-18254	0,843	-167450	0,090	77344	0,404	52565	0,600	41720	0,651
SULFAPIRIDINA	207071	0,289	-86628	0,353	-95740	0,606	-361421	0,070	220717	0,240	175923	0,386	161035	0,388
SULFAMETOXIPIRIDAZINA	131584	0,499	-43546	0,639	15301	0,934	-330340	0,097	246013	0,195	106392	0,599	51441	0,782
SULFAMETAZINA	153518	0,507	-120148	0,282	-52133	0,813	-403041	0,089	405014	0,077	198622	0,411	160868	0,469
SULFAQUINOXALINA	65938	0,649	25698	0,710	79504	0,567	-256401	0,085	168547	0,231	41541	0,783	-31514	0,820
SULFADIMETOXINA	-42065	0,872	-39003	0,755	326844	0,200	-359001	0,175	662269	0,054	-5570	0,967	-38670	0,877
SULFADIAZINA	123197	0,285	-44588	0,416	-64657	0,555	-220486	0,061	99951	0,364	93267	0,435	90474	0,410
SULFAMERAZINA	152874	0,358	-74762	0,348	-68925	0,663	-299661	0,078	198019	0,218	135925	0,432	124445	0,434
SULFACETAMIDA	20154	0,662	-990	0,964	-19729	0,656	-58622	0,209	18866	0,670	27078	0,574	21062	0,634
AC. OXOLINICO	34850	0,163	-18497	0,124	-18020	0,445	-47044	0,063	59161	0,068	36997	0,156	32278	0,178
FLUMEQUINA	804104	0,204	-231875	0,438	11769	0,984	-1474081	0,025	1686217	0,069	750240	0,254	389139	0,515
DANOFLOXACINA	246052	0,314	-21825	0,850	130850	0,574	-455494	0,069	711369	0,051	296553	0,247	-24463	0,916
CIPROFLOXACINA	252960	0,341	54072	0,668	197610	0,437	-489442	0,072	631541	0,150	197321	0,474	-97588	0,699
DIFLOXACINA	1050022	0,265	127263	0,774	686043	0,444	-1607957	0,092	2251202	0,523	869639	0,373	-368714	0,679
ENROFLOXACINA	450514	0,286	50461	0,800	259041	0,519	-742024	0,084	1002739	0,190	387134	0,377	-107924	0,787
CLORTETRACICLINA	29520	0,628	15076	0,605	35140	0,548	-69934	0,254	48201	0,412	15833	0,803	-26110	0,655
DOXICICLINA	45270	0,625	40049	0,370	86855	0,333	-143783	0,128	104354	0,247	25771	0,789	-69124	0,439

	Sheath gas Pressure	Auxiliary gas	Spray Voltage	Capillary temperature	Skimmer Voltage	Heater Temperature	Capillary Voltage							
OXITETRACICLINA	41124	18254	31730	0,636	-89245	0,206	49437	0,463	19919	0,784	-23991	0,720		
TETRACICLINA	60207	0,468	5496	0,889	16466	0,835	-104025	0,213	61682	0,439	36824	0,669	0,948	
EPI-TETRACICLINA	29465	0,538	-98	0,997	3872	0,933	-53687	0,264	30478	0,507	24020	0,630	1531	0,973
EPI-OXITETRACICLINA	22932	0,511	10076	0,546	24784	0,460	-48965	0,166	33248	0,324	12903	0,722	-17493	0,601
EPI-CLORTETRACICLINA	8209	0,312	2025	0,599	4403	0,569	-12846	0,118	6822	0,380	5270	0,531	-2945	0,703
AMOXICILINA	12862	0,269	-1837	0,738	-5314	0,630	-22703	0,057	10344	0,352	12084	0,318	6684	0,545
AMPICILINA	108767	0,412	24619	0,696	55468	0,661	-208372	0,122	106927	0,401	72273	0,599	-27709	0,826
PENICILINA G	-1324	0,891	166	0,972	-131	0,989	-2566	0,790	3628	0,697	1171	0,908	131	0,989
PENICILINA V	17011	0,065	-2925	0,491	534	0,950	-36124	0,000	14377	0,101	10724	0,252	8566	0,318
OXACILINA	142352	0,107	-31518	0,445	39452	0,632	-317048	0,001	114138	0,174	54380	0,544	64926	0,432
CLOXACILINA	108584	0,249	-17551	0,693	47855	0,591	-256981	0,010	100946	0,263	34596	0,721	38794	0,663
DICLOXACILINA	53413	0,335	-7631	0,771	19750	0,707	-134736	0,020	63077	0,238	23013	0,687	13840	0,792
CEFALEXINA	167121	0,197	-6932	0,909	-4021	0,974	-263164	0,047	121656	0,324	120875	0,366	37428	0,759
NAFCILINA	-5692	0,962	1674	0,977	19897	0,861	-75378	0,525	63605	0,578	8225	0,947	-13019	0,909
DESFUROILCEFTIOFUR	170727	0,702	161391	0,452	396771	0,358	-577725	0,201	522739	0,230	133974	0,773	-313325	0,467
CEFTIOFUR	509944	0,573	321331	0,459	911098	0,298	-1271822	0,165	1056628	0,229	340732	0,717	-611730	0,482

Tras aplicar el diseño de cribado Plackett-Burman, sólo la *capillary temperature* (CT) presentó un efecto significativo ($p\text{-value} < 0,05$) sobre la respuesta de unos pocos compuestos objetivo. Los seis factores restantes: *heater temperature* (HT), *sheath gas pressure* (SGP), *skimmer voltage* (SKV), *auxiliary gas* (AG), *capillary voltage* (CV) y *spray voltage* (SV), no tuvieron efecto significativo. Sin embargo, además de CT, HT y SGP también fueron seleccionados para el experimento CCD ya que un gran número de sustancias mostraron un efecto claro respecto a ellos. De los parámetros que mostraron efecto positivo y negativo, se seleccionaron valores intermedios del rango.

Respecto al experimento CCD, la tabla 4.3 muestra los valores para cada parámetro en cada uno de los 40 *runs* cromatográficos.

Tabla 4.3. Condiciones experimentales del experimento CCD para cada *run* cromatográfico. Optimización de los parámetros de la fuente. Equipo LC-HRMS Exactive.

StdOrder	RunOrder	PfType	Blocks	Capillary T	Heater T	Sheath Gas P
16	1	0	1	275	300	40
38	2	0	1	275	300	40
39	3	0	1	275	300	40
18	4	0	1	275	300	40
1	5	1	1	171	181	28
31	6	-1	1	275	100	40
11	7	-1	1	275	100	40
9	8	-1	1	100	300	40
34	9	-1	1	275	300	60
23	10	1	1	171	419	28
3	11	1	1	171	419	28
14	12	-1	1	275	300	60
4	13	1	1	379	419	28
25	14	1	1	171	181	52
12	15	-1	1	275	500	40

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	Capillary T	Heater T	Sheath Gas P
33	16	-1	1	275	300	20
22	17	1	1	379	181	28
32	18	-1	1	275	500	40
30	19	-1	1	450	300	40
5	20	1	1	171	181	52
10	21	-1	1	450	300	40
19	22	0	1	275	300	40
13	23	-1	1	275	300	20
21	24	1	1	171	181	28
8	25	1	1	379	419	52
29	26	-1	1	100	300	40
37	27	0	1	275	300	40
2	28	1	1	379	181	28
15	29	0	1	275	300	40
7	30	1	1	171	419	52
35	31	0	1	275	300	40
27	32	1	1	171	419	52
36	33	0	1	275	300	40
40	34	0	1	275	300	40
20	35	0	1	275	300	40
26	36	1	1	379	181	52
6	37	1	1	379	181	52
28	38	1	1	379	419	52
24	39	1	1	379	419	28
17	40	0	1	275	300	40

Central Composite Design (CCD): Para ejecutar los experimentos CCD, se fijó el *spray voltage* a los valores estándar proporcionados por el fabricante para los modos positivo (3 KV) y negativo (2,5 KV); el *gas auxiliar*, el *skimmer voltage* y el *capillary voltage* se fijaron a valores intermedios de 10 a.u., 30 V y 50 V, respectivamente, porque tuvieron efectos positivos y negativos. Como ya se explicó en el apartado 3.3.1.1. de Material y Métodos, el CCD consistió en un diseño 2^3 *full facto-*

rial (2 replicados, 16 cube points), 12 axial points y 12 central points que dio lugar a 40 *runs* cromatográficos aleatorizados. Las respuestas obtenidas fueron ajustadas por una ecuación de regresión múltiple, incluyendo el segundo orden (curvatura) y los términos de interacción. Se seleccionaron los analitos con menores respuestas representativos de cada familia y, tras procesar los datos, se llegó a una situación de compromiso para los analitos seleccionados de manera que se maximizara el valor de *desirability* para cada uno de ellos.

La figura 4.1 muestra los gráficos de los valores obtenidos en los 3 parámetros del CCD para los analitos seleccionados y el valor de *desirability*.

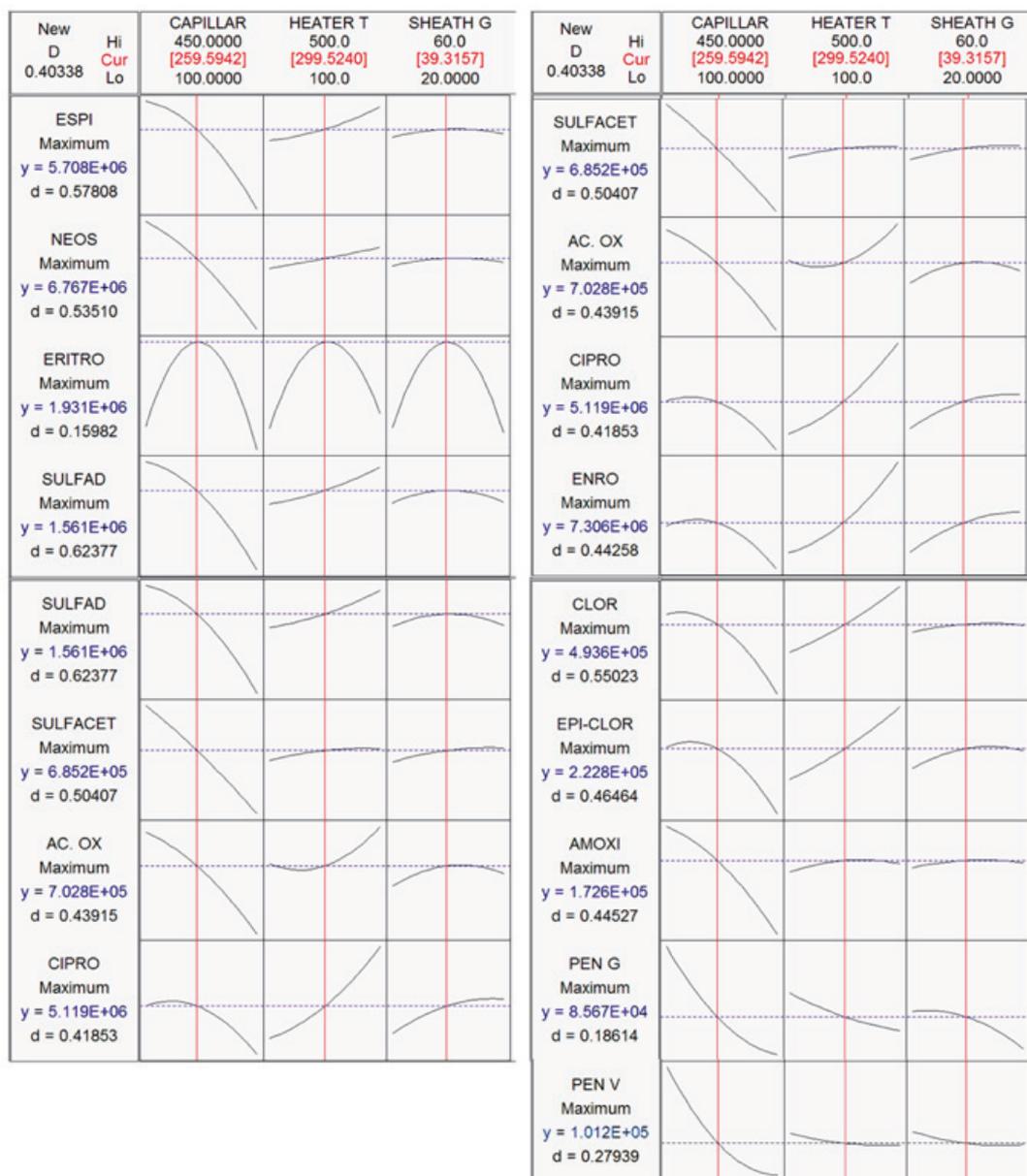
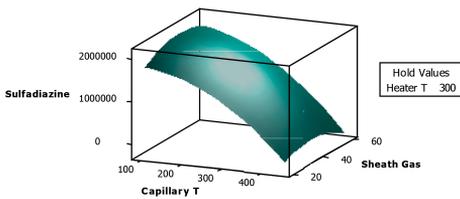


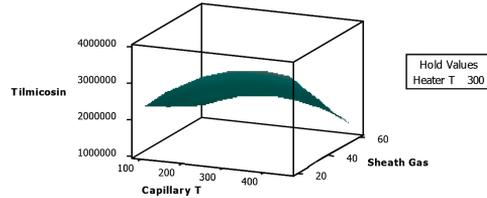
Figura 4.1. Selección de las condiciones experimentales para *Capillary T*, *Heater T* y *Sheath Gas Pressure*. Valores de *D* (*desirability*) para los analitos seleccionados.

Se obtuvieron superficies de respuesta tridimensionales que muestran el efecto de dos variables independientes para una respuesta dada a un valor constante de otra variable. La figura 4.2 muestra las superficies de respuesta obtenidas para algunos de los analitos representativos de algunas familias de antibióticos.

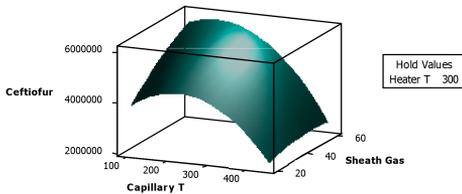
Surface Plot of Sulfadiazine vs Sheath Gas, Capillary T



Surface Plot of Tilmicosin vs Sheath Gas, Capillary T



Surface Plot of Cefotiofur vs Sheath Gas, Capillary T



Surface Plot of Doxycycline vs Sheath Gas, Capillary T

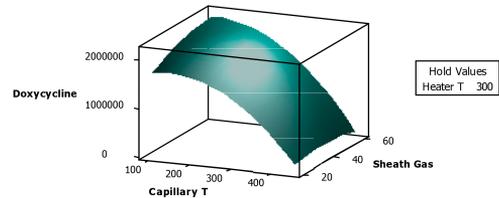


Figura 4.2. Superficies de respuesta obtenidas en el proceso de optimización para Sulfadiazina, Tilmicosina, Cefotiofur y Doxiciclina. Equipo LC-HRMS Exactive.

Después del experimento CCD, los valores de los factores optimizados para los tres parámetros fueron: *sheath gas pressure* 40 a.u., *capillary temperature* 260°C y *heater temperature* 300°C.

La tabla 4.4 muestra el resumen de los valores optimizados para cada uno de los 7 parámetros en la fuente de ionización.

Tabla 4.4. Valores optimizados de los 7 parámetros de la fuente de ionización. LC-HRMS.

Parámetro optimizado	Valor optimizado
Sheath gas pressure (SGP)	40 a.u.
Auxiliary gas (AG)	10 a.u.
Spray Voltage (SV)	3,0 kV (+); 2,5 kV (-)
Capillary Temperature (CT)	260 °C
Skimmer Voltage (SV)	30 V
Heater Temperature (HT)	300 °C
Capillary Voltage (CV)	50 V

Los parámetros de *Scan* del espectrómetro de masas seleccionados fueron:

Scan Range: modo positivo y negativo: 80-1200 m/z (*switching polarity*)

Resolución: 50.000 FWHM

Microscans: 1

Automatic Gain Control (AGC): 10^6 (*Balanced*)

Maximum inject time: Positivo (100 ms); Negativo (20 ms)

Además, se seleccionó una exactitud de masa de 5 ppm.

4.1.2. Selección de las condiciones cromatográficas

Los antibióticos son moléculas polares y de polaridad intermedia cuya separación cromatográfica se plantea con columnas de sílice de fase reversa C₁₈ y C₈ modificadas o no para añadir alguna característica que favorece la separación de distintos

compuestos. Para separar los 46 antibióticos objeto de análisis, se seleccionaron inicialmente dos columnas de fase reversa de C₁₈, una de sílice porosa, longitud mayor y menor diámetro interno y tamaño de partícula, Hypersil Gold (C₁₈) (100 x 2,1 mm d.i. 1,9 µm) Thermo Fisher Scientific® y otra también de sílice de fase reversa pero en este caso, Kinetex C₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2.6 µm) Phenomenex® de núcleo duro de menor longitud que la anterior, mayor diámetro interno y mayor tamaño de partícula. En ambos casos se ensayaron 4 composiciones de fase móvil:

- a. Ácido acético 0,1% /Acetonitrilo (ácido acético 0,1%).
- b. Ácido fórmico 0,1 %/Acetonitrilo (ácido fórmico 0,1%).
- c. Ácido acético 0,1%/Metanol (ácido acético 0,1%).
- d. Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido acético 0,1%).

Para la fase acuosa conteniendo ácido fórmico, se consideró adecuada la concentración 0,1 % porque se estimó que una mayor concentración podría favorecer la degradación de compuestos sensibles a pH bajos y estaba descrito en la bibliografía que una concentración menor (por ejemplo 0,05%) producía un deterioro en la forma de los picos para algunos compuestos y un aumento del tiempo de retención (Mastovska & Lightfield, 2008).

Cuando la fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo, se obtuvieron respuestas analíticas un poco inferiores a cuando se utilizó como fase orgánica el metanol, lo que indicó que el metanol favorece los procesos de ionización respecto al acetonitrilo.

Por otro lado, cuando se utilizó ácido acético 0,1% con metanol (ácido acético 0,1%), en la columna Hypersil Gold (C₁₈) la amoxicilina dio lugar a una respuesta muy baja a 2,64 min y los antibióticos sulfadiazina, espiramicina y neospiramicina produjeron unos picos con falta de simetría, como puede observarse en la figura 4.3.

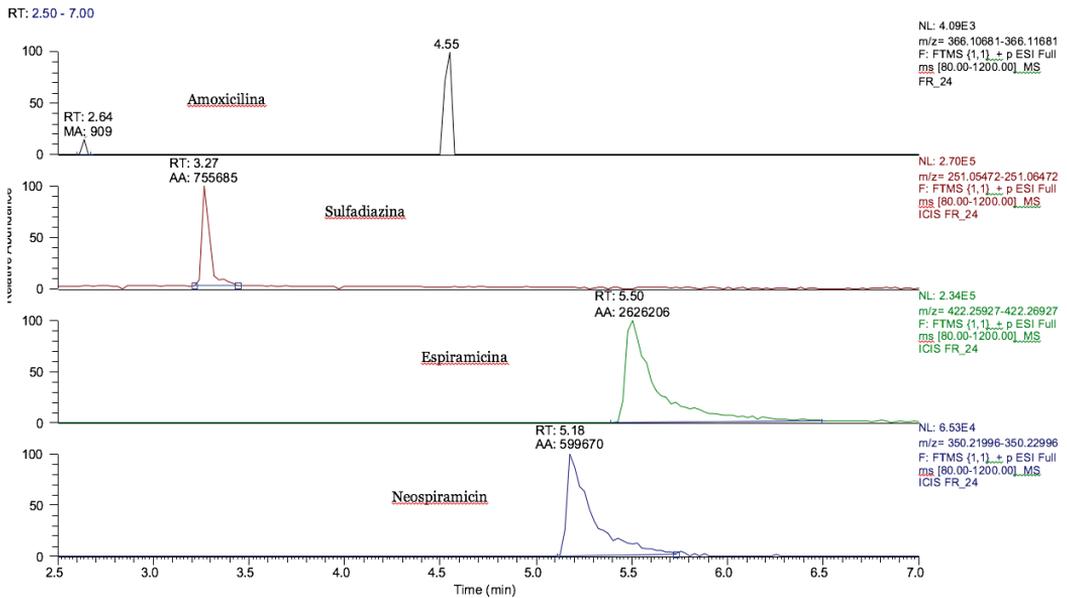


Figura 4.3. Cromatograma de una solución de 40 ng/ml. Amoxicilina, Sulfadiazina, Espiramicina y Neospiramicina. Fase móvil Ácido acético 0,1%/metanol (ácido acético 0,1%). Columna Hypersil Gold (C₁₈) (100 x 2,1 mm d.i. 1,9 µm).

La figura 4.4. muestra los cromatogramas obtenidos utilizando la combinación ácido fórmico 0,1 % como fase acuosa y metanol acidificado con ácido fórmico 0,1% para ambas columnas para una solución de 40 ng/ml de distintos compuestos representativos de distintas familias de analitos.

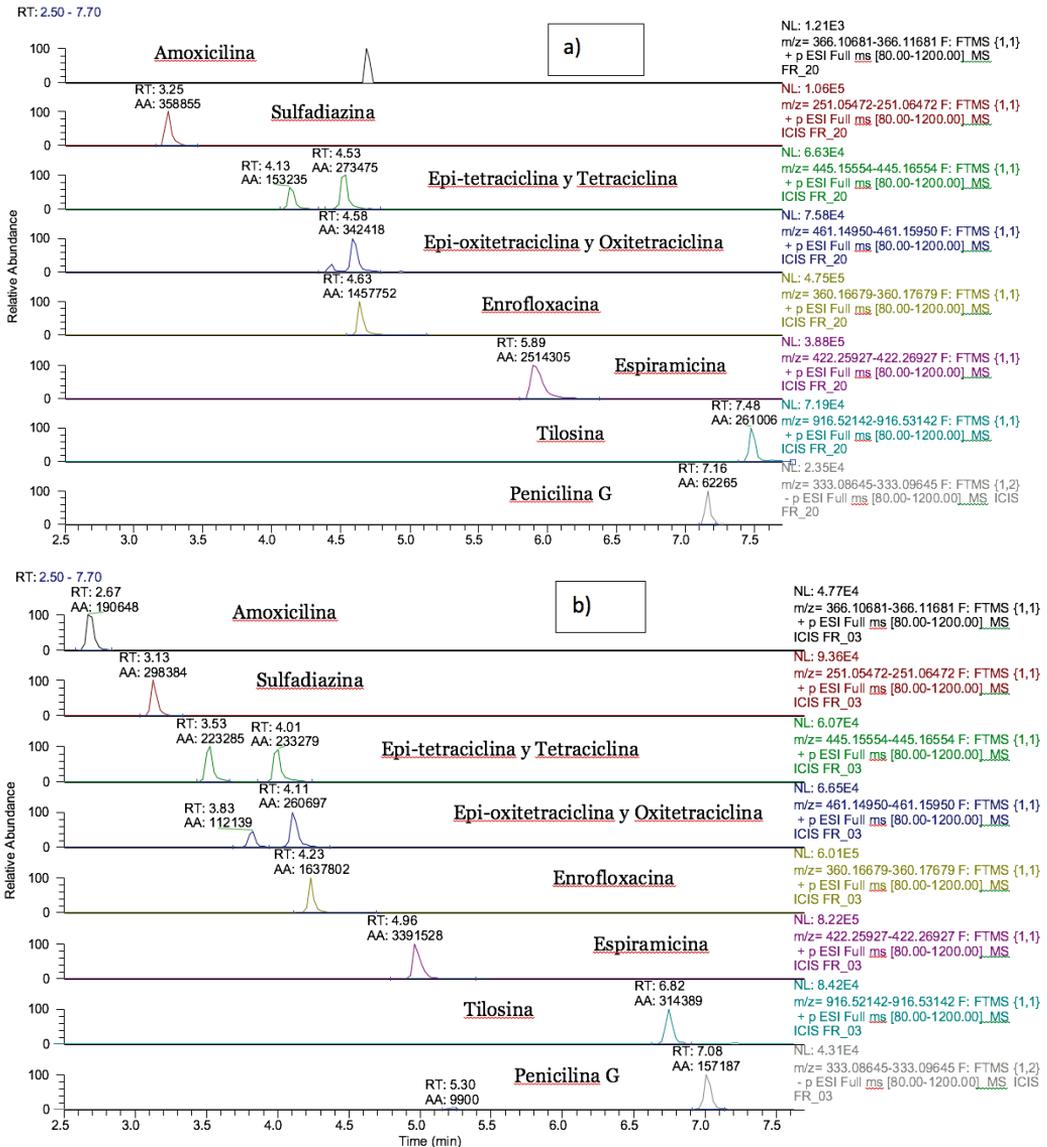


Figura 4.4. Cromatogramas de solución de 40 ng/ml de antibióticos representativos de distintas familias. Columna a) Hypersil Gold (C₁₈) (100 x 2,1 mm d.i. 1,9 μm) y columna b) Kinetex C₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2.6 mm). Fase móvil: Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido fórmico 0,1 %).

Cuando se utilizó la columna Hypersil Gold (C₁₈), la amoxicilina no fue detectada y se produjo menor separación cromatográfica tanto de la oxitetraciclina y su 4-epímero como de la tetraciclina y su 4-epímero. Sin embargo, con la columna Kinetex C₁₈ XB se obtuvo una adecuada respuesta para la amoxicilina y también mostró una adecuada resolución para las tetraciclinas y sus 4-epímeros. Esto, en principio, es llamativo ya que se trata de una columna de menor longitud, mayor diámetro interno y mayor tamaño de partícula que la otra columna ensayada pero, al tratarse de una columna de sílice de las llamadas de núcleo duro se impiden fenómenos de difusión en el interior de las partículas que favorecen el ensanchamiento de los picos y a la vez se mejora la resolución de manera que su comportamiento podría ser equiparable a las columnas de menos de 2 µm de tamaño de partícula. Esto es consistente con lo que describen otros autores (Cortéjade, Kiss, Cren, Vulliet, & Buleté, 2016; Lefeuvre et al., 2017). También para otros autores se produjo una mejoría en la forma de los picos y en la separación cromatográfica cuando se utilizó la combinación de ácido fórmico y metanol como fase móvil en el análisis de métodos multiclase de antibióticos (Chiesa et al., 2018; Kaklamanos, Vicent, & Von Holst, 2013).

Por lo tanto, la columna seleccionada fue Kinetex C₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2.6 µm) y la combinación de solventes para la fase móvil, ácido fórmico 0,1 %/Metanol (ácido fórmico 0,1 %).

Finalmente, las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron:

Columna Kinetex C₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2,6 µm) Phenomenex®.

Fase móvil acuosa: ácido fórmico 0,1 %.

Fase móvil orgánica: Metanol (ac. fórmico 0,1%)

Flujo: 400 µL/min

Tiempo análisis: 9 min

Gradiente: Desde A 98% B 2% hasta A 1% B 99 %

4.1.3. Selección de los solventes de extracción y evaluación del método QuEChERS

Para las matrices músculo, riñón y leche se ensayaron 5 tipos de extracción:

- a. agua/acetonitrilo (20/80)
- b. tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80)
- c. tampón McIlvaine- Na₂EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80)
- d. acetonitrilo como único solvente (sólo en matriz leche)
- e. método QuEChERS (sólo en matrices músculo y riñón)

4.1.3.1. Músculo

Para esta matriz, los resultados de los ensayos se muestran en la figura 4.5. Se presentan las respuestas normalizadas asignando un 100 % a la respuesta obtenida para el solvente que produjo una mayor respuesta en cada analito. Los ensayos fueron realizados utilizando la matriz músculo de bovino.

04. Resultados y discusión

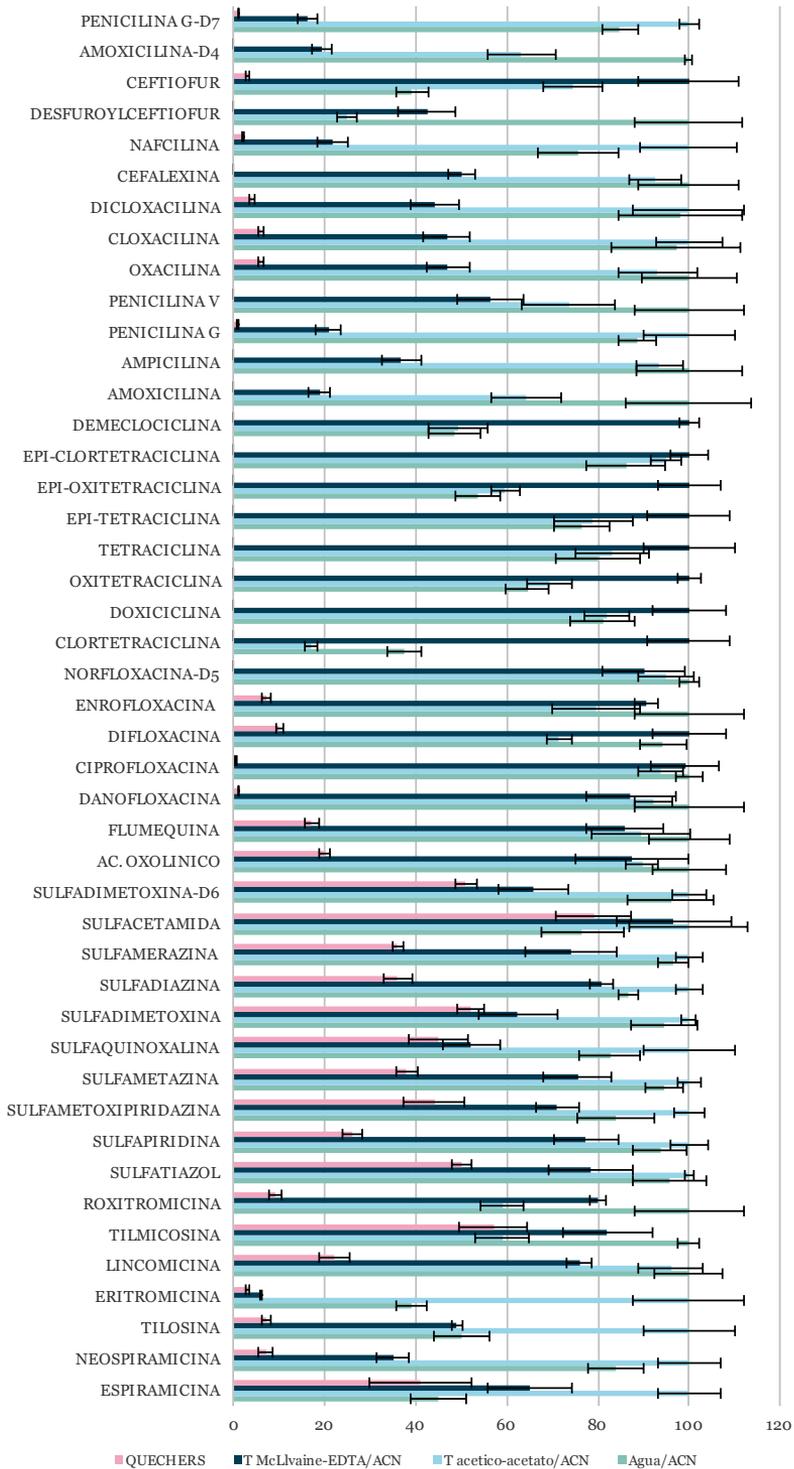


Figura 4.5. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción y el método QuE-ChERS. Músculo bovino ortificado a 20 µg/Kg.

Las extracciones tanto mediante la combinación de solventes agua/acetonitrilo (20/80) como la de tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80) produjeron la detección del 100% de los compuestos y dieron lugar a respuestas absolutas muy similares y adecuadas para gran parte de los compuestos de interés. La combinación agua/acetonitrilo (20/80) produjo una mejor respuesta, que la combinación tampón ácido acético-acetato pH 5,2/acetonitrilo, para las quinolonas, algunos macrólidos, lincosamida y gran parte de los β -lactámicos. Algo similar se produjo para la combinación tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80) respecto a las sulfonamidas, otros macrólidos y otros β -lactámicos. En ambos casos, las diferencias de respuesta no se consideraron relevantes. En los β -lactámicos se marcaron más las diferencias para amoxicilina, amoxicilina-D4, penicilina V y desfuroylceftiofur a favor de la combinación agua/acetonitrilo, quizás debido a la mayor estabilidad que presentan a pHs más cercanos a la neutralidad (Holstege, Pushner, Whitehead, & Galey, 2002).

En el caso de la combinación de tampón McIlvaine- Na_2EDTA /acetonitrilo (20/80) pH 4, también se detectaron el 100 % de los compuestos, pero tan sólo mejoraron su respuesta respecto a las anteriores combinaciones de solventes 9 compuestos, siendo destacable la mayor respuesta obtenida para las tetraciclinas, como era previsible, tal y como se describe en la literatura, (Blasco et al., 2009; Gentili, Perret, & Marchese, 2005; Jin, H. et al., 2010; Oka, Ito, & Matsumoto, 2000), ya que el Na_2EDTA contenido en el tampón produce quelatos con los iones divalentes presentes en el medio, evitando que éstos se unan a los grupos ceto de las posiciones 1 y 11 de las estructuras de las tetraciclinas y facilitando así su mejor extracción. Además, el pH ácido del medio permitió la separación de las tetraciclinas de las proteínas de la matriz, lo que hizo mejorar la extracción (George, Vincent, & von Holst, 2013; Oka, Ito, & Matsumoto, 2000). Para el resto de compuestos, en general, se obtuvieron respuestas más desfavorables mediante esta combinación de solventes,

incluidos los macrólidos. A pesar de que está descrito que también forman quelatos con iones del medio (Aguilera-Luiz et al., 2008), la presencia de Na_2EDTA no resultó especialmente favorable en su extracción. Para sulfonamidas y quinolonas no se produjeron diferencias relevantes con las tres combinaciones de solventes.

En cuanto al método QuEChERS, la combinación de las sales de extracción junto con el acetonitrilo, basada en método UNE-EN 15662 (UNE-EN 15662:2019, 2019) confirió al medio un pH entre 5,0-5,5. La adición de las mismas se llevó a cabo tras añadir a la muestra en primer lugar el acetonitrilo, con el objeto de prevenir la reacción exotérmica que produce el MgSO_4 anhidro, para eliminar el agua presente en las muestras. Además, el uso de dos homogeneizadores cerámicos previno la formación de aglomerados de las sales con la muestra. La PSA utilizada en la purificación posee capacidad de eliminación de ácidos orgánicos de la matriz, como los ácidos grasos, y el C_{18} , retiene los interferentes más apolares (Freitas et al., 2013; Hou, Xu, Xu, Han, & Qiu, 2020; Hu et al., 2014; Mastovska & Lightfield, 2008; Zhou, Xu, Cong, Cai, Zhang, Wang, & Ren, 2018). Este método dio lugar únicamente a respuestas absolutas aceptables para las sulfonamidas, algún macrólido como espiramicina y tilmicosina, y lincomicina, pero que suponían un 50% de las respuestas obtenidas en los métodos anteriores. Las respuestas de los demás compuestos fueron muy inferiores a las obtenidas en el resto de métodos (entre 1-20%) e incluso nulas en el caso de las tetraciclinas, gran parte de los β -lactámicos, algún macrólido y alguna quinolona. Aproximadamente un 64% de los compuestos no fueron detectados o su respuesta fue muy inferior a la obtenida con los otros métodos. La presencia de un pH no muy ácido durante la extracción y de PSA en el medio durante la purificación, pudo favorecer la extracción de sulfonamidas y algún macrólido respecto a los demás compuestos, tal como indican algunos autores (Hu et al., 2014) pero, por otro lado, la presencia de PSA, agente intercambiador de aniones, pudo perjudicar la extracción de los β -lactámicos debido a que estos tienen

grupo carboxilo que podría quedar retenido en la misma (Mastovska & Lightfield, 2008; Zhi et al., 2020). Por otro lado, la ausencia de agua u otro solvente de mayor polaridad que el acetonitrilo y la presencia de MgSO_4 dificultó la extracción de los compuestos más polares como macrólidos y tetraciclinas.

De acuerdo a la respuesta absoluta de los compuestos de interés y a la simplicidad de preparación, el solvente seleccionado fue la mezcla de agua/acetonitrilo (20/80) ya que, aunque los resultados fueron muy similares a los obtenidos para la mezcla tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80), en el caso de la clortetraciclina, amoxicilina y penicilina V, la respuesta absoluta obtenida fue baja cuando la extracción se realizó con tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80) lo que se consideró decisivo en la toma de decisión. Además, aunque la extracción de las tetraciclinas se vio favorecida por la presencia de Na_2EDTA en el solvente, la combinación agua/acetonitrilo (20/80) produjo respuestas adecuadas para estos compuestos.

4.1.3.2. Riñón

Los resultados en la matriz riñón se muestran en la figura 4.6. También en este caso se muestran las respuestas normalizadas asignado un 100% a la obtenida en el solvente que produjo mayor respuesta. En este caso, los ensayos se realizaron con la matriz riñón bovino.

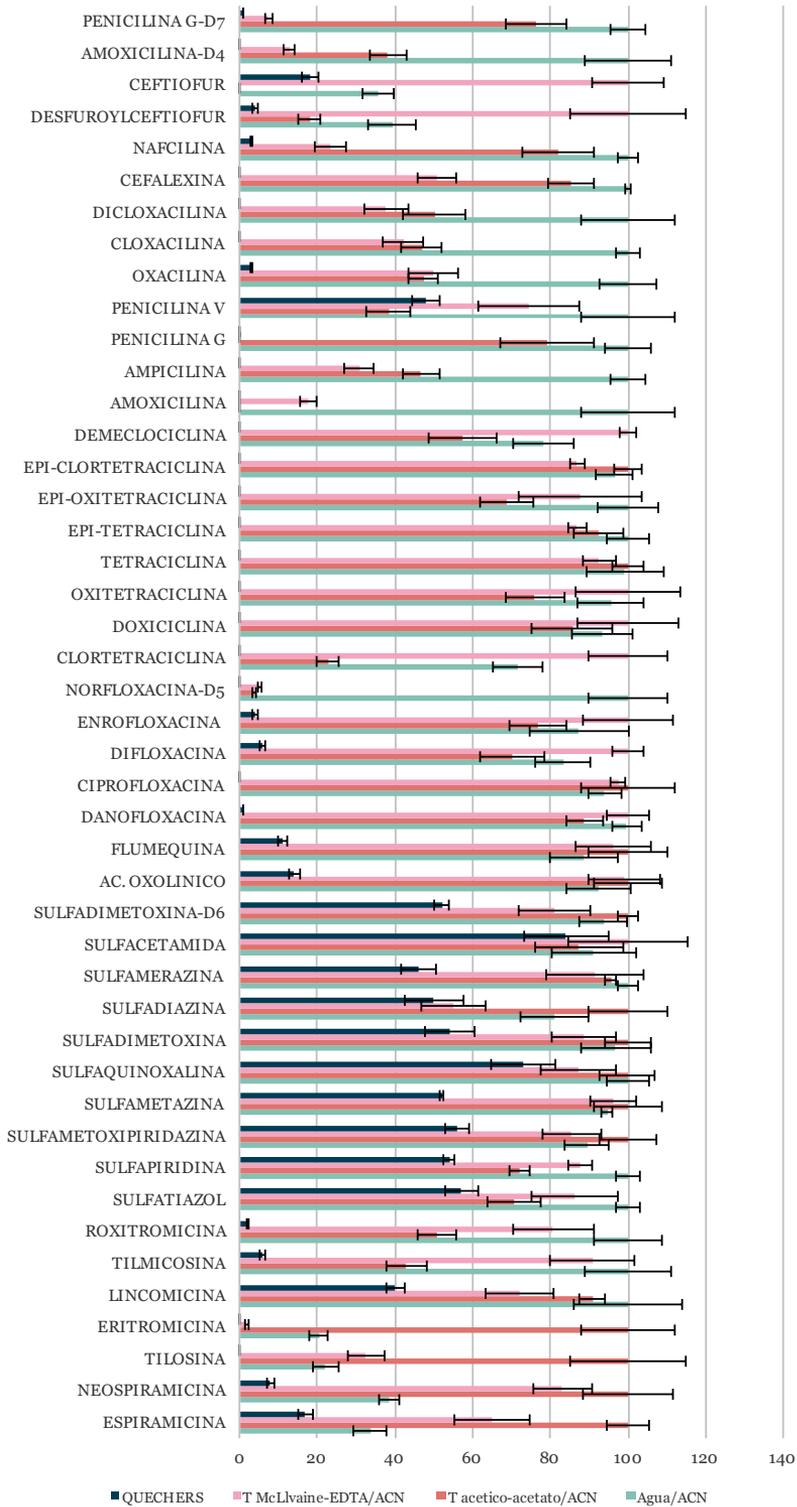


Figura 4.6. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción y el método QuE-ChERS. Riñón bovino fortificado a 20 µg/Kg.

En esta ocasión, la combinación de solventes agua/acetonitrilo dió lugar a respuestas más elevadas que las combinaciones de tampón ácido acético-acetato pH 5,2/acetonitrilo (20/80) y tampón McIlvaine- Na₂EDTA/acetonitrilo (20/80) pH 4 para mayor número de compuestos, 21 frente a 15 y 10, respectivamente. Entre los dos primeros solventes el comportamiento fue muy similar al de la matriz músculo, excepto para norfloxacin-d5, amoxicilina y ceftiofur que no fueron detectadas cuando se utilizó la mezcla tampón ácido acético-acetato pH 5,2/acetonitrilo (20/80) en ninguno de los 3 replicados realizados. Al igual que ocurrió para la matriz músculo, tampoco en este caso se produjeron diferencias relevantes entre los tres solventes para las sulfonamidas y quinolonas. En el caso de las tetraciclinas, al igual que en músculo, las mejores respuestas se obtuvieron mayoritariamente mediante la combinación de tampón McIlvaine- Na₂EDTA/acetonitrilo (20/80) pH 4, si bien, la mezcla agua/acetonitrilo (20/80) también dio lugar a resultados muy similares. Finalmente, fue para los β-lactámicos para los que se produjeron mayores diferencias de respuestas, siendo claramente la combinación agua/acetonitrilo (20/80) la de elección ya que, en el caso de la combinación tampón ácido acético-acetato pH 5,2/acetonitrilo (20/80), como ya se ha comentado anteriormente, no se obtuvo respuesta para la amoxicilina y ceftiofur y, mediante el tampón McIlvaine- Na₂EDTA/acetonitrilo (20/80) pH 4, ocurrió lo mismo para la penicilina G y penicilina G-d7, lo que fue decisivo para selección del solvente agua/acetonitrilo (20/80).

Respecto al método QuEChERS para esta matriz, se reprodujeron los resultados obtenidos para la matriz músculo, también con un 64% de analitos que no fueron detectados o que su respuesta fue muy inferior a la obtenida para los otros métodos.

4.1.3.3. Leche

En esta matriz se ensayó además, la extracción con acetonitrilo como único solvente de extracción ya que había sido utilizada y recomendada por varios autores en métodos multiclase aplicados a residuos de medicamentos veterinarios y otros contaminantes (Mol et al., 2008; Smith et al., 2009; Zhan et al., 2013) por favorecer la precipitación de proteínas respecto al metanol que da lugar a extractos más turbios. El método QuEChERS no fue ensayado en esta matriz debido a que los resultados obtenidos en músculo y riñón no fueron satisfactorios.

Los resultados se muestran en la figura 4.7 utilizando la misma sistemática que en para las anteriores matrices. La matriz ensayada fue leche de cabra.

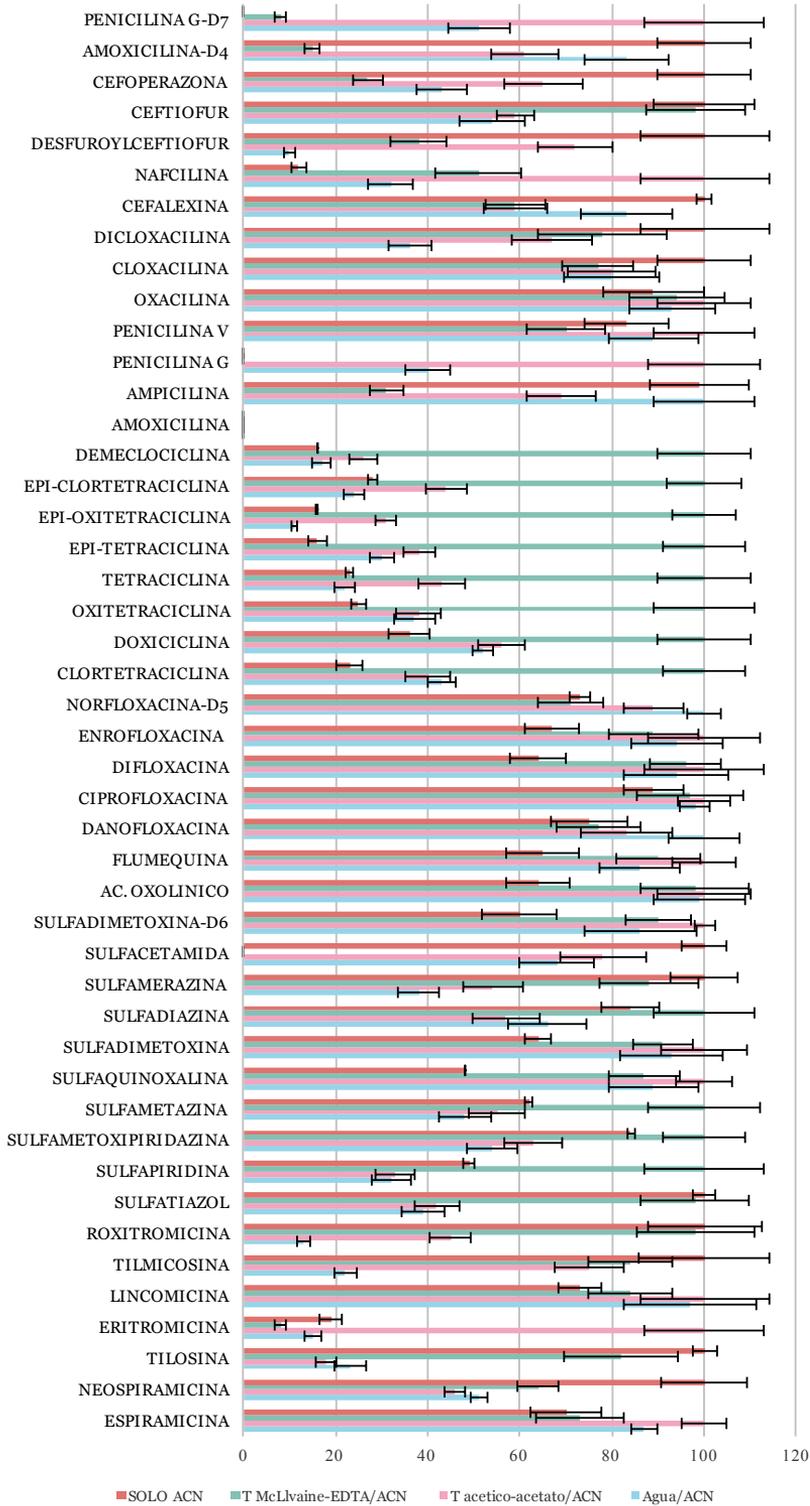


Figura 4.7. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción. Leche caprino fortificada a 1/2 LMR.

La combinación de tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80) fue la que dio lugar a que el mayor número de antibióticos (concretamente 16) mejorasen su respuesta respecto a los demás solventes de extracción. Le siguieron la utilización de acetonitrilo y la combinación de tampón McIlvaine- Na₂EDTA/acetonitrilo (20/80) pH 4 con 14 y 12 compuestos, respectivamente. Para esta matriz, la combinación de agua/acetonitrilo (20/80) tan solo mejoró la respuesta de 3 analitos (danofloxacina, norfloxacina-D5 y ampicilina) respecto a las otros solventes de extracción, aunque apenas existió diferencia en las respuestas obtenidas para gran número de compuestos, respecto a las respuestas obtenidas con la combinación de tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80) y el solvente acetonitrilo. Únicamente marcó desfavorablemente diferencia para las moléculas eritromicina, roxitromicina y desfuoylceftiofur.

De nuevo la combinación de tampón McIlvaine- Na₂EDTA/acetonitrilo (20/80) pH 4 favoreció la extracción de las tetraciclinas.

Para las familias sulfonamidas y quinolonas, tampoco en este caso se produjeron diferencias relevantes entre los distintos solventes obteniéndose respuestas elevadas y adecuadas en todos los casos.

La familia β -lactámicos se vio favorecida en la extracción con acetonitrilo que confirió al medio un pH similar al producido por la combinación agua/acetonitrilo, más cercano a la neutralidad.

El solvente seleccionado fue la combinación de tampón ácido acético-acetato pH 5,2/acetonitrilo (20/80), no sólo por el número de compuestos para los que presenta mayor capacidad de extracción respecto a los demás solventes, sino, porque en el caso de la mezcla tampón McIlvaine- Na₂EDTA/acetonitrilo (20/80) pH 4, no

se obtuvo respuesta para la sulfacetamida, amoxicilina ni penicilina G; y, en el caso del solvente acetonitrilo, ni amoxicilina, ni penicilina G ni penicilina G-D7 fueron detectadas a las concentraciones ensayadas (1/2 LMR), lo que fue decisivo para la selección.

4.1.4. Evaluación del efecto matriz y la recuperación

El efecto matriz se evaluó de acuerdo a lo indicado en la sección 3 de Materiales y Métodos (apartado 3.3.1.5). Para la interpretación de los resultados se tuvo en cuenta la clasificación realizada por otros autores (Ferrer et al 2011; León et al., 2012) que clasifican el efecto matriz en tres categorías. Para un porcentaje entre -20% y +20% se consideró que no existía efecto matriz ya que son valores cercanos a la repetibilidad; entre -50% y -20% o +20% y +50%, se consideró un efecto matriz moderado; y, por debajo de -50% y por encima de +50%, el efecto matriz se consideró elevado.

4.1.4.1. Músculo

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.8. Se incluye el porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada compuesto; porcentaje de recuperación absoluta (%RE); el porcentaje de efecto matriz corregido con los patrones internos (%EM corregido) y el porcentaje de recuperación corregida con los patrones internos (%RE corregida).

Dos compuestos de 45 presentaron un elevado efecto matriz, 15 compuestos presentaron efecto matriz moderado y el resto no presentó efecto matriz. Un 91% de los compuestos presentó como efecto matriz la supresión iónica y tan solo un 9% presentaron exaltación iónica. Los dos compuestos que presentaron efecto matriz elevado fueron eritromicina y sulfacetamida: en el primer caso, se trató de un aumento de la señal, probablemente debido a componentes de la matriz que coeluyeron y favorecieron la ionización y, en el caso de la sulfacetamida, se trató de una supresión iónica explicable por tratarse de un compuesto que eluye en los primeros minutos de la cromatografía y, que, por lo tanto, pudo producirse algún mecanismo competitivo. Para otros compuestos como la amoxicilina, amoxicilina-D4 y algunas sulfonamidas, que también eluyen en los primeros minutos, se produjo un efecto matriz moderado. La ausencia de efecto matriz se evidenció para la familia de tetraciclinas y gran parte de los β -lactámicos.

4.1.4.2. Riñón

La figura 4.9 muestra los resultados obtenidos en este estudio para la matriz riñón. Los parámetros mostrados son los mismos que los presentados en la figura anterior.

En este caso, 5 compuestos de 45 presentaron un elevado efecto matriz, 16 presentaron efecto matriz moderado y el resto no presentó efecto matriz. Un 60% de los compuestos presentó como efecto matriz la supresión iónica y un 40% presentaron exaltación iónica. Los compuestos que presentaron efecto matriz elevado fueron sulfacetamida, amoxicilina y amoxicilina-D4, que son los tres primeros compuestos que eluyen y, por lo tanto, más susceptibles de verse afectados por los compuestos polares interferentes que co-eluyen con ellos al principio de la cromatografía. Aunque también se obtuvieron valores elevados para tilosina y tilmicosina, que no eluyen en un tiempo corto, pero deben coeluir con componentes que disminuyen la eficacia de su ionización. Al contrario que en músculo, en general, los β -lactámicos presentaron valores de efecto matriz moderados y tanto positivos como negativos. Los valores más bajos de efecto matriz, se produjeron, en este caso, para gran parte de las sulfonamidas y para las quinolonas, lo que evidencia el diferente comportamiento, en este sentido, del método para las matrices riñón y músculo. El hecho de que en riñón, el % de moléculas en las que se produce una exaltación de la señal sea mayor que en músculo, podría tener su explicación en la presencia de compuestos que favorecen la ionización de muchos de los compuestos en lugar de competir para disminuir la eficacia de la ionización.

4.1.4.3. Recuperaciones y compensación del efecto matriz en las matrices músculo y riñón

Respecto a las recuperaciones absolutas obtenidas para la matriz músculo, estas oscilaron entre 38% para la doxicilina y 76% para la ciprofloxacina, obteniéndose recuperaciones >60% para el 53% de los compuestos (ver figura 4.8). Y para la matriz riñón, estas oscilaron entre 37% para la espiramicina y 115% para la eritromicina, obteniéndose recuperaciones >60% para el 87% de los compuestos (ver figura 4.9).

Con el objeto de compensar o minimizar estos efectos de supresión y exaltación iónica, se calculó el efecto matriz, del mismo modo anterior, pero teniendo en cuenta las medias de las respuestas relativas a los patrones internos (área del analito/área del patrón interno) para cada familia de compuestos en lugar de las medias de las respuestas absolutas. Con ello se produjo una gran mejoría en el efecto matriz para la gran mayoría de compuestos en ambas matrices. En músculo, ningún compuesto presentó efecto matriz elevado, un 21% presentó efecto matriz moderado y un 79% no presentó efecto matriz. Para el riñón, tampoco se produjo efecto matriz elevado en ningún compuesto, un 26% presentó efecto matriz moderado y un 74% no presentó efecto matriz (ver figuras 4.8. y 4.9).

Respecto a las recuperaciones, tras ser corregidas utilizando para su cálculo la relación área analito/área patrón interno, estas pasaron a encontrarse entre el 65% para doxicilina y el 131% para eritromicina y lincomicina, en el caso del músculo. Y, en el caso del riñón, las recuperaciones corregidas oscilaron entre 51% para cefotiofur y 166% eritromicina, obteniéndose recuperaciones >60% para el 90% de los compuestos (ver figuras 4.8. y 4.9).

Todo ello evidencia la necesidad de utilizar patrones internos para compensar, en muchos casos, el efecto matriz, si bien es cierto que para propósitos cuantitativos, sería necesario estudiar cada compuesto de forma individual, además, de la utilización de curvas de calibración en matriz de manera que se llegue a una situación de compromiso que permita garantizar la fiabilidad de los resultados de acuerdo a la legislación aplicable.

4.1.4.4. Leche

En el caso de la matriz leche, al tratarse de un método de cribado cualitativo y cuantitativo, el estudio se llevó a cabo en los tres niveles de concentración estudiados, nivel bajo, medio y alto. Las concentraciones correspondientes a cada nivel quedan reflejadas en la tabla 4.8.

Los resultados para los tres niveles de concentración se muestran en las figuras 4.10, 4.11 y 4.12, conteniendo la misma información que para las matrices músculo y riñón.

04. Resultados y discusión

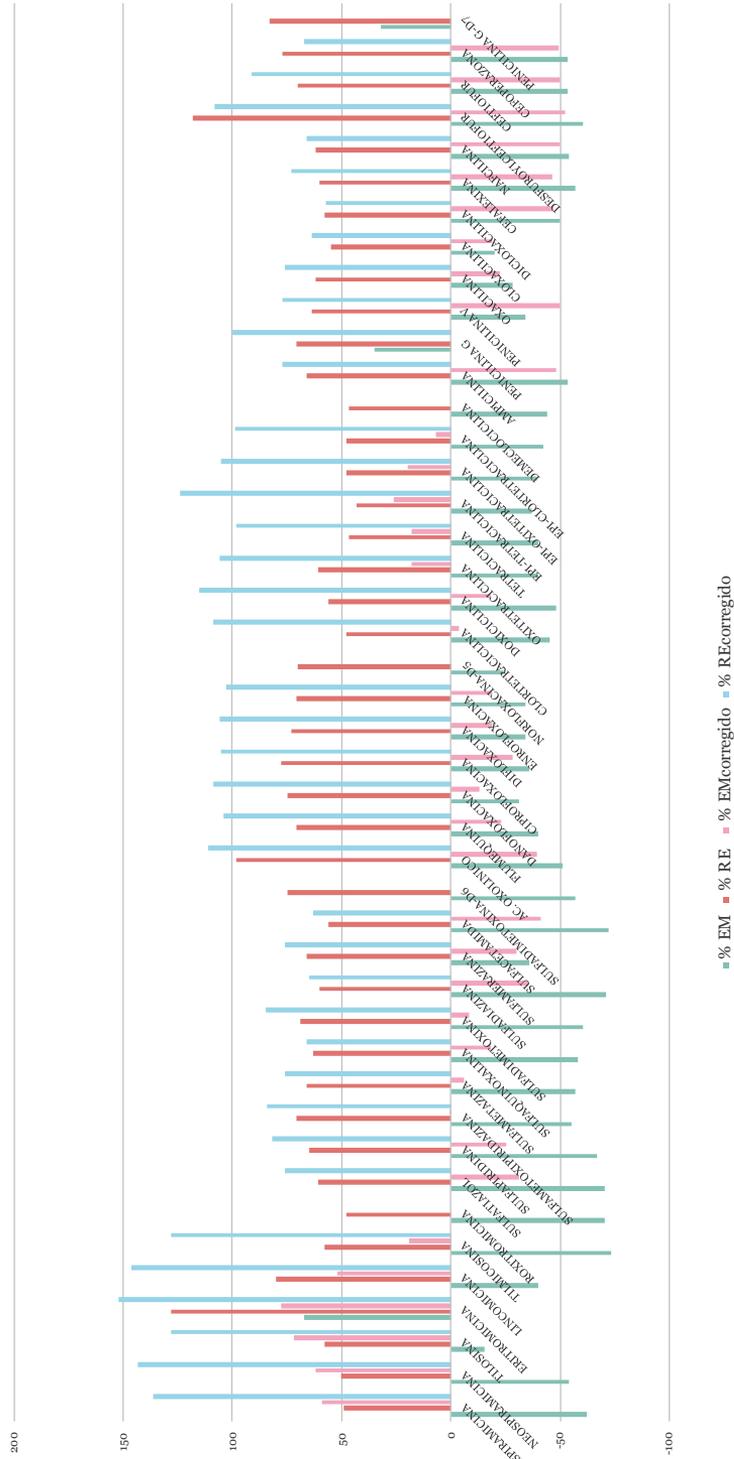


Figura 4.10. % Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorrectido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorrectido) en leche. n=3. Nivel bajo.

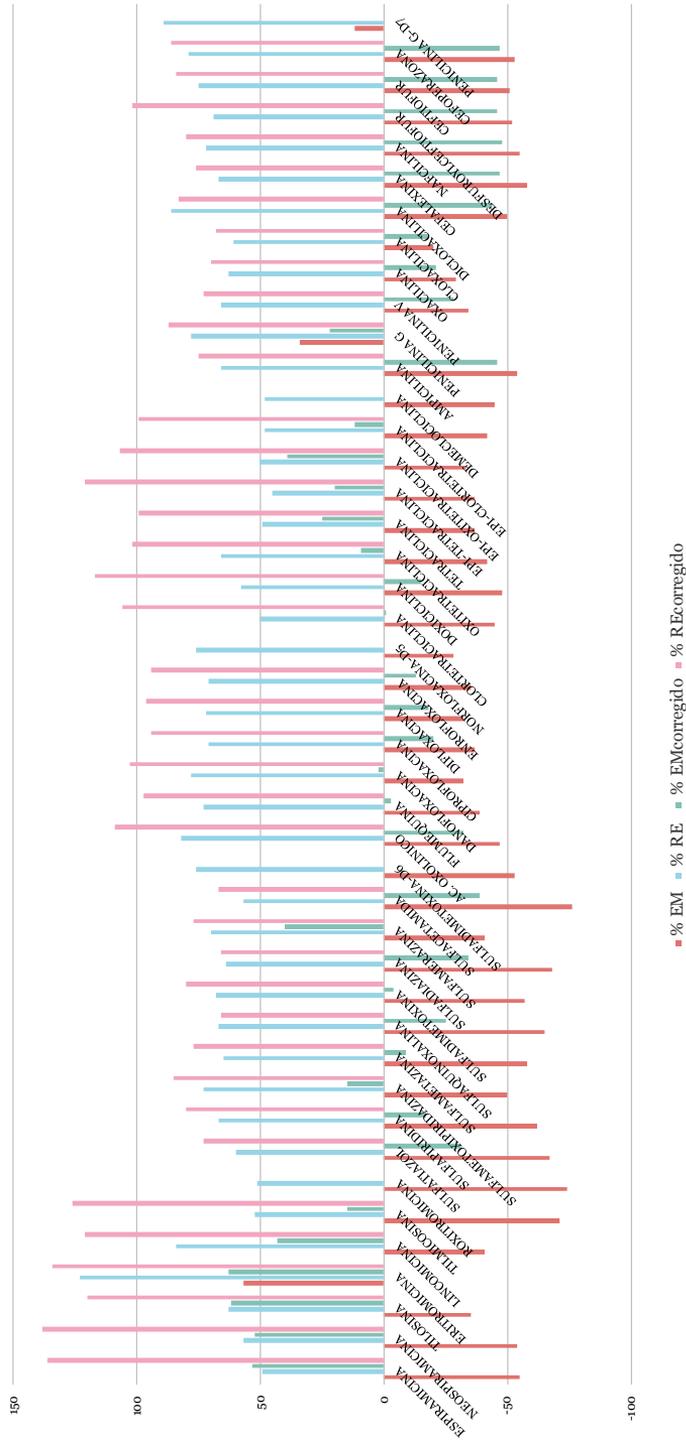


Figura 4.11. % Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorrectido) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorrectida) en leche. n=3. Nivel medio.

Para el nivel bajo, un 48 % de los compuestos presentaron un elevado efecto matriz, un 48 % presentaron efecto matriz moderado y para el resto no se presentó efecto matriz. Esto se explica porque los extractos obtenidos fueron concentrados diez veces para poder llegar a los niveles de concentración requeridos. La mayoría de los compuestos (93%) presentó un efecto matriz de supresión iónica. Los compuestos que presentaron efecto matriz elevado fueron la mayoría de macrólidos, sulfamidas y cefalosporinas, coincidiendo, en algunos casos, con analitos que eluyen en los primeros minutos del cromatograma, como sulfacetamida, sulfadiazina, sulfatiazol y sulfapiridina y, en otros casos, con analitos que eluyen posteriormente, como es la eritromicina, espiramicina, tilmicosina, roxitromicina y desfuoylceftiofur, entre otros. Ello indica que los mecanismos competitivos por los que se produce la supresión iónica o los mecanismos que favorecen la ionización debidos a compuestos interferentes no necesariamente se producen en los primeros minutos de la cromatografía, sino que, hay compuestos que eluyen en tiempos posteriores y que producen los mismos efectos. Los analitos para los que se produjo un efecto matriz moderado fueron, en general, las quinolonas, tetraciclinas y penicilinas, independientemente del momento de la elución. Los únicos compuestos para los que no se produjo efecto matriz fueron la tilosina y la cloxacilina que eluyen alrededor del minuto 7 del cromatograma.

Algo similar ocurrió en el nivel medio estudiado, un 43 % de los compuestos presentaron un elevado efecto matriz y un 52% presentaron efecto matriz moderado. También un 93% presentaron como efecto matriz la supresión iónica y, además, las mismas familias se vieron afectadas por el efecto matriz elevado, moderado y bajo. A este nivel de concentración, en general, los valores obtenidos para el efecto matriz fueron ligeramente inferiores a los obtenidos a nivel bajo del intervalo de trabajo siendo un 43% de los compuestos los que mejoraron el valor del efecto matriz.

Para el nivel superior, disminuyó el % de compuestos para los que se produjo efecto matriz elevado a un 32% y para el mismo % de analitos se produjo la supresión iónica. Las mismas familias de antibióticos se vieron afectadas por el efecto matriz elevado y, en este caso, tan sólo penicilina G y penicilina G-d7 no se vieron afectadas por el efecto matriz.

Respecto a las recuperaciones absolutas obtenidas a nivel bajo de concentración estas oscilaron entre 43 % para la 4-epitetraciclina y 128 % para la eritromicina, muy similares a las obtenidas también para los niveles medio y alto. Se obtuvieron recuperaciones >60% para el 63% de los compuestos a nivel bajo, para el 72% de los compuestos a nivel medio y para el 76% a nivel alto.

Un 63% de los analitos mejoraron el valor del efecto matriz respecto al valor obtenido en el nivel bajo de concentración, lo que indica que, para el rango de concentración estudiado, se aprecia una disminución del efecto matriz al aumentar la concentración de los analitos.

4.1.4.5. Recuperaciones y compensación del efecto matriz en la matriz leche

Al igual que para las matrices músculo y riñón, para la matriz leche también se calculó el efecto matriz teniendo en cuenta las respuestas relativas a los patrones internos para cada familia de compuestos. Se produjo una mejoría apreciable del efecto matriz en todos los niveles de concentración y para prácticamente todos los compuestos excepto algunos pertenecientes a la familia de los macrólidos. En el nivel bajo de concentración, tras compensar el efecto matriz con los patrones internos, tan solo el 15 % de las moléculas se vieron afectadas (especialmente macrólidos) por un efecto matriz elevado, el 43 % por un efecto matriz moderado y el 40

% no se vio afectada por el efecto matriz. En el nivel medio de concentración, el 10 % presentó efecto matriz elevado (especialmente macrólidos), el 48% moderado y el resto no se vieron afectadas por el efecto matriz. Y, finalmente, para el nivel de concentración superior, tan sólo un 8% de los analitos se vieron afectados por un efecto matriz elevado (especialmente macrólidos), el 45% moderado y el resto no se vieron afectadas. En general, aproximadamente un 85% de los compuestos mejoraron el valor del efecto matriz tras la corrección en todos los niveles de concentración, lo que demuestra que la corrección con los patrones internos puede ser igualmente eficaz aunque estos no sean compuestos isotópicamente marcados de cada compuesto. De los patrones internos utilizados en el estudio, tan solo la sulfadimetoxina-d6 y penicilina G-d7 son compuestos marcados isotópicamente. (Ver figuras 4.10, 4.11 y 4.12).

Respecto a las recuperaciones corregidas, estas oscilaron entre el 57% para dicloxacilina y 152% para eritromicina, en el nivel bajo de concentración; 66% para sulfaminoxalina y sulfadiazina y 138% para neospiramicina, en el nivel medio y entre el 66% para dicloxacilina y sulfatiazol y el 135% para la neospiramicina. (Ver figuras 4.10, 4.11 y 4.12).

Todo ello indica la necesidad de realizar la cuantificación mediante curvas de calibrado en matriz utilizando patrones internos, excepto en el caso de la familia de macrólidos donde se evidencia la falta de eficacia del patrón interno roxitromicina para compensar el efecto matriz, especialmente a nivel bajo del rango estudiado. Para estas moléculas se opta por la cuantificación con curva en matriz sin corrección con patrón interno.

4.1.5. Validación de los métodos

4.1.5.1. Validación cualitativa

Los resultados de los parámetros de las validaciones cualitativas para las matrices músculo, riñón y leche se muestran en las tablas 4.5, 4.6 y 4.7, respectivamente. Allí se indican los valores obtenidos para las medias de las respuestas relativas en las muestras blancas analizadas (B), excepto para macrólidos y lincosamida en leche que se utilizan las respuestas absolutas. También se muestran los valores de *Threshold value T*, el *Cut-off factor Fm* y el valor de $CC\beta$ para cada compuesto.

Tabla 4.5. Resultados de los parámetros de validación cualitativa músculo. Respuesta media de blancos (B), *Threshold value T*, *Cut-off factor Fm*, $CC\beta$.

ANALITO	B	T	Fm	$CC\beta$ ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
TETRACICLINAS				
Epi-tetraciclina	0,006	0,052	0,970	25
Tetraciclina	0,011	0,126	1,753	25
Epi-oxitetraciclina	0,000	0,000	0,521	25
Oxitetraciclina	0,006	0,049	1,211	25
Epi-clortetraciclina	0,000	0,000	0,332	25
Clortetraciclina	0,000	0,000	0,718	25
Doxiciclina	0,011	0,097	1,366	25
β-LACTÁMICOS				
Amoxicilina	0,000	0,000	0,161	12,5
Ampicilina	0,000	0,000	0,524	12,5
Penicilina G	0,000	0,000	0,110	12,5
Penicilina V	0,000	0,000	0,077	6,25
Oxacilina	0,000	0,000	0,594	75
Cloxacilina	0,000	0,000	0,341	75

ANALITO	B	T	Fm	CCβ (µg/Kg)
Dicloxacilina	0,000	0,000	0,121	75
Nafcilina	0,000	0,000	0,667	75
Cefalexina	0,000	0,000	0,859	50
Ceftiofur	0,000	0,000	0,315	250
Desfuoylceftiofur	0,000	0,000	2,257	250
QUINOLONAS				
Danofloxacin	0,000	0,000	0,638	25
Difloxacin	0,002	0,013	1,598	75
Ciprofloxacina	0,000	0,000	0,553	25
Enrofloxacin	0,002	0,020	0,518	25
Flumequina	0,000	0,000	1,631	50
Acido Oxolínico	0,011	0,041	1,488	25
MACRÓLIDOS				
Eritromicina A	0,000	0,000	0,150	50
Espiramicina 1	0,000	0,000	0,141	50
Neospiramicina	0,000	0,000	0,153	50
Tilmicosina	0,000	0,000	0,035	13
Tilosina A	0,000	0,000	0,012	25
LINCOSAMIDAS				
Lincomicina	0,000	0,000	0,630	25
SULFONAMIDAS				
Sulfatiazol	0,000	0,000	0,061	25
Sulfadiazina	0,000	0,000	0,046	25
Sulfamerazina	0,000	0,000	0,238	25
Sulfacetamida	0,000	0,000	0,013	25
Sulfadimetoxina	0,000	0,000	0,594	25
Sulfametazina	0,000	0,000	0,421	25
Sulfametoxypyridazina	0,000	0,000	0,283	25
Sulfapyridina	0,000	0,000	0,312	25
Sulfaquinoxalina	0,000	0,000	0,060	25

Tabla 4.6. Resultados de los parámetros de validación cualitativa riñón. Respuesta media de blancos (B), *Threshold value* T, *Cut-off factor* Fm, CCB.

ANALITO	B	T	Fm	CCβ (μg/Kg)
TETRACICLINAS				
Epi-tetraciclina	0,004	0,035	4,559	100
Tetraciclina	0,000	0,000	9,604	100
Epi-oxitetraciclina	0,065	0,314	3,033	100
Oxitetraciclina	0,102	0,698	5,865	100
Epi-clortetraciclina	0,000	0,000	1,365	100
Clortetraciclina	0,012	0,111	3,600	100
Doxiciclina	0,021	0,202	6,065	100
β-LACTÁMICOS				
Amoxicilina	0,000	0,000	0,107	12,5
Ampicilina	0,000	0,000	0,329	12,5
Penicilina G	0,002	0,015	0,167	12,5
Penicilina V	0,000	0,000	0,078	6,25
Oxacilina	0,000	0,000	0,707	75
Cloxacilina	0,000	0,000	0,480	75
Dicloxacilina	0,000	0,000	0,068	75
Nafcilina	0,000	0,000	0,643	75
Cefalexina	0,003	0,032	0,551	50
Ceftiofur	0,000	0,000	0,388	250
Desfuoylceftiofur	0,000	0,000	0,079	250
QUINOLONAS				
Danofloxacina	0,000	0,000	1,262	50
Difloxacina	0,000	0,000	3,901	150
Ciprofloxacina	0,009	0,085	1,100	50
Enrofloxacina	0,000	0,000	1,435	50
Flumequina	0,001	0,008	4,914	250
Acido Oxolínico	0,002	0,012	1,268	38

ANALITO	B	T	Fm	CCβ (μg/Kg)
MACRÓLIDOS				
Eritromicina A	0,000	0,000	0,206	50
Espiramicina 1	0,000	0,000	0,248	150
Neospiramicina	0,000	0,000	0,237	150
Tilmicosina	0,000	0,000	1,033	250
Tilosina A	0,000	0,000	0,074	25
LINCOSAMIDAS				
Lincomicina	0,035	0,262	22,062	375
SULFONAMIDAS				
Sulfatiazol	0,000	0,000	0,049	25
Sulfadiazina	0,002	0,013	0,087	25
Sulfamerazina	0,000	0,000	0,144	25
Sulfacetamida	0,000	0,000	0,028	25
Sulfadimetoxina	0,000	0,000	0,578	25
Sulfametazina	0,000	0,000	0,445	25
Sulfametoxyridazina	0,000	0,000	0,262	25
Sulfapyridina	0,000	0,000	0,227	25
Sulfaquinoxalina	0,000	0,000	0,076	25

Tabla 4.7. Resultados parámetros de validación cualitativa leche. Respuesta media de blancos (B), *Threshold value* T, *Cut-off factor* Fm, CCβ.

ANALITO	B	T	Fm	CCβ (μg/Kg)
TETRACICLINAS				
Epi-tetraciclina	0,000	0,000	0,296	25
Tetraciclina	0,000	0,000	0,775	25
Epi-oxitetraciclina	0,000	0,000	0,133	25
Oxitetraciclina	0,001	0,008	0,777	25
Epi-clortetraciclina	0,000	0,000	0,295	25
Clortetraciclina	0,000	0,000	0,171	25

ANALITO	B	T	Fm	CCβ (μg/Kg)
Doxiciclina	0,001	0,006	1,019	25
β-LACTÁMICOS				
Ampicilina	0,000	0,000	0,016	2,00
Penicilina G	0,000	0,000	0,006	1,00
Penicilina V	0,000	0,000	0,020	6,25
Oxacilina	0,000	0,000	0,025	7,50
Cloxacilina	0,000	0,000	0,012	7,50
Dicloxacilina	0,000	0,000	0,005	7,50
Nafcilina	0,000	0,000	0,018	7,50
Cefalexina	0,000	0,000	0,101	25
Cefoperazona	0,000	0,000	0,007	12,50
Ceftiofur	0,000	0,000	0,092	25
Desfuroylceftiofur	0,000	0,000	0,002	50
QUINOLONAS				
Danofloxacina	0,000	0,000	0,072	7,50
Difloxacina	0,000	0,003	0,605	75
Ciprofloxacina	0,005	0,023	0,211	25
Enrofloxacina	0,001	0,005	0,318	25
Flumequina	0,000	0,002	0,190	12,50
Acido Oxolínico	0,000	0,000	0,588	25
MACRÓLIDOS				
Eritromicina A	4.664	24.828	212.404	10
Espiramicina 1	0	0	3.553.387	50
Neospiramicina	1.944	12.508	4.592.225	50
Tilmicosina	807	4.918	158.545	12,50
Tilosina A	11.389	30.360	70.505	12,50
LINCOSAMIDAS				
Lincomicina	94.408	925.200	12.747.653	37,50

ANALITO	B	T	Fm	CCβ (µg/Kg)
SULFONAMIDAS				
Sulfatiazol	0,000	0,001	0,016	25
Sulfadiazina	0,001	0,004	0,024	25
Sulfamerazina	0,000	0,000	0,077	25
Sulfacetamida	0,000	0,000	0,002	25
Sulfadimetoxina	0,002	0,007	0,251	25
Sulfametazina	0,000	0,000	0,154	25
Sulfametoxyppyridazina	0,001	0,002	0,145	25
Sulfapyridina	0,001	0,003	0,049	25
Sulfaquinoxalina	0,000	0,000	0,086	25

a) Especificidad. *Threshold value T*

Se consideró que los métodos estuvieron libres de interferencias ya que no se obtuvo señal en el tiempo de retención de los analitos, para una exactitud de masa < 5 ppm, en ninguna de las 20 muestras ensayadas de cada matriz y en aquellos casos que se obtuvo, esta fue muy inferior a la señal obtenida en las muestras adicionadas a la concentración del cribado, como se puede observar en los datos de B (valor medio de la respuesta relativa en las muestras blanco) mostrados en las tablas 4.5, 4.6 y 4.7. También se muestran los valores de *Threshold value T*.

En el caso de la familia macrólidos y lincosamida en la matriz leche, se utilizaron las respuestas absolutas en lugar de relativas para el cálculo de los parámetros.

Con ello quedó demostrada la especificidad de los métodos propuestos para las matrices músculo, riñón y leche por LC-HRMS.

Las figuras 4.13., 4.14. y 4.15. muestran cromatogramas para las distintas matrices de muestras blanco y muestras adicionadas a la concentración correspondiente al CCβ para las matrices músculo, riñón y leche, respectivamente.

La figura 4.13. muestra el cromatograma de una muestra blanco de músculo de porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCB en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

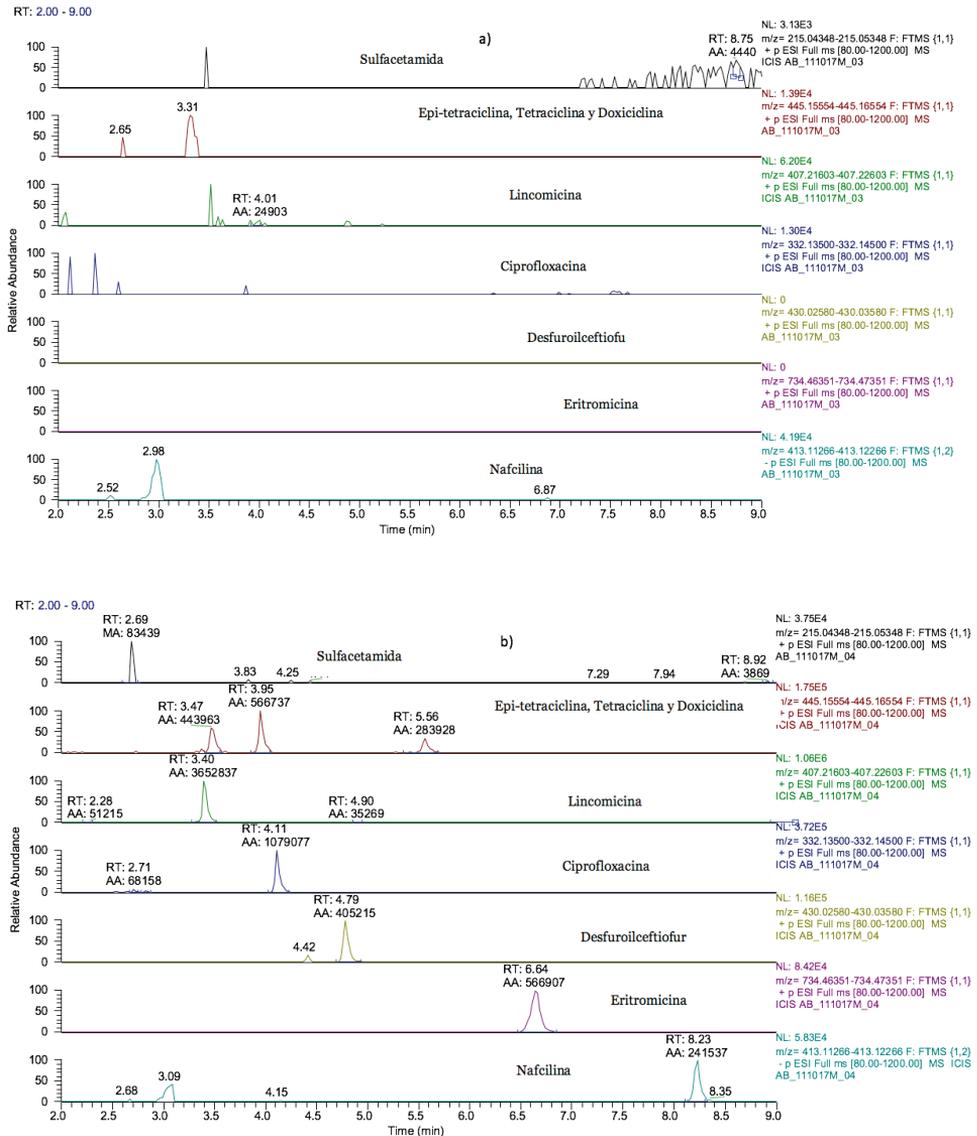


Figura 4.13. Cromatograma de una muestra blanco de músculo de porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCB en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

La figura 4.14. muestra el cromatograma de una muestra blanco de riñón de porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCβ en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

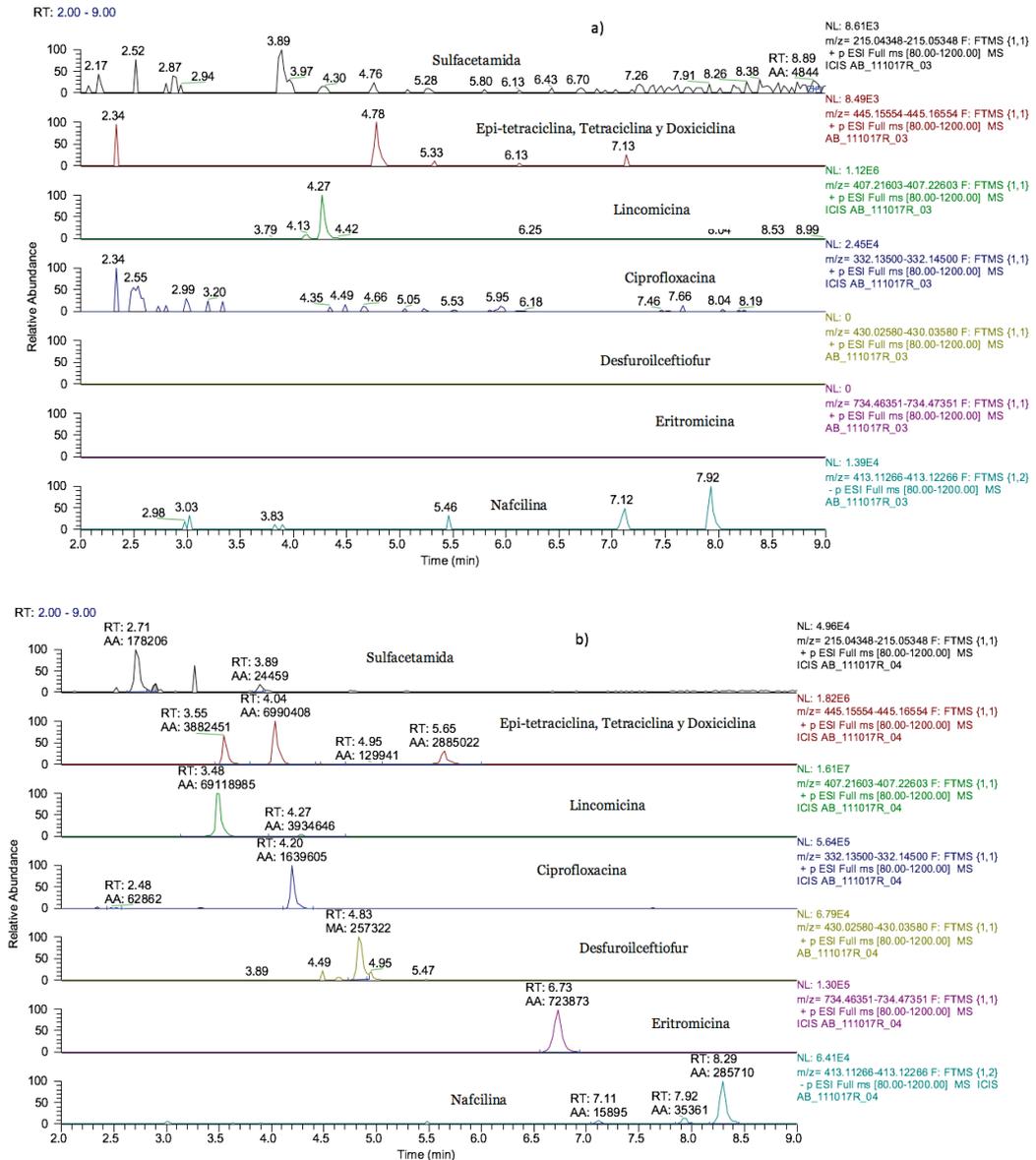


Figura 4.14. Cromatograma de una muestra blanco de riñón de porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CCβ en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

La figura 4.15. muestra el cromatograma de una muestra blanco de leche de caprino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CC β en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

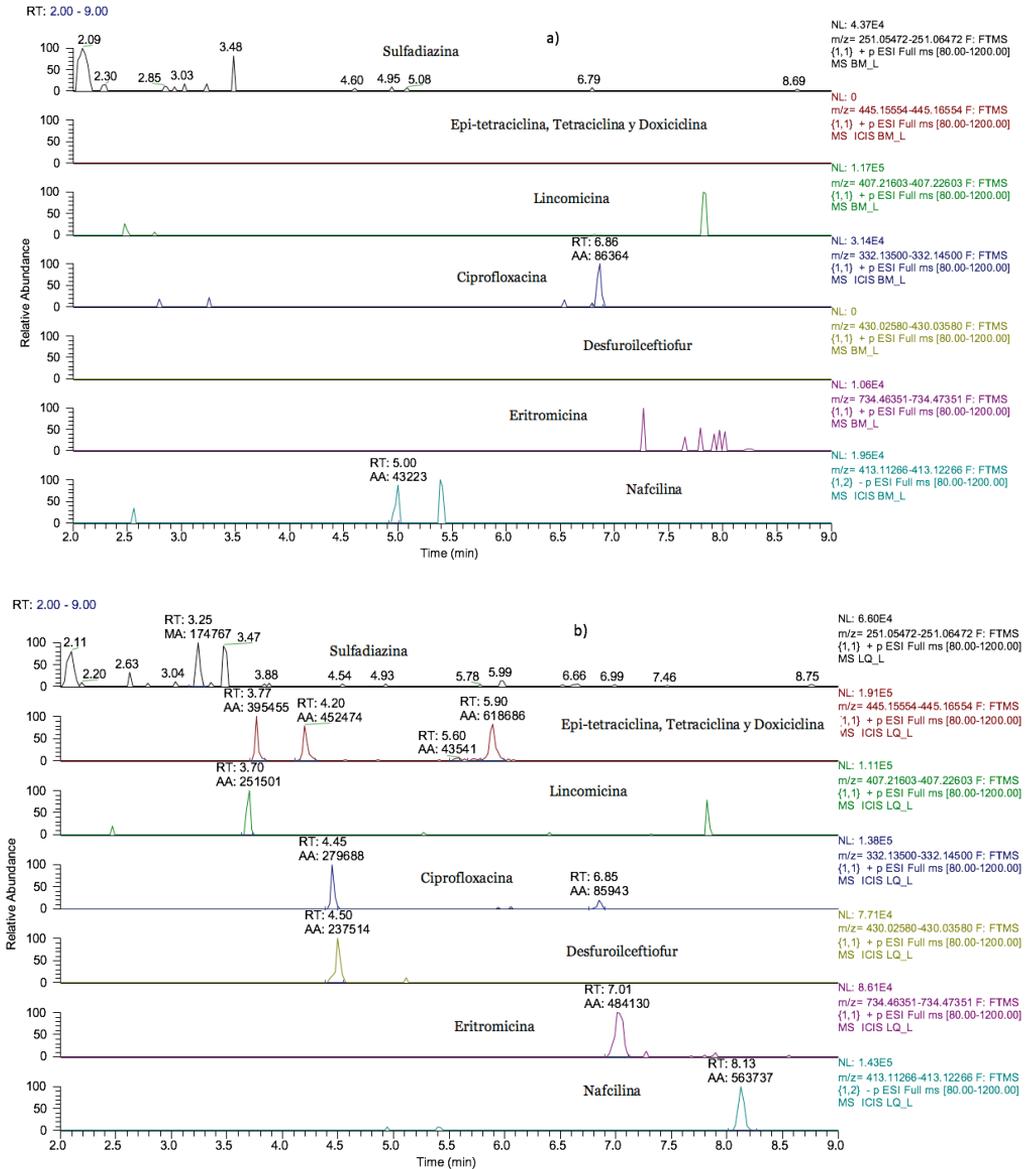


Figura 4.15. Cromatograma de una muestra blanco de leche de caprino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al CC β en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

b) Cut-off Factor F_m y CCB

En todos los casos el *cut-off factor* $F_m > B$, con lo que quedó validado el método para el nivel de concentración $\frac{1}{4}$ LMR para cada analito en músculo, riñón y leche (excepto ampicilina, ceftiofur y desfuroilceftiofur que fue $\frac{1}{2}$ LMR en leche). Ello implicó, de acuerdo a la Guía de validación de métodos de *screening* de los CRLs, (Community Reference Laboratories (CRLs), 2010) que el n° de falsos negativos para ese nivel fue $\leq 5\%$, con lo que dicho nivel de concentración se consideró el CCB. Por otro lado, también en todos los casos se cumplió que $F_m > T$, con lo que el n° de falsos positivos fue $< 5\%$ para todos los analitos.

4.1.5.2. Validación cuantitativa en leche

La tabla 4.8 muestra los resultados de los parámetros correspondientes a la validación cuantitativa en leche y además, el tiempo de retención de los compuestos. El CCB coincide con el límite de cuantificación en todos los casos. Se indica el rango de trabajo validado para cada antibiótico, el coeficiente de determinación (R^2) mínimo en cada caso, la veracidad (expresada como sesgo en %), la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel de concentración, expresadas como desviación estándar relativa o coeficiente de variación en % (RSDr % y RSDR %, respectivamente).

Tabla 4.8. Resultados parámetros de validación cuantitativa leche y tiempo de retención. CCβ/Límite de cuantificación (LC), rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %) y reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %).

ANALITO	RT	CCβ/LC (μg/Kg)	Rango (μg/Kg)	R^2	Conc. (μg/Kg)	Veracidad (Sesgo %) n=21	RSD_r (%) n=21	RSD_R (%) n=21
TETRACICLINAS								
Epi-tetraciclina	3,62	25	25-400	>0,994	25	6	11	22
					100	-5	9	16
					400	8	10	17
Tetraciclina	4,07	25	25-400	>0,991	25	9	10	11
					100	0	15	15
					400	1	19	20
Epi-oxitetraciclina	3,92	25	25-400	>0,995	25	5	12	24
					100	-3	13	18
					400	9	5	8
Oxitetraciclina	4,18	25	25-400	>0,994	25	6	13	16
					100	6	15	16
					400	5	15	17
Epi-clortetraciclina	4,48	25	25-400	>0,990	25	9	8	13
					100	1	13	14
					400	6	11	13
Clortetraciclina	4,99	25	25-200	>0,994	25	9	12	15
					100	1	9	17
					200	7	12	18
Doxiciclina	5,69	25	25-400	>0,995	25	2	14	15
					100	4	12	13
					400	8	13	15
β-LACTÁMICOS								
Ampicilina	4,38	2	2-16	>0,994	2	6	15	24
					4	-5	12	13
					16	-1	13	16

ANALITO	RT	CC β /LC (μ g/Kg)	Rango (μ g/Kg)	R ²	Conc. (μ g/Kg)	Veracidad (Sesgo %) n=21	RSD _r (%) n=21	RSD _R (%) n=21
Penicilina G	6,94	1	1-16	>0,997	1	6	15	16
					4	-5	15	16
					16	0	14	15
Penicilina V	7,48	6,25	6,25- 100	>0,991	6,25	7	14	17
					25	0	12	14
					100	1	15	16
Oxacilina	7,50	7,5	7,5-120	>0,995	7,5	4	11	13
					30	2	17	18
					120	-3	14	16
Cloxacilina	7,69	7,5	7,5-120	>0,995	7,5	7	10	12
					30	-1	17	18
					120	-1	12	14
Dicloxacilina	8,03	7,5	7,5-60	>0,991	7,5	3	22	25
					30	-5	18	24
					60	4	22	23
Nafcilina	8,05	7,5	7,5-60	>0,991	7,5	3	24	25
					30	-9	18	20
					60	-7	23	24
Cefalexina	4,17	25	25-400	>0,991	25	0	16	21
					100	0	14	15
					400	0	11	13
Ceftiofur	6,03	25	25-400	>0,994	25	-5	16	17
					100	-3	11	13
					400	1	12	14
Desfuroylceftiofur	4,68	50	50-400	>0,995	50	5	20	24
					100	0	17	22
					400	1	16	17
Cefoperazona	5,17	12,5	12,5- 200	>0,991	12,5	1	17	24
					50	-3	13	13
					200	0	12	14

04. Resultados y discusión

ANALITO	RT	CCβ/LC (µg/Kg)	Rango (µg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %) n=21	RSD _r (%) n=21	RSD _R (%) n=21
QUINOLONAS								
Danofloxacin	4,41	7,5	7,5-120	>0,993	7,5	-7	12	17
					30	-2	15	15
					120	-7	18	18
Difloxacin	4,55	75	75-1200	>0,992	75	-5	12	19
					300	0	16	16
					1200	-10	8	9
Ciprofloxacina	4,31	25	25-400	>0,990	25	3	12	15
					100	-3	13	13
					400	-9	15	17
Enrofloxacin	4,38	25	25-400	>0,993	25	-6	16	19
					100	-1	16	16
					400	-10	11	11
Flumequina	6,81	12,5	12,5-200	>0,993	12,5	-6	21	22
					50	2	12	13
					200	-6	10	14
Acido Oxolínico	5,89	25	25-200	>0,992	25	-2	13	18
					100	2	14	15
					200	-7	12	16
MACRÓLIDOS								
Eritromicina A	6,81	10	10-160	>0,995	10	1	16	22
					40	-4	17	18
					160	-10	16	21
Espiramicina 1	5,14	50	50-800	>0,992	50	7	12	16
					200	2	13	15
					800	-9	16	17
Neospiramicina	4,77	50	50-800	>0,994	50	8	10	10
					200	8	7	13
					800	-1	13	16

ANALITO	RT	CC β /LC (μ g/Kg)	Rango (μ g/Kg)	R ²	Conc. (μ g/Kg)	Veracidad (Sesgo %) n=21	RSD _r (%) n=21	RSD _R (%) n=21
Tilmicosina	5,81	12,5	12,5- 100	>0,992	12,5	1	11	21
					50	-1	13	16
					100	4	16	17
Tilosina A	6,91	12,5	12,5- 200	>0,995	12,5	-1	18	19
					50	-5	15	19
					200	6	18	20
LINCOSAMIDAS								
Lincomicina	3,52	37,5	37,5- 600	>0,992	37,5	-11	18	18
					150	4	16	17
					600	-3	11	16
SULFONAMIDAS								
Sulfatiazol	3,37	25	25-400	>0,993	25	-1	20	22
					100	8	15	17
					400	-4	12	19
Sulfadiazina	3,11	25	25-200	>0,990	25	-11	24	25
					100	-1	14	17
					200	-7	11	17
Sulfamerazina	3,64	25	25-200	>0,992	25	-11	21	25
					100	2	12	19
					200	-3	14	20
Sulfacetamida	2,59	25	25-200	>0,990	25	-6	24	25
					100	0	14	15
					200	0	12	21
Sulfadimetoxina	5,55	25	25-200	>0,992	25	-5	9	12
					100	2	7	10
					200	-2	8	10
Sulfametazina	4,12	25	25-200	>0,991	25	-4	23	24
					100	1	16	17
					200	-6	12	15

ANALITO	RT	CC β /LC ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R ²	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %) n=21	RSD _r (%) n=21	RSD _R (%) n=21
Sulfametoxypridazina	4,29	25	25-200	>0,993	25	2	17	18
					100	5	12	19
					200	-5	9	15
Sulfapyridina	3,44	25	25-200	>0,990	25	-9	13	17
					100	1	17	18
					200	-5	15	16
Sulfaquinoxalina	5,72	25	25-200	>0,994	25	-7	12	19
					100	3	9	12
					200	1	11	15

a) Rectas de calibrado y rango de trabajo

Los parámetros cuantitativos solamente fueron estudiados para la matriz leche ya que el método en esta matriz fue, además, de cribado cuantitativo.

Las rectas fueron construídas representando las áreas relativas (excepto macrólidos y lincosamida para las que se representaron las áreas absolutas) en el eje de las ordenadas frente a la concentración en muestra en el eje de las abcisas, realizándose la regresión lineal por mínimos cuadrados.

Los coeficientes de determinación R² obtenidos en las 7 rectas de calibrado utilizadas en la cuantificación fueron $\geq 0,990$ para todos los analitos, cumpliendo, además, el criterio adicional de % de desviación de los puntos experimentales a las mismas, siendo este $\leq 20\%$ para todos los niveles de concentración, con lo se consideró adecuada la correlación para los rangos estudiados.

Los valores de los coeficientes de determinación se muestran en la tabla 4.8 de resultados de los parámetros de validación cuantitativa. Los valores mostrados corresponden a los más desfavorables de las 7 rectas de calibrado obtenidas.

Respecto a los rangos de trabajo validados oscilaron desde $\frac{1}{4}$ LMR o $\frac{1}{2}$ LMR a $4x$ LMR, según compuestos. Para los antibióticos para los que no se ha establecido un LMR en leche, el rango de trabajo se fijó entre $\frac{1}{4}$ LMR y $4x$ LMR en músculo.

Hay que destacar que las rectas de calibrado fueron realizadas en matriz extraída y con corrección con patrón interno para todas las familias de antibióticos excepto, la familia de macrólidos y la lincosamida, para la que las cuantificaciones se realizaron con curva de calibrado en matriz extraída sin corrección con patrón interno, ya que, como se demostró en el estudio de efecto matriz, el patrón interno roxitromicina no corrigió eficazmente el efecto matriz, con lo que este no se utilizó con fines cuantitativos.

b) Veracidad

Los resultados se muestran en la tabla 4.8. de resultados de los parámetros de validación.

La veracidad, medida como sesgo, para la penicilina G fue de +6% a la concentración de $1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y, para todos los compuestos, se encontró entre -7 % y + 7% para concentraciones $> 1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ a $<10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y entre -11% y +9% para concentraciones $\geq 10 \mu\text{g}/\text{Kg}$, cumpliendo los criterios establecidos en la Decisión 2002/657/CE (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002) que establece un sesgo de -50%-+20% para concentraciones $\leq 1 \mu\text{g}/\text{Kg}$, de -30% - +10% para concentraciones $> 1 \mu\text{g}/\text{Kg}$ a $<10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y de -20% - +10% para concentraciones $\geq 10 \mu\text{g}/\text{Kg}$.

c) Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intralaboratorio

Los resultados de precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio calculados como coeficientes de variación o desviaciones estándar relativas (RSD_r y RSD_R , respectivamente) se encontraron por debajo de los criterios de aceptación establecidos en la Decisión 2002/657/CE (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002) en la que se establece que los CV % intralaboratorio no superarán el valor calculado mediante la ecuación de Horwitz. Además, para valores de concentración $< 100 \mu\text{g/Kg}$ se indica que estos serán lo más bajos posible.

El valor más elevado de RSD_R para concentraciones $> 1 - 10 \mu\text{g/Kg}$ se obtuvo para eritromicina A a $10 \mu\text{g/Kg}$ (22 %); para concentraciones $>10 \mu\text{g/Kg}$ y $<100 \mu\text{g/Kg}$ se obtuvo un 25 % para sulfadiazina, sulfamerazina y sulfacetamida a $25 \mu\text{g/Kg}$; y para concentraciones $\geq 100 \mu\text{g/Kg}$ y $<1.000 \mu\text{g/Kg}$ el valor más elevado fue un 21 % para sulfacetamida a $200 \mu\text{g/Kg}$.

Los valores de RSD_r fueron \leq que los de RSD_R en todos los casos.

4.1.5.3. Relación efecto matriz-reproducibilidad intralaboratorio

La figura 4.16. muestra la relación que se establece entre el porcentaje efecto matriz corregido y en valor absoluto y la reproducibilidad intralaboratorio como $RSD_R\%$ a nivel del límite de cuantificación en la matriz leche.

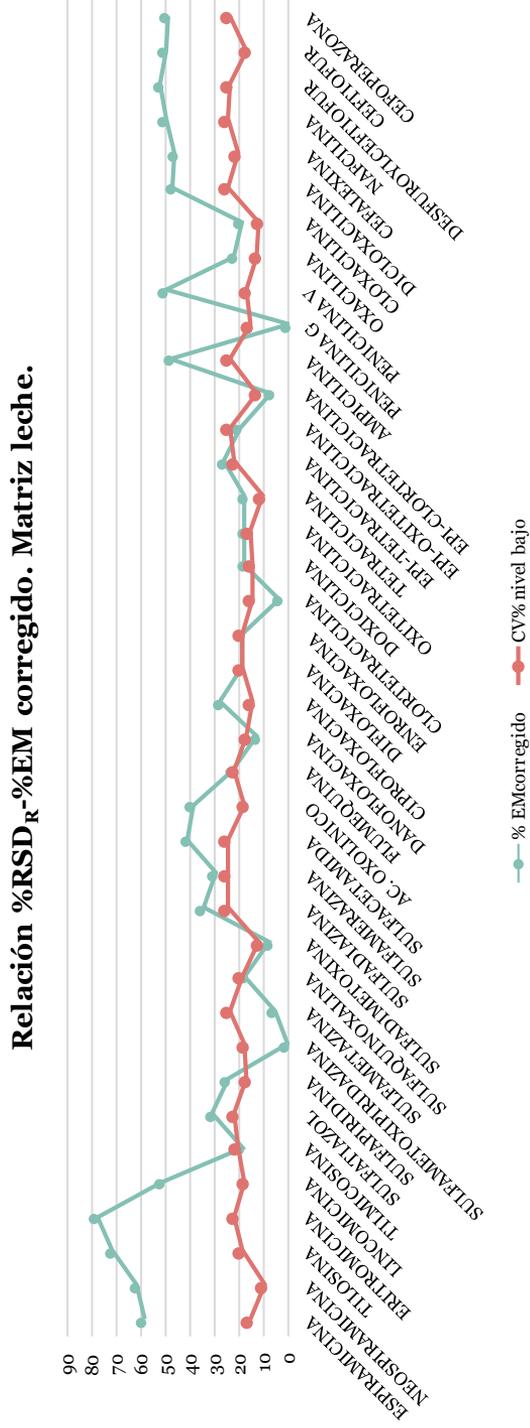


Figura 4.16. Relación entre %EM corregido (valor absoluto) y RSD_R%. Nivel límite de cuantificación.

A la vista de los resultados, se observó que existe relación entre los valores obtenidos para la reproducibilidad intralaboratorio y el % EM corregido. En general, para aquellos compuestos para los que se obtuvieron $RSD_R\%$ más desfavorables, se obtuvieron % EM corregido también más elevados. Si representamos dos líneas de tendencia, una para el % EM en valor absoluto, es decir, sin tener en cuenta el signo, ya que, en este caso, es indiferente si se produjo inhibición o exaltación de la respuesta, y otra para $RSD_R\%$, se observa que para el 82% de las moléculas, se cumple esa relación, lo que evidencia la influencia de la matriz sobre la precisión del método. Esta comparación se realizó a nivel del límite de cuantificación, por considerarse el más desfavorable.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución Orbitrap se utilizó en métodos de cribado para análisis multi-clase de antibióticos en músculo también por otros autores (Hurtaud-Pessel et al., 2011; Moretti et al., 2016b). En el método desarrollado en esta tesis, se incluyó, además de músculo, la matriz riñón. Hurtaud-Pessel et al. (2011), propusieron un método multi-clase de antibióticos en músculo, parcialmente validado, también por LC-HRMS, para 60 compuestos consistente en dos rutas diferentes de extracción, lo que duplicaba la carga de trabajo, además de duplicar los 22 minutos que se requerían para cada inyección en el equipo. Además, la concentración de *screening* igualó en la gran mayoría de compuestos el LMR, lo que requería realizar 60 replicados durante la validación y pudiendo producir que el porcentaje de falsos negativos se viera aumentado. Por otro lado, este método no incluyó compuestos como desfuroilceftiofur (metabolito del ceftiofur), sulfacetamida, sulfametazina y sulfapiridina incluidos en el método de cribado propuesto en esta tesis. Otros autores (Moretti et al., 2016b) propusieron un método multi-clase de antibióticos de cribado y confirmación en músculo por LC-HRMS/MS para 62 compuestos, que requería 30 minutos por inyección y que tampoco incluía compuestos como desfuroilceftiofur, sulfacetamida

y sulfametoxipiridacina. La propuesta de Kang et al. (2017) incluía un método de cribado para 100 compuestos, entre ellos antibióticos, siendo una las matrices estudiadas el riñón, pero en este caso con un sistema de cromatografía líquida acoplada a trampa de iones con Tiempo de Vuelo (LC-(IT)-ToF/MS) y obtuvieron valores de CC β superiores a los LMR legislados en Europa para gran número de compuestos como tetraciclinas, β -lactámicos, quinolonas y macrólidos.

Otros métodos propuestos multi-clase de antibióticos en tejido no incluían la espectrometría de masas de alta resolución, sino sistemas de LC-MS/MS de triple cuadrupolo (Bian et al., 2019; Chico, Rúbies, Centrich, Companyó, Prat, & Granados, 2008; Jank et al., 2017; Martos et al., 2010). En estos no se incluyó la matriz riñón, ni estudiaron entre los compuestos los 4-epímeros de las tetraciclinas, ni desfuroil-ceftiofur, ni neospiramicina y en algún caso tampoco la sulfacetamida, todos ellos incluidos en el método de cribado desarrollado en esta tesis. Además, en algunos casos, se establecieron valores para CC β superiores a los propuestos en esta tesis para los compuestos amoxicilina, ampicilina, penicilina G y penicilina V. Schneider et al. (2012) propusieron un método únicamente para la matriz riñón para analizar 120 compuestos, pertenecientes a 11 grupos terapéuticos, por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo. Tampoco en este caso se incluyen los 4-epímeros de las tetraciclinas, necesarios para poder declarar la conformidad de las muestras por estar legisladas como suma de cada una de ellas con sus correspondientes 4-epímeros (Reglamento (UE) n^o 37/2010, 2010).

En lo que respecta a la matriz leche, de los métodos multi-clase propuestos por espectrometría de masas de alta resolución, Filigenzi et al. (2011) analizaron 118 compuestos, entre los que incluían algún antibiótico, en varias matrices, incluida la leche. En este estudio no se detectaron ni ampicilina, ni sulfadiazina ni la familia de tetraciclinas. Además, para penicilina G el CC β propuesto superaba el LMR en leche. En el método desarrollado por otros autores en leche (Wang, J., Leung, D.,

Chow, W., Chang, J. S., Wong, J.W., 2015) el límite de detección para dicloxacilina, cefoperazona, clortetraciclina, doxiciclina y 4-epi-tetraciclina fue 40 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y para penicilina G, 20 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (> al LMR en leche), lo que es superior a los valores de $\text{CC}\beta$ obtenidos para esos compuestos en esta tesis. En otros estudios (Moretti et al., 2016a) se analizaron 62 compuestos en leche por LC-Q-HRMS con límites de cuantificación (2-10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$), en general, más bajos que los $\text{CC}\beta$ obtenidos en esta tesis, excepto para la penicilina G para la que el límite de cuantificación obtenido en esta tesis fue de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Gaugain-Juhel et al. (2009) propusieron un método multi-clase para antibióticos en leche por LC-MS/MS pero que requería 2 rutas de extracción, con la consiguiente carga de trabajo, y en el que se obtuvieron, para muchos compuestos, valores de concentración de *screening* iguales al LMR, superando los valores de los $\text{CC}\beta$ obtenidos en este trabajo (Igalada et al. 2021).

4.1.6. Análisis de muestras

4.1.6.1. Músculo y riñón

Para las matrices músculo y riñón el método de cribado cualitativo fue aplicado a 100 muestras de las que 60 muestras fueron de músculo de distintas especies y el resto fueron de riñón también de distintas especies animales.

La figura 4.17. indica el número de muestras en que el resultado fue $>\text{CC}\beta$ o cribado positivo para cada compuesto. La totalidad de muestras fue 100 (60 muestras de músculo y 40 muestras riñón).

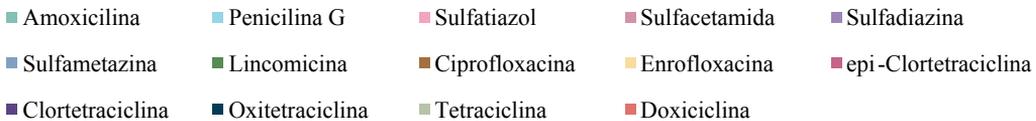


Figura 4.17. Número de muestras (músculo+riñón) con resultado >CCβ para cada compuesto. 100 muestras analizadas.

Los analitos con resultado >CCβ fueron amoxicilina (1 muestra riñón ovino); penicilina G (1 muestra riñón ovino); sulfatiazol (1 muestra músculo ave); sulfacetamida (1 muestra de riñón bovino); sulfadiazina (4 muestras de riñón ovino y 3 muestras de músculo ave, porcino y ovino, respectivamente); sulfametazina (1 muestra de riñón porcino); lincomicina (1 muestra de riñón ovino); ciprofloxacina (1 muestra de músculo ave); enrofloxacina (2 muestras de músculo de ave); epi-clortetraciclina (2 muestras de riñón ovino); clortetraciclina (2 muestras de riñón ovino coincidentes con las muestras donde se detectó epi-clortetraciclina); oxitetraciclina (2 muestras de riñón ovino); tetraciclina (2 muestras de riñón ovino) y doxiciclina (1 muestra de riñón ovino y 1 muestra de músculo porcino). La especie ovino es la que dio lugar a mayor porcentaje de muestras positivas al cribado (61%), siendo mayoritariamente en riñón donde se detectaron los antibióticos de las familias de β -lactámicos, sulfonamidas, lincosamidas y, mayoritariamente, tetraciclinas en esta especie. Le siguió

la especie ave, que representó un 17% de las muestras positivas al cribado, en las que se detectaron compuestos de las familias sulfonamidas y quinolonas.

Es importante mencionar que, de las muestras con resultado $>CC\beta$ o cribado positivo, prácticamente la totalidad lo fueron solamente a uno de los compuestos, excepto 2 muestras de riñón ovino que lo fueron a la clortetraciclina y también a su 4-epímero y una muestra de músculo de ave que en la se detectó enrofloxacin y su metabolito ciprofloxacina.

La figura 4.18 muestra el porcentaje de muestras con resultado $>CC\beta$ para algún compuesto y con resultado $<CC\beta$ para las matrices músculo y riñón.

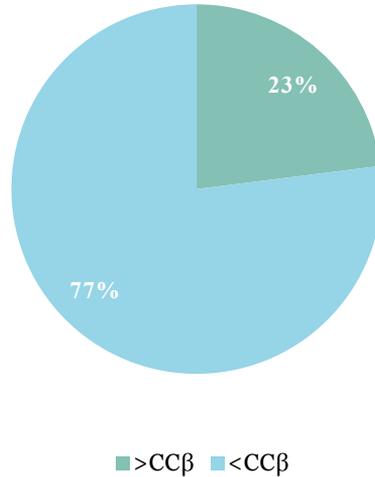


Figura 4.18. Porcentaje de muestras con resultado $>CC\beta$ y $<CC\beta$ para las matrices músculo y riñón.

La figura 4.19 muestra el porcentaje de muestras, respecto al total de muestras de músculo analizadas, con resultado $>CC\beta$ para algún compuesto y con resultado $<CC\beta$ para la matriz músculo.

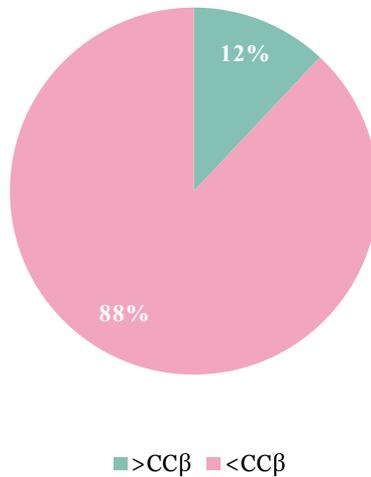


Figura 4.19. Porcentaje de muestras con resultado $>CC\beta$ y $<CC\beta$ para la matriz músculo.

Y la figura 4.20 muestra el porcentaje de muestras, respecto al total de muestras de riñón analizadas, con resultado $>CC\beta$ para algún compuesto y con resultado $<CC\beta$ para la matriz riñón.

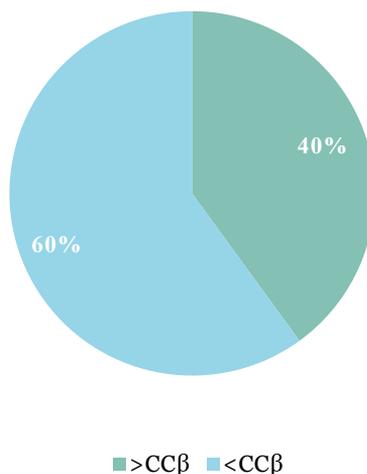


Figura 4.20. Porcentaje de muestras con resultado >CCβ y <CCβ para la matriz riñón.

De acuerdo a lo mostrado en los gráficos, de la totalidad de las muestras, un 23% fueron positivas al cribado. Respecto a las muestras analizadas de músculo, un 12% fueron positivas al cribado y un 40% de las muestras analizadas de riñón fueron positivas al cribado.

La totalidad de las muestras que fueron positivas al cribado fueron confirmadas y cuantificadas por LC-MS/MS, con un método que no es objeto de esta tesis, excepto en el caso de 1 muestra de riñón bovino que resultó cribado positivo para sulfacetamida y, esta, no se confirmó ni cuantificó por LC-MS/MS. Para el resto de muestras, en ningún caso se superó el límite de decisión o CCalfa con lo que las muestras fueron Conformes de acuerdo al valor legislado. Por otro lado, se analizaron 20 muestras negativas al cribado por LC-MS/MS y en ninguna de ellas se confirmó ni se cuantificó ninguno de los antibióticos incluidos en el método de cribado, lo que confirmó que el porcentaje de falsos negativos era < 5% que establece la legislación.

Control de calidad externo para músculo y riñón

El método desarrollado en estas matrices se aplicó a la realización de muestras de control de calidad externo mediante la participación en ejercicios de intercomparación.

La tabla 4.9. muestra los resultados obtenidos en los ejercicios de intercomparación en que se participó desde 2016 a 2020 para las matrices músculo y riñón.

Tabla 4-9. Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para el método de cribado en músculo. Período 2016-2020.

Fecha	Organizador/Ejercicio	Matriz	Especie	Muestra	Análito	Valor asignado (µg/Kg)	Valor informado (µg/Kg)	Valoración
2016	RIKILT/2016	Músculo	Bovino	A	No adicionada	No aplica	Screening negativo	Satisfactoria
				B	Tetraciclina	100	>25	Satisfactoria
				C	Tilmicosina Oxacilina	57 496	>13 >75	Satisfactoria
2017	RIKILT/2017	Músculo	Porcino	A	No adicionada	No aplica	Screening negativo	Satisfactoria
				B	Lincomicina	112	>25	Satisfactoria
				C	Danofloxacin	126	>25	Satisfactoria
2018	RIKILT/2018	Músculo	Bovino	A	No adicionada	No aplica	Screening negativo	Satisfactoria
				B	Oxi-tetraciclina	98	>25	Satisfactoria
				C	Oxi-tetraciclina	106	>25	Satisfactoria
2019	RIKILT/2019	Músculo	Bovino	A	No adicionada	No aplica	Screening negativo	Satisfactoria
				B	Ciprofloxacina Enrofloxacin	14,1 101	<25 >25	Satisfactoria
				C	Tilosina	73	>25	Satisfactoria
2020	RIKILT/2020	Músculo	Porcino	A	No adicionada	No aplica	Screening negativo	Satisfactoria
				B	No adicionada	No aplica	Screening negativo	Satisfactoria
				C	Cefalexina	189	>50	Satisfactoria

4.1.6.2. Leche

Control de calidad externo para leche

Para la matriz leche el método desarrollado se aplicó en muestras de dos ejercicios de intercomparación en los que el organizador solicitó los resultados cualitativos del cribado. La tabla 4.10 muestra los resultados obtenidos en los ejercicios de intercomparación en que se participó en esta matriz.

Tabla 4.10. Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para método de cribado en leche.

Fecha	Organizador/Ejercicio	Matriz	Especie	Muestra	Análito(adición)	Valor asignado (µg/Kg)	Valor informado (µg/Kg)	Valoración
Abril 2016	Zeulab/abril (Ejercicio cualitativo muestras A-J)	Leche	Vaca	A	Amoxicilina (5 µg/Kg)	POSITIVA	No incluido en método	No Aplica
				B	Penicilina G (5 µg/Kg)	POSITIVA	> 1	Satisfactoria
				C	Oxi-tetraciclina (100 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria
				D	No adicionada	NEGATIVA	Screening neg- ativo	Satisfactoria
				E	Oxi-tetraciclina (200 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria
				F	Amoxicilina (2 µg/Kg)	POSITIVA	No incluido en método	No Aplica
				G	Sulfatiazol (200 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria
				H	Oxi-tetraciclina (200 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria
				I	Amoxicilina (5 µg/Kg)	POSITIVA	No incluido en método	No Aplica
				J	Penicilina G (1.5 µg/Kg)	NEGATIVA	< 1	Satisfactoria

Fecha	Organizador/Ejercicio	Matriz	Especie	Muestra	Analito (adición)	Valor asignado (µg/Kg)	Valor informado (µg/Kg)	Valoración
Septiembre 2016	Zelab/ septiembre (Ejercicio cualitativo meses- tras A-J)	Leche	Vaca	A	Penicilina G (4 µg/Kg)	POSITIVA	> 1	Satisfactoria
				B	No adicionada	NEGATIVA	Screening neg- ativo	Satisfactoria
				C	Penicilina G (1.5 µg/Kg)	NEGATIVA	<1	Satisfactoria
				D	Tilosina (100 µg/Kg)	Resultados dis- cordantes	Screening neg- ativo	No aplica
				E	Amoxicilina (5.5 µg/Kg)	POSITIVA	No incluido en método	No Aplica
				F	Oxi-tetraciclina (250 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria
				G	Amoxicilina (1.5 µg/Kg)	POSITIVA	No incluido en método	No Aplica
				H	Amoxicilina (5.5 µg/Kg)	POSITIVA	No incluido en método	No Aplica
				I	Oxi-tetraciclina (100 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria
				J	Oxi-tetraciclina (250 µg/Kg)	POSITIVA	>25	Satisfactoria

Tanto para las matrices músculo y riñón como para la matriz leche, la valoración para todos los resultados fue satisfactoria, con lo que se demostró que los resultados obtenidos fueron comparables a los del resto de participantes, lo que es una garantía de la fiabilidad de los mismos.

4.2. Desarrollo y validación de métodos de confirmación cuantitativos para la determinación de antibióticos en agua, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS

4.2.1. Selección de las condiciones de la fuente de ionización

Los parámetros que afectan a la fuente de ionización (ver apartado 3.3.2.1.) fueron optimizados tras infundir una solución mezcla de los patrones de 1 µg/ml en agua/metanol (50:50, v/v) de manera que se monitorizaron los compuestos que, en principio, daban lugar a menor respuesta como tilosina, tilmicosina, clortetraciclina, amoxicilina, penicilina V y cefoperazona. Fueron variándose los valores de los parámetros en los rangos indicados en el apartado 3.3.2.1 buscando una situación de compromiso en la que se visualizaran todos los antibióticos con una respuesta adecuada.

Finalmente, los valores de cada uno de los parámetros que afectan a la eficiencia de la fuente que fueron seleccionados se muestran en la tabla 4.11.

Tabla 4.11. Valores seleccionados de los parámetros de la fuente de ionización. LC-MS/MS.

Parámetro optimizado	Valor optimizado
Sheath gas (SG)	45 a.u.
Auxiliary gas (AG)	17 a.u.
Spray Voltage (SV)	3.500 V (+); 2.500 V (-)
Sweep Gas (SWG)	1
Ion Transfer Tube Temperature (ITTT)	342°C
Vaporizer Temperature (VT)	292 °C

Los valores seleccionados para los parámetros del espectrómetro para trabajo en modo MRM (Multiple Reaction Monitoring) fueron:

Cycle Time: 0,3 s

Q1 Resolution (FWHM): 0,7

Q3 Resolution (FWHM): 0,7

CID Gas: 2 mTorr

Source Fragmentation: 10 V

Chrom Filter: 3 s

Tras la monitorización individual de cada compuesto, tanto en modo positivo como negativo, se seleccionó en el primer cuadrupolo cada ión precursor para ser fragmentado y se obtuvieron varios iones producto para cada analito. Los iones precursores, iones producto y las correspondientes energías de colisión se mostraron en la tabla 3.2 (apartado Material y Métodos).

4.2.2. Selección de las condiciones cromatográficas

Tomando como punto de partida la columna que había sido seleccionada para los métodos de cribado por LC-HRMS, Kinetex C₁₈ XB (50 x 3,0 mm d.i. 2.6 µm) Phenomenex® se consideró oportuno el uso de una columna con la misma fase estacionaria pero de mayor longitud, menor diámetro interno y el mismo tamaño de partícula, con lo cual la columna ensayada fue la Kinetex C₁₈ XB (100 x 2,1 mm d.i., 2.6 µm) Phenomenex®. El objetivo fue poder facilitar en el futuro la incorporación de nuevos analitos en el método de manera que no se viera afectada la separación entre los compuestos.

Se ensayó la misma composición de fase móvil en gradiente, es decir, la combinación de Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido fórmico 0,1%) y, en este caso, para este modo de detección, se produjo un ensanchamiento de los picos para amoxicilina, sulfacetamida y sulfadiazina, que eluyen en los primeros minutos de cromatograma, para cualquiera de los iones producto seleccionados. Un cambio de composición de la fase móvil incorporando a la fase orgánica acetonitrilo y metanol (50/50) produjo una gran mejoría obteniéndose picos simétricos y con una señal adecuada, si bien, se produjo una disminución de la respuesta para la mayoría de compuestos que no se consideró relevante.

La figura 4.21. muestra los cromatogramas obtenidos con las dos combinaciones de fase móvil ensayadas, Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido fórmico 0,1%) (a) y Ácido fórmico 0,1%/Metanol/Acetonitrilo (50/50) (ácido fórmico 0,1%) (b) en la columna Kinetex C₁₈ XB (100 x 2,1 mm d.i., 2.6 µm).

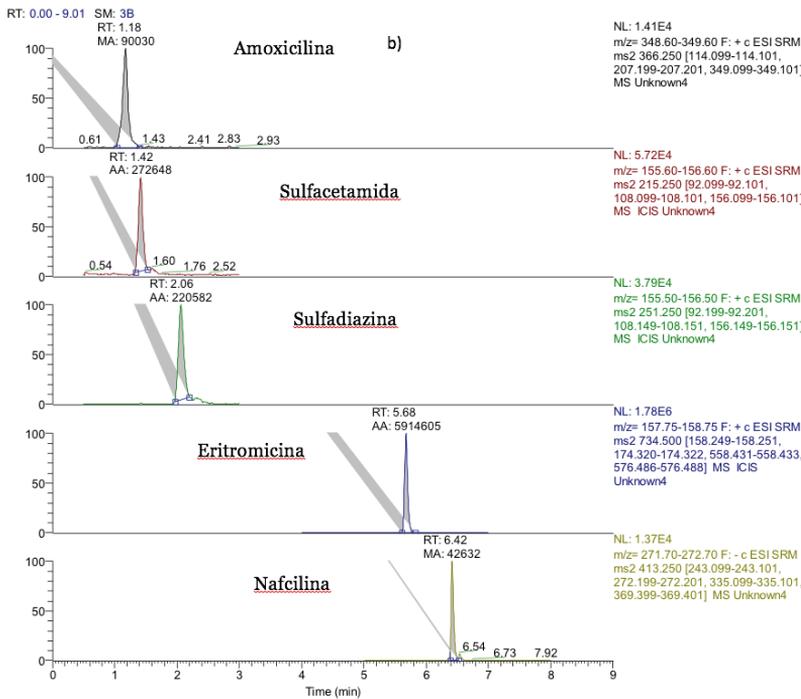
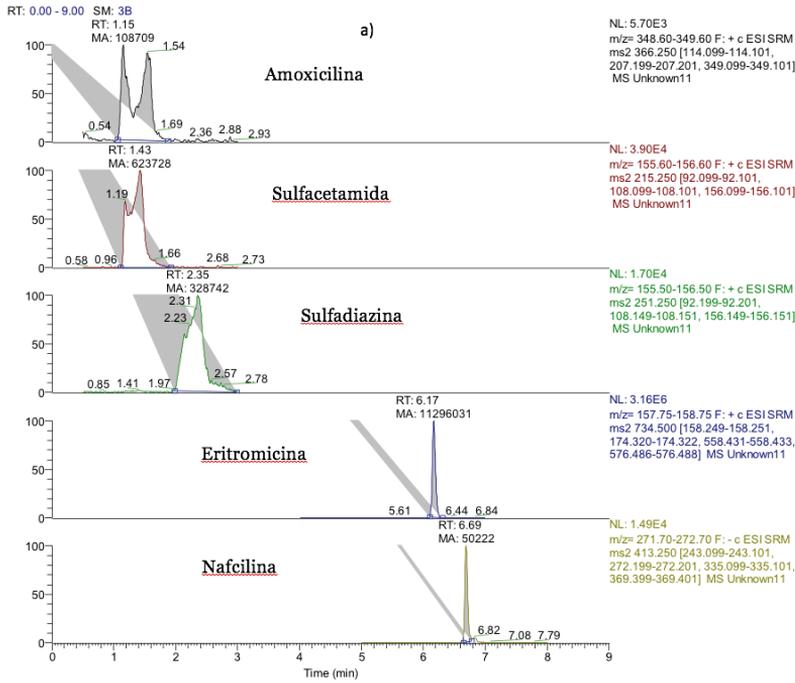


Figura 4.21. Cromatogramas obtenidos con las dos combinaciones de fase móvil ensayadas, Ácido fórmico 0,1%/Metanol (ácido fórmico 0,1%) (a) y Ácido fórmico 0,1%/Metanol/Acetonitrilo (50/50) (ácido fórmico 0,1%) (b). Columna Kinetex C₁₈ XB (100 x 2,1 mm d.i., 2.6 µm)

Así pues, la composición de la fase móvil seleccionada fue Ácido fórmico 0,1%/ Metanol/Acetonitrilo (50/50) (ácido fórmico 0,1%).

En resumen, las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron las siguientes:

Columna Kinetex C₁₈ XB (100 x 2,1 mm d.i., 2,6 µm) Phenomenex®.

Fase móvil acuosa: ácido fórmico 0,1 %.

Fase móvil orgánica: [Metanol/Acetonitrilo (50/50)] (ac. fórmico 0,1%)

Flujo: 450 µL/min

T^a horno columna: 50°C

Tiempo análisis: 10 min (incluyendo tiempo de equilibrado)

Gradiente: Desde A 95% B 5% hasta A 5% B 95 %

4.2.3. Selección de los solventes para la preparación de la muestra previa a la etapa de purificación para la matriz agua

Previamente a la etapa de Extracción en Fase Sólida, se ensayó la adición de distintos solventes a 2 ml de muestra:

- a. agua
- b. solución tampón McIlvaine- Na₂EDTA a pH 4
- c. solución tampón ac. acético/acetatoNa a pH 5,2

El ensayo se realizó utilizando agua obtenida de los bebederos para los animales en una explotación de pollos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.22. Al igual que en los casos anteriores, las respuestas de los analitos se presentan normalizadas, indicando 100% en el caso del solvente que produjo una mayor respuesta para los analitos.

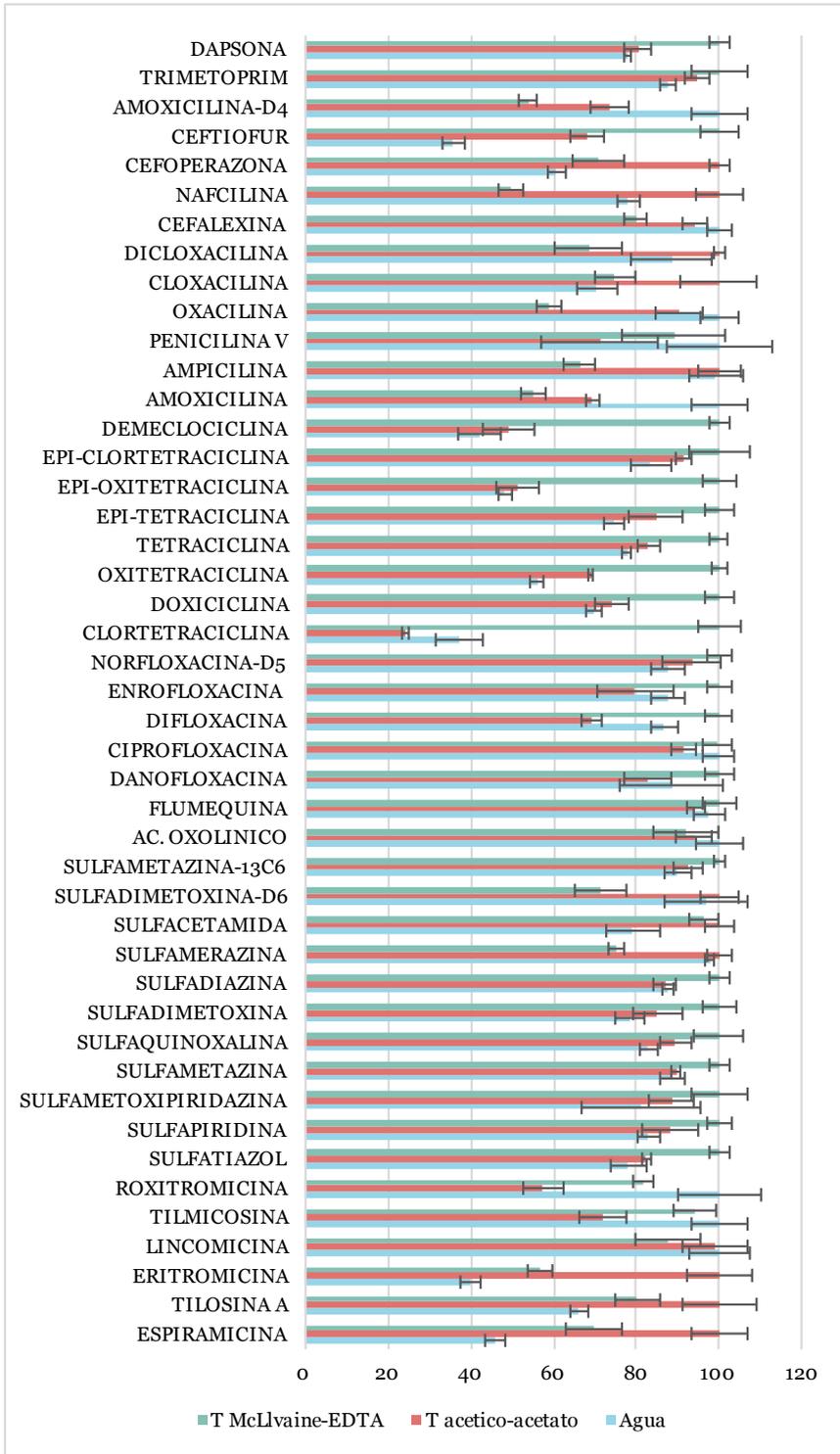


Figura 4.22. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes previos a la EFS. Agua de bebida animales fortificada a 10 µg/l.

La solución de tampón McIlvaine- Na_2EDTA a pH 4 fue la que dio lugar a mayor número de analitos (concretamente 24) que mejoraron la respuesta respecto a las demás soluciones. Le siguieron la utilización de agua y la solución tampón ácido acético-acetatoNa a pH 5,2 con 10 y 11 moléculas, respectivamente.

Para la familia macrólidos, las soluciones de extracción que mejor respuesta produjeron fueron el agua ultrapura y el tampón ácido acético/acetatoNa pH 5,2, según compuestos, al igual que ocurrió en las matrices músculo y riñón durante el desarrollo del método por LC-HRMS, a pesar de que hay autores que indican que estos compuestos forman quelatos con iones metálicos y requieren la presencia de EDTA en la solución de extracción (Martínez Vidal, Aguilera-Luiz, Romero-González, & Frenich, 2009). El mismo comportamiento se produjo para los compuestos de la familia β -lactámicos, si bien para ambas familias de antibióticos las respuestas que se produjeron tras utilizar la solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4 fueron elevadas y adecuadas.

En el caso de las familias sulfonamidas, quinolonas, tetraciclinas y, además, los compuestos trimetoprim y dapsona las respuestas más elevadas se obtuvieron al extraer con la solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4, si bien, con las otras dos soluciones, las respuestas obtenidas fueron, en general, elevadas y adecuadas no poniéndose en riesgo la detección de ninguno de los analitos.

Para cualquiera de los solventes utilizados se produjo la detección de la totalidad de los analitos.

Finalmente, la solución seleccionada para adicionar a la muestra previamente a la etapa de purificación, fue la solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4. Voigt et al. (2020) también hicieron uso de EDTA para determinar antibióticos en matrices

acuosas mediante un método “*dilute and shoot*”, con el objetivo de mejorar la recuperación de las tetraciclinas y Dasenaki & Thomaidis (2015) también utilizaron EDTA con buenos resultados, en medio ácido, previamente a la etapa de purificación con EFS para determinar 89 compuestos farmacéuticos en aguas residuales.

4.2.4. Selección de los solventes para la etapa de hidrólisis previa a la etapa de purificación para la matriz miel

Los resultados para las dos condiciones de hidrólisis ensayadas se muestran en la figura 4.23. Se presentan de nuevo las respuestas normalizadas asignándose un 100% a la solución para hidrólisis que produjo mayor respuesta para cada compuesto.

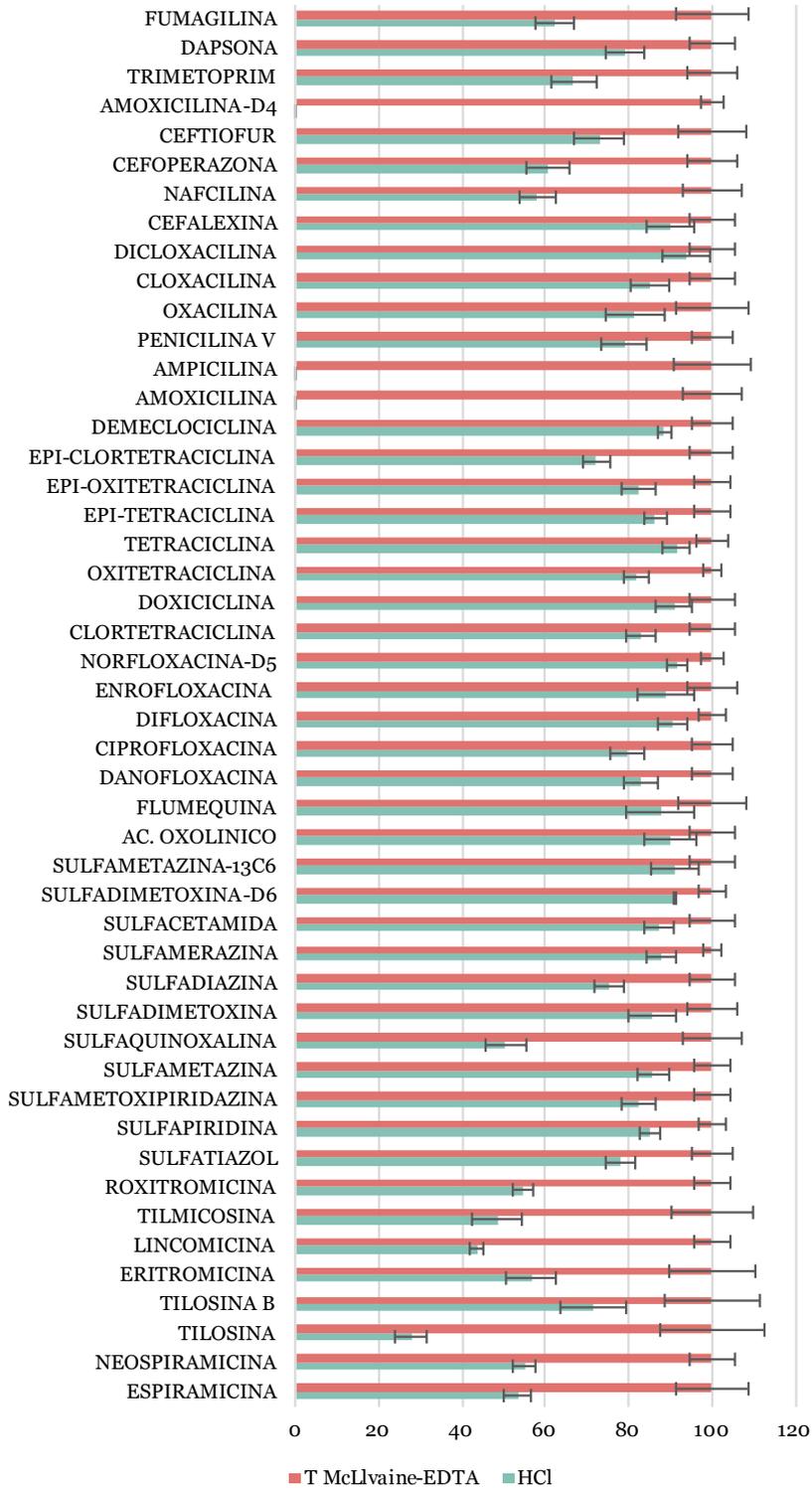


Figura 4.23. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes para hidrólisis. Miel multifloral fortificada a 10 µg/Kg.

La solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4 es la que produjo mayores respuestas en la totalidad de los analitos respecto a la solución de HCl 1 M. Las condiciones más ácidas conferidas por la solución de HCl 1 M durante 1 h produjeron una disminución de la respuesta para todos los analitos respecto a la respuesta obtenida al utilizar la solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4 durante toda la noche. Los analitos que se vieron más afectados fueron los correspondientes a las familias de macrólidos y β -lactámicos tal y como describen otros autores (Hammel et al., 2008; Martínez Vidal et al., 2009). Dentro de la familia de macrólidos, los compuestos más afectados por las condiciones más ácidas fueron Tilosina y Tilmicosina y, además, al igual que mencionan otros autores (Bohm, Stachel, Hackenberg, & Gowik, 2011; Hammel et al., 2008), se observa que el compuesto Tilosina B o Desmicosina se ve menos afectado por las condiciones ácidas del HCl 1M que la Tilosina A debido a que ésta se degrada en aquélla a pH inferiores a 4. En lo que respecta a la familia de β -lactámicos, los compuestos amoxicilina, amoxicilina-D4 y ampicilina se vieron gravemente afectados por las condiciones ácidas de la solución de HCl ya que no fueron detectados en ningún replicado de ese experimento.

Para el resto de familias, sulfonamidas, quinolonas y tetraciclinas, cuando se utilizó HCl 1M, se observó una disminución de la respuesta respecto a la obtenida para la solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4 aunque las respuestas se mantuvieron elevadas y aceptables. De estas familias, los analitos que se vieron más afectados fueron sulfaquinoxalina y epi-clortetraciclina, si bien su respuesta fue tal que no se puso en riesgo su detección.

La solución tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4 fue la seleccionada para llevar a cabo el proceso de hidrólisis previo a la etapa de purificación mediante Extracción en Fase Sólida (EFS) con cartuchos poliméricos Strata X.

En otros estudios (El Hawari et al., 2017; von Eyken et al., 2019) se llevó a cabo hidrólisis mediante solución de HCl 2 M. En el primer caso, se aplicó al análisis de 3 sulfonamidas en miel y se demostró la liberación de los conjugados glucosa-sulfonamida. No fueron incluidos más antibióticos en este estudio, si bien detectaron tilosina A en muestras de miel analizadas mediante el método con estas condiciones de hidrólisis. En el segundo trabajo, se aplicó a varias familias de antibióticos (excepto β -lactámicos), viéndose muy afectada, en cuanto a la recuperación, la familia macrólidos, excepto Tilosina B.

La hidrólisis mediante ácido fórmico al 1% en acetonitrilo fue ensayada por (Loupis et al., 2017) pero el método que propusieron requería dos tratamientos de muestra para analizar, por un lado, las sulfonamidas y por otro lado, el resto de antibióticos, probablemente debido a que, en las condiciones ácidas que produce el ácido fórmico 1% muchos otros compuestos se habrían degradado.

La utilización de una solución acuosa de Na_2EDTA y ácido cítrico que, al igual que en el método propuesto en esta tesis, produce unas condiciones ácidas más suaves, fue utilizada por otros autores (Jin, Y. et al., 2017) con buenos resultados aunque no incluyeron la familia de β -lactámicos en el estudio.

4.2.5. Selección de los solventes de extracción para la matriz huevo

Al igual que para las matrices músculo, riñón y leche, se ensayaron las siguientes combinaciones de solventes de extracción:

- a. agua/acetonitrilo (20/80)
- b. tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80)
- c. tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80)
- d. acetonitrilo como único solvente.

Los resultados se muestran en la figura 4.24. El estudio se realizó en matriz huevo de gallina. Al igual que en los demás casos, las respuestas fueron normalizadas considerando el 100% para la combinación de solventes que produjo mejor respuesta en los distintos analitos.

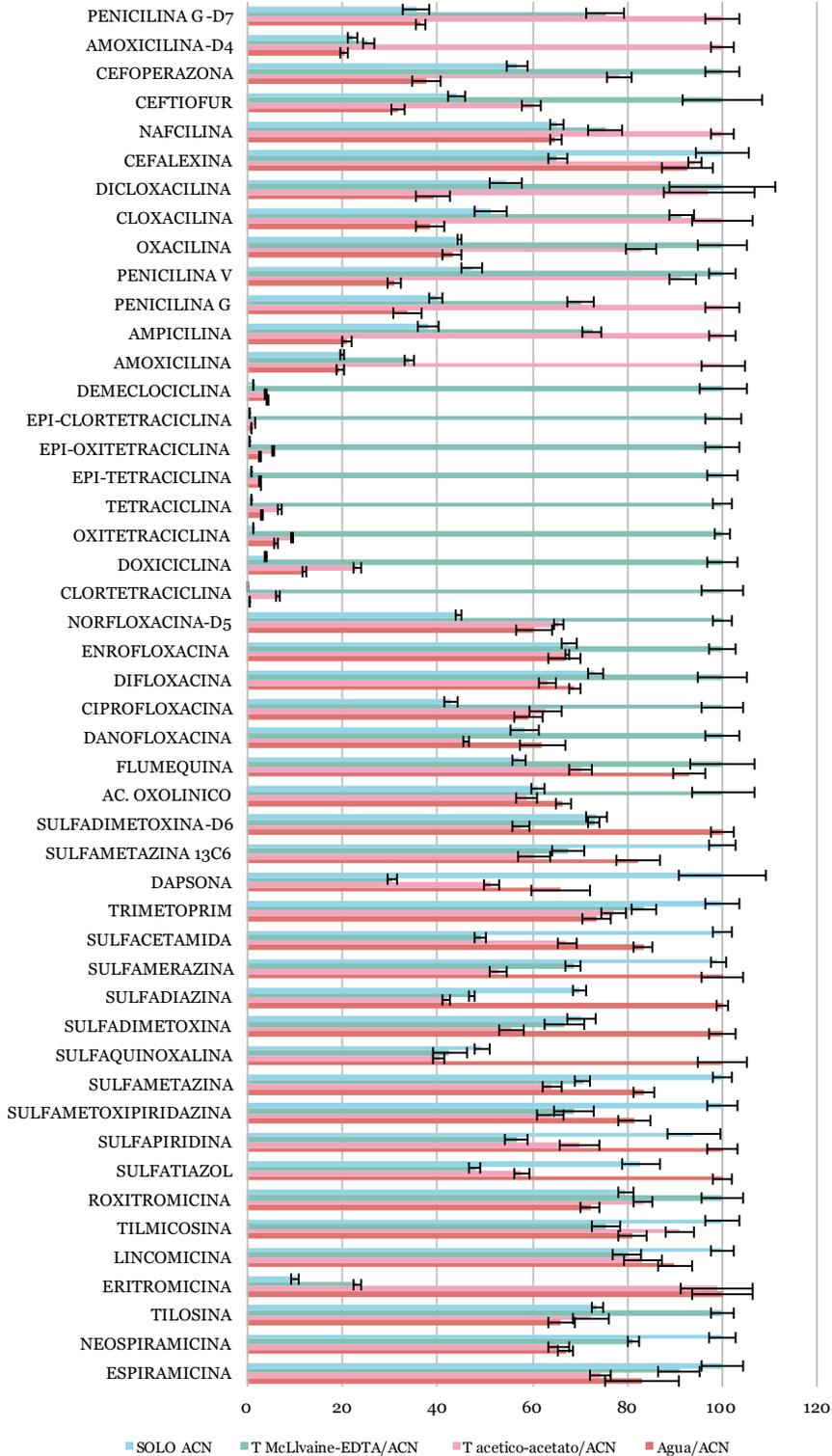


Figura 4.24. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción. Huevo de gallina fortificado a 2xLC.

La combinación tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetoni-trilo (20/80) fue la que produjo que el mayor número de analitos (concretamente 22 de 48) mejorasen su respuesta respecto a los demás solventes de extracción. Le siguieron la utilización de acetoni-trilo como único solvente de extracción, la combinación agua/acetoni-trilo (20/80) y la combinación tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetoni-trilo (20/80).

Para la mayoría de los compuestos de la familia de macrólidos, el solvente que produjo una respuesta mayor respecto a la obtenida con los otros solventes, fue el acetoni-trilo. Esto resulta sorprendente debido al carácter polar de los compues-tos de esta familia, si bien, el pH obtenido al mezclar la matriz huevo, con un pH ligeramente superior a 7, con el acetoni-trilo pudo favorecer la extracción de estos compuestos. La eritromicina tuvo un comportamiento diferente ya que se produ-jeron mejores resultados mediante las combinaciones agua/acetoni-trilo (20/80) y tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetoni-trilo (20/80).

Respecto a la familia de sulfonamidas y a los compuestos trimetoprim y dapsona, tanto el acetoni-trilo como la combinación agua/acetoni-trilo (20/80), dieron lugar a las mayores respuestas, si bien no se produjeron marcadas diferencias en las res-puestas obtenidas al extraer con las demás combinaciones de solventes que pudie-ran poner en riesgo la detección de los compuestos.

Para los compuestos de las familias quinolonas y tetraciclinas, la extracción me-diante la combinación McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetoni-trilo (20/80) produjo una mayor respuesta con una marcada diferencia respecto al resto de solventes, especialmente, en el caso de la familia de tetraciclinas tal y como sucedió para otras matrices.

Para los compuestos de la familia de β -lactámicos, los mejores resultados se obtuvieron mediante las combinaciones de tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80) y la de tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80).

Para todos los solventes ensayados se produjo la detección de la totalidad de los analitos.

Finalmente, el solvente seleccionado fue la combinación de tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80) ya que es el que produjo mayor número de moléculas para las que la respuesta fue la más elevada respecto a la extracción con los demás solventes, siendo espectacular la diferencia de respuesta obtenida para los compuestos de la familia tetraciclinas respecto a la respuesta obtenida cuando se utilizaron los demás solventes.

También otros autores utilizaron una combinación de solventes conteniendo una solución EDTA-McIlvaine a pH 4 para la matriz huevo (Lu et al., 2019) pero en este caso, el método se aplicó a la determinación de 11 compuestos de la familia quinolonas y posteriormente a la extracción se llevó a cabo una etapa de purificación con EFS.

En general, en los métodos multi-clase para antibióticos en la matriz huevo, las combinaciones de solventes mayormente utilizadas para la etapa de extracción fueron mezclas de agua/ acetonitrilo en medio ácido (Kang et al., 2017) y con la adición de EDTA (Garrido Frenich, Aguilera-Luiz, Martinez Vidal, & Romero-González, 2010; Hu, Ben, Zheng, Hu, Ben, Wong, & Zheng, 2021; Li, Chen, Wen, Hou, Zhang, & Ma, 2018) seguidas de una etapa de EFS para purificar los extractos y, algunos autores (Jiménez et al., 2011; Paoletti et al., 2021), al igual que en el método propuesto en esta tesis, obviaron la etapa de purificación.

4.2.6. Selección de los solventes de extracción para la matriz pienso

De nuevo se ensayaron las mismas combinaciones de solventes de extracción utilizadas para la matrices músculo, riñón, leche y huevo:

- a. agua/acetonitrilo (20/80)
- b. tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetonitrilo (20/80)
- c. tampón McIlvaine- Na₂EDTA pH 4/acetonitrilo (20/80)
- d. acetonitrilo como único solvente

Los resultados se muestran en la figura 4.25. El estudio se realizó en matriz pienso destinado a la especie porcino. Al igual que anteriormente, las respuestas fueron normalizadas considerando el 100% para la combinación de solventes que produjo mejor respuesta en los distintos analitos.

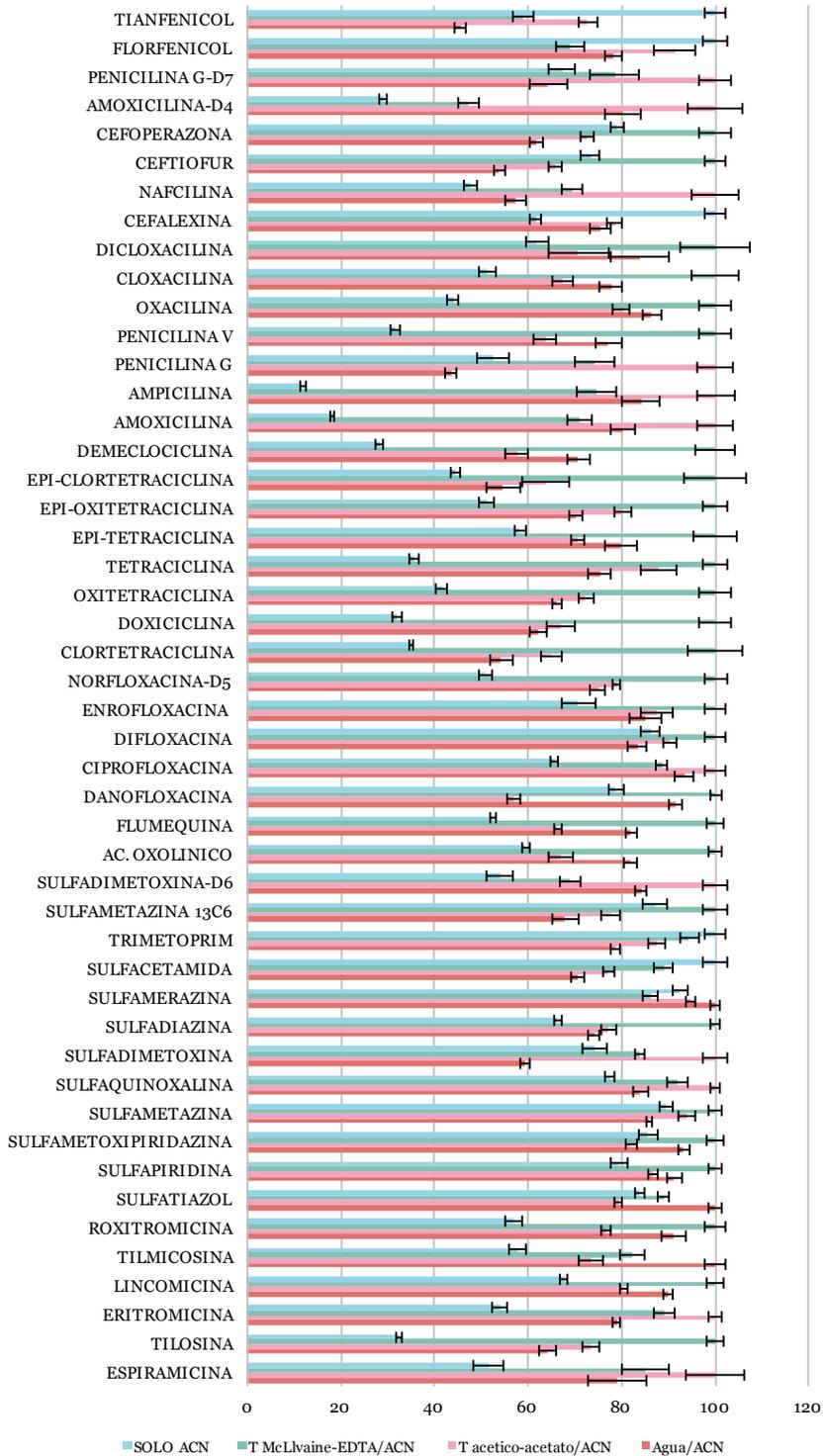


Figura 4.25. Respuestas normalizadas para los diferentes solventes de extracción. Pienso de porcino fortificado al LC.

De nuevo la combinación de solventes que produjo respuestas más elevadas para mayor número de compuestos fue la combinación tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetónitrilo (20/80) (concretamente 28 de 48). Le siguió la utilización de la combinación tampón ácido acético-acetato pH 5,2/acetónitrilo (20/80). Muy pocos analitos mejoraron su respuesta cuando la extracción se realizó con la combinación agua/acetónitrilo (20/80) o con acetónitrilo como único solvente de extracción. Los compuestos de la familia de anfenicoles incorporados en el método para su determinación en esta matriz fueron, junto al trimetoprim, compuestos que mejoraron su respuesta cuando se extrajeron de la matriz con acetónitrilo. En general, las respuestas más desfavorables se produjeron cuando se utilizó sólo acetónitrilo aunque no se puso en riesgo la detección de ningún analito para ninguna de las combinaciones de solventes utilizadas.

La combinación tampón McIlvaine- Na_2EDTA pH 4/acetónitrilo (20/80) fue de nuevo seleccionada para la extracción de los analitos de esta matriz aunque no se produjeron diferencias llamativas con las respuestas obtenidas utilizando las combinaciones tampón ácido acético-acetatoNa pH 5,2/acetónitrilo (20/80) y agua/acetónitrilo (20/80) para ninguno de los analitos. Tampoco hubo un patrón de comportamiento claro para las distintas familias de compuestos respecto a estas 3 combinaciones de solventes.

La utilización del tampón McIlvaine- Na_2EDTA a pH 4 también fue propuesta por otros autores (Patyra et al., 2017) para la extracción de antibióticos desde la matriz pienso, como etapa previa a una purificación con extracción en fase sólida con cartuchos poliméricos de intercambio catiónico débil. En este caso se aplicó tan solo a compuestos de la familia tetraciclinas en piensos de porcino y de aves.

Al igual que en otras matrices, las propuestas realizadas por otros autores para extraer antibióticos de varias familias en pienso, consistieron en la utilización de mezclas de solventes acuosos y orgánicos acidificadas, generalmente, con ácido fórmico (Gómez-Pérez, M. L. et al., 2015^a; Kaklamanos et al., 2013; Song et al., 2019). También fue habitual la adición de EDTA para prevenir la formación de quelatos de iones divalentes con algunos compuestos (Decheng, Peilong, Yang, Ruiguo, Shulin, Zhiming, & Su, 2018; Oyedeji et al., 2019), si bien, hay autores que, pese a incluir en el método antibióticos de la familia tetraciclinas, no añadieron EDTA a la solución de extracción y mostraron resultados adecuados para estos compuestos (Gómez-Pérez et al., 2015^a; Kaklamanos et al., 2013).

En general, tras la etapa de extracción, todos ellos incluyeron una etapa de purificación mediante EFS y dSPE, excepto Kaklamanos et al. (2013) que inyectaron directamente en el sistema el extracto diluido de la muestra, al igual que el método propuesto en esta tesis en el que tan sólo 1 µl del extracto es inyectado en el sistema cromatográfico.

4.2.7. Evaluación del efecto matriz y la recuperación

Al igual que para las matrices músculo, riñón y leche, el efecto matriz se evaluó de acuerdo a lo indicado en el apartado de Materiales y Métodos (apartado 3.3.1.5). Para la interpretación de los resultados, de nuevo se tuvo en cuenta la clasificación realizada por otros autores (Ferrer et al., 2011; León et al., 2012) que clasificaron el efecto matriz en tres categorías. Para un porcentaje entre -20% y +20% se consideró que no existía efecto matriz ya que son valores cercanos a la repetibilidad; entre -50% y -20% o +20% y +50%, se consideró un efecto matriz moderado; y, por debajo de -50% y por encima de +50%, el efecto matriz se consideró elevado.

4.2.7.1. Agua

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.26. Se incluye el porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada compuesto; porcentaje de recuperación absoluta (%RE); el porcentaje de efecto matriz corregido con los patrones internos (%EM corregido) y el porcentaje de recuperación corregida con los patrones internos (%RE corregida).

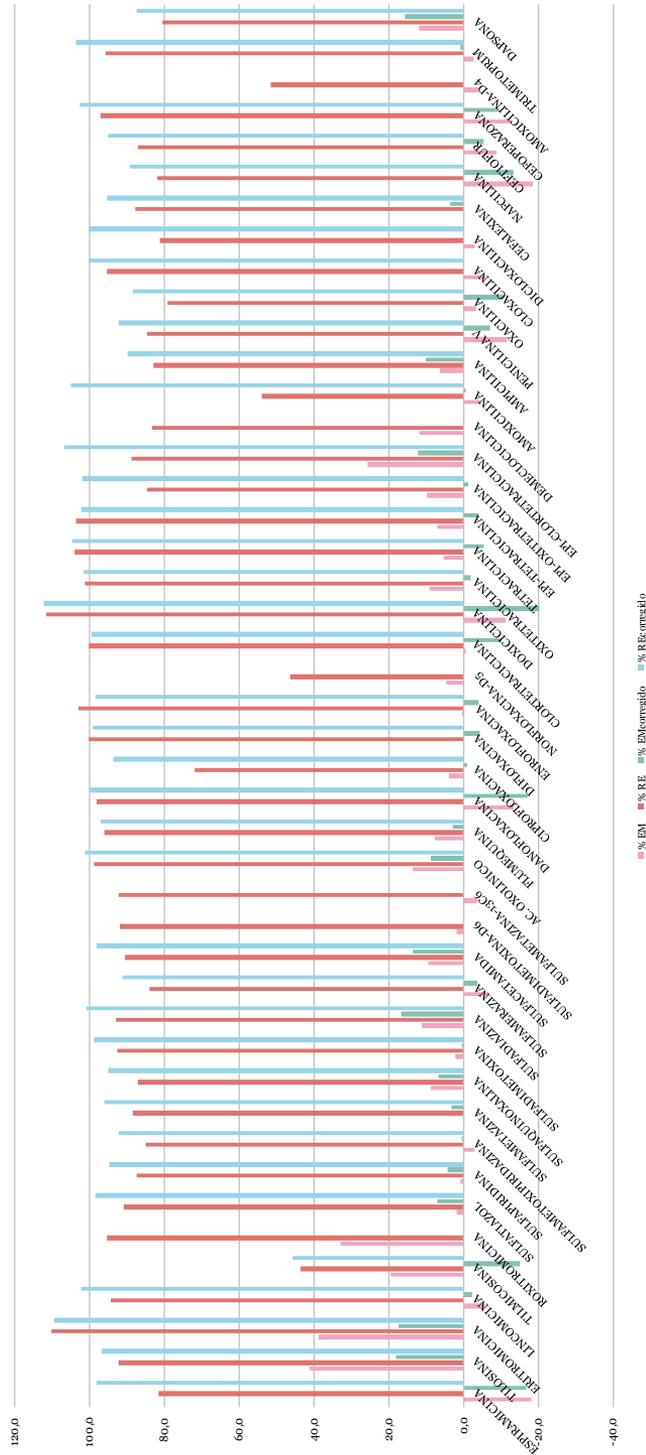


Figura 4.26. % Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorrected) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorrected) en agua. Nivel bajo.

En el caso de la matriz agua, un 91% de los compuestos no presentó efecto matriz y resto lo presentó moderado. Esto sucedió en 3 compuestos de la familia de macrólidos, tilosina, eritromicina y roxitromicina que curiosamente eluyen en tiempos de retención similares, entre 5,6 y 6,1 minutos. En esta ocasión, aproximadamente la mitad de los compuestos presentaron como efecto matriz la supresión iónica y la otra mitad exaltación iónica, algo que ya ocurrió también para la matriz riñón.

4.2.7.2. Miel

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.27. Se incluye el porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada compuesto; porcentaje de recuperación absoluta (%RE); el porcentaje de efecto matriz corregido con los patrones internos (%EM corregido) y el porcentaje de recuperación corregida con los patrones internos (%RE corregida).

04. Resultados y discusión

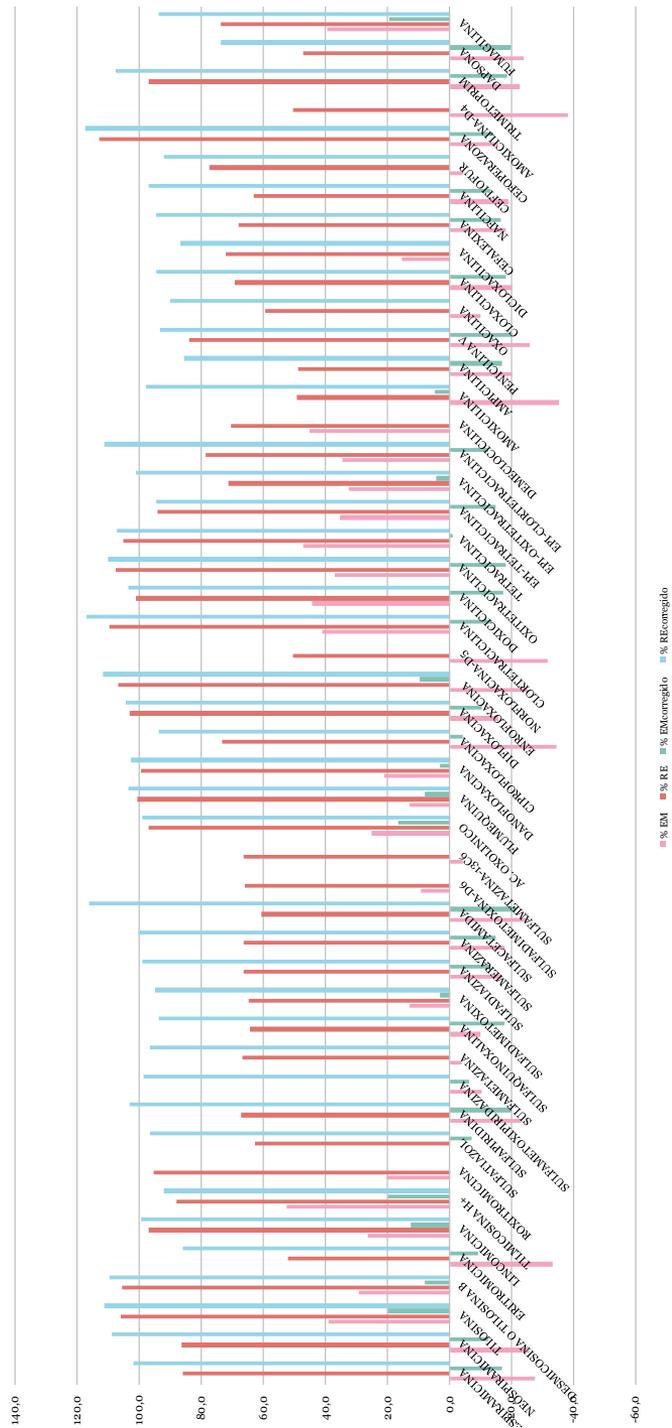


Figura 4.27. % Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EMcorrectado) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorrectado) en miel multi-flores. Nivel bajo.

En el caso de la matriz miel, tan sólo 1 compuesto presentó un elevado efecto matriz, un 56% presentaron efecto matriz moderado y el resto no presentaron efecto matriz. También en este caso, aproximadamente la mitad de los compuestos presentaron como efecto matriz la supresión iónica y la otra mitad, exaltación iónica.

El compuesto que presentó efecto matriz elevado fue tilmicosina de la familia de macrólidos. Los compuestos que presentaron efecto matriz moderado fueron de las familias de macrólidos y tetraciclinas, amoxicilina y amoxicilina-D4, trimetoprim, dapsona, fumagilina y alguna quinolona, compuestos que eluyen en distintas regiones del cromatograma, lo que demuestra, que los fenómenos de exaltación y supresión iónica causados por la matriz, dependen de cada compuesto y de su estado de protonación/desprotonación y pueden ocurrir independientemente del momento de la elución de los compuestos. En general, un pH ácido dificulta la interacción de los compuestos tanto ácidos como básicos con la matriz (Mol et al., 2008).

En general, los compuestos para los que no se produjo efecto matriz fueron compuestos de las familias sulfonamidas y β -lactámicos.

4.2.7.3. Huevo

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.28. Se incluye el porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada compuesto; porcentaje de recuperación absoluta (%RE); el porcentaje de efecto matriz corregido con los patrones internos (%EM corregido) y el porcentaje de recuperación corregida con los patrones internos (%RE corregida).

04. Resultados y discusión

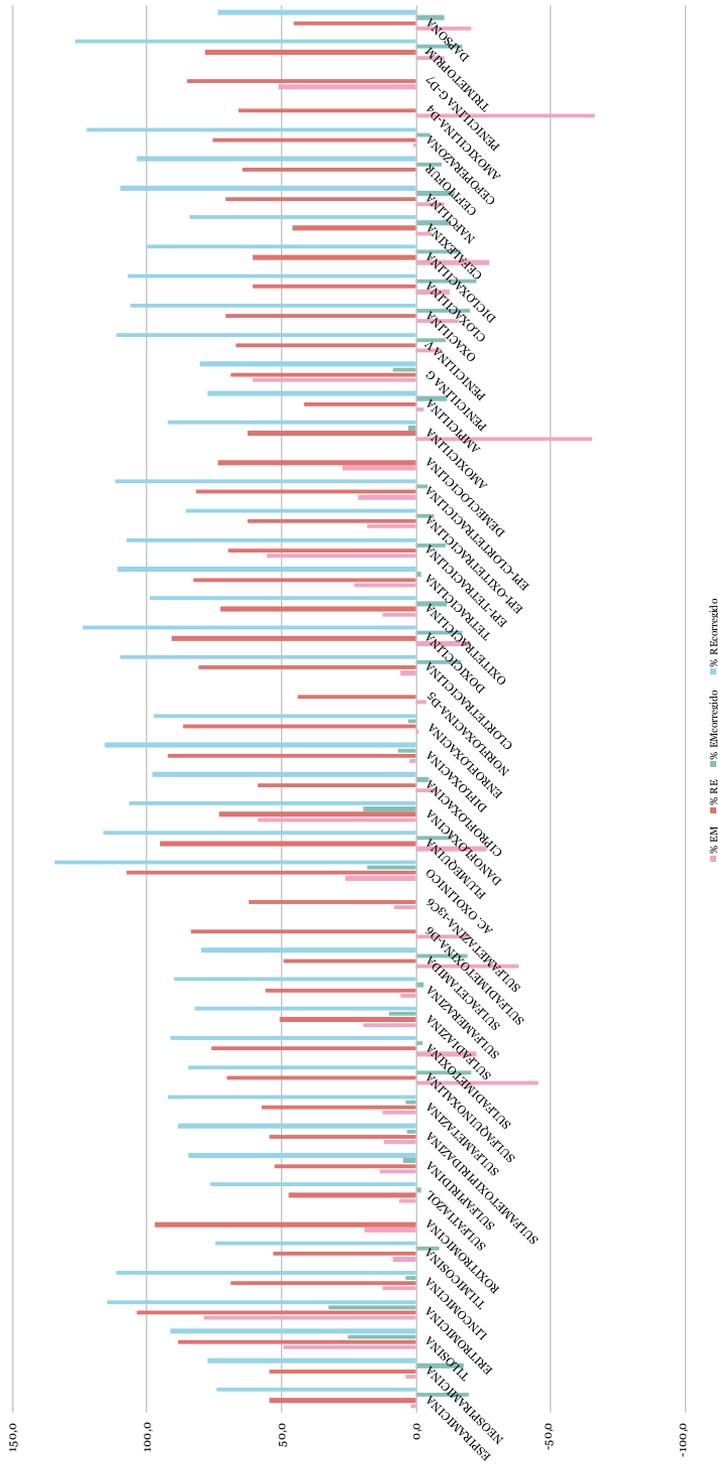


Figura 4.28. % Efecto matriz (%EM), Recuperación Absoluta (%RE), % Efecto matriz corregido (%EM-corrected) y % Recuperación corregida con patrones internos (%REcorrected) en huevo. Nivel bajo.

En el caso de la matriz huevo, 7 compuestos presentaron un elevado efecto matriz, 9 presentaron efecto matriz moderado y el resto no presentaron efecto matriz. También en este caso, aproximadamente la mitad de los compuestos presentaron como efecto matriz la supresión iónica y la otra mitad, exaltación iónica.

El aumento del % de compuestos que presentaron efecto matriz elevado respecto a los afectados en la matriz miel podría explicarse por la falta de etapa de purificación mediante EFS para la matriz huevo, pero paradójicamente, pese a la carencia de etapa de purificación para esta última matriz, el % de analitos para los que no se produjo efecto matriz, fue bastante superior que en el caso de la miel (65% frente a 42%).

De los 7 compuestos afectados con efecto matriz elevado, eritromicina, danofloxacina, epi-tetraciclina, penicilina G y penicilina G-d7 presentaron efecto matriz de exaltación iónica y amoxicilina, amoxicilina-d4 de supresión iónico y eluyeron en distintas regiones del cromatograma. Para el resto de compuestos, se produjo efecto matriz moderado y sin efecto independientemente de la familia a que pertenecieran.

4.2.7.4. Pienso

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.29. Se incluye el porcentaje de efecto matriz (%EM) para cada compuesto; porcentaje de recuperación absoluta (%RE); el porcentaje de efecto matriz corregido con los patrones internos (%EM corregido) y el porcentaje de recuperación corregida con los patrones internos (%RE corregida).

En la matriz pienso, 6 compuestos presentaron efecto matriz elevado, 22 compuestos lo presentaron moderado y el resto, no presentaron efecto matriz. En este caso, el 92 % de los compuestos se vio afectado por componentes de la matriz que favorecieron la ionización, con lo cual, presentaron como efecto la exaltación iónica.

El aumento del porcentaje de compuestos que presentaron efecto matriz moderado y elevado, respecto a las otras matrices, evidencia la complejidad de esta matriz, a pesar de que las concentraciones estudiadas en ella fueron elevadas en comparación con las demás matrices y de que sólo una pequeña porción del extracto diluido se tomó para el análisis.

Las familias de antibióticos menos afectadas por el efecto matriz fueron los β -lactámicos y las quinolonas.

4.2.7.5. Recuperaciones y compensación del efecto matriz

a. Agua

Las recuperaciones absolutas fueron bastante elevadas teniendo en cuenta que se trata de un método multiresiduo. Tan sólo para 3 analitos se obtuvieron recuperaciones de aproximadamente un 50%, tilmicosina, amoxicilina y amoxicilina-D4 lo que ya ocurrió para las matrices anteriormente estudiadas. Para los restantes compuestos, las recuperaciones absolutas superaron el 80%, siendo mayores del 90% para la mitad de los compuestos.

Cuando se calculó el efecto matriz con las áreas relativas a los correspondientes patrones internos, el efecto matriz fue corregido en la totalidad de los compuestos y

no se presentó efecto matriz para ninguno de los compuestos. Además, las recuperaciones corregidas superaron el 80% para la totalidad de los compuestos excepto para la tilmicosina que presentó una recuperación aproximada de un 50 % tanto absoluta como corregida (ver figura 4.26).

b. Miel

En la matriz miel se obtuvieron recuperaciones absolutas que oscilaron entre un 49% para ampicilina y un 113% para cefoperazona, siendo superiores al 80% para aproximadamente la mitad de los compuestos.

Cuando se calculó el efecto matriz con las áreas relativas a los correspondientes patrones internos, el efecto matriz fue corregido prácticamente en la totalidad de los compuestos no presentando efecto matriz para ninguno de los compuestos excepto para sulfacetamida, no considerándose relevante ya que este fue muy cercano a -20%. Las recuperaciones corregidas fueron >80% en la totalidad de los compuestos (ver figura 4.27).

c. Huevo

En la matriz huevo las recuperaciones absolutas obtenidas oscilaron entre un 42 % para ampicilina y 107% para ácido oxolínico. Para el 71 % de los compuestos se obtuvieron recuperaciones absolutas > 60% y para el 30 % de los compuestos estas fueron >80%.

El mayor porcentaje de grasa presente en la matriz huevo, pudo ser la causa de una menor eficacia de la extracción respecto a las recuperaciones absolutas obtenidas en otras matrices como agua y miel.

De nuevo cuando se calculó el efecto matriz con las áreas relativas a los correspondientes patrones internos, el efecto matriz fue corregido prácticamente en la totalidad de los compuestos no presentando efecto matriz ningún compuesto excepto dos macrólidos (tilosina, eritromicina) y el β -lactámico cloxacilina, si bien para estos el efecto matriz fue moderado y cercano al 20%. Las recuperaciones corregidas fueron >80% en la gran mayoría de compuestos (ver figura 4.28).

d. Pienso

En la matriz pienso las recuperaciones absolutas obtenidas oscilaron entre un 51% para amoxicilina y 103% para sulfaquinoxalina, siendo superior al 70% para el 85% de los compuestos. Ello se considera adecuado teniendo en cuenta la complejidad de esta matriz y tratándose de un método multiresiduo.

De nuevo cuando se calculó el efecto matriz con las áreas relativas a los correspondientes patrones internos, el efecto matriz fue corregido prácticamente en la totalidad de los compuestos no presentando efecto matriz ningún compuesto excepto tilosina, tilmicosina y nafcilina, aunque se trató de un efecto matriz moderado muy cercano al 20%. Las recuperaciones, tras ser corregidas utilizando para su cálculo la relación de área analito/area patrón interno, fueron >87% para prácticamente la totalidad de los compuestos excepto para ampicilina y cefalexina en que fue > 70% (ver figura 4.29).

En general, para todas las matrices, se produce una mejoría espectacular en el efecto matriz cuando este se corrige mediante los patrones internos. Ello evidencia la necesidad de utilizar rectas de calibrado en matriz construidas a ser posible con las respuestas de los analitos relativas a las obtenidas para los correspondientes patrones internos frente a las concentraciones ya que es una de las estrategias para

compensar el efecto matriz. Además, la dilución de los extractos, como es el caso del método propuesto para la matriz pienso, es también otra estrategia eficaz que ayuda a minimizar, incluso eliminar, el efecto matriz, siempre que no se ponga en riesgo la detección de los compuestos.

4.2.8. Validación de los métodos

Los métodos propuestos para las matrices agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS, tal como se indica en el apartado 3.3.2.8. de Materiales y Métodos, fueron validados estudiando los parámetros correspondientes a métodos cuantitativos y de confirmación.

Las tablas 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15 muestran los resultados de los parámetros correspondientes a la validación en agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso y además, el tiempo de retención de los compuestos. Se indica el rango de trabajo validado para cada antibiótico, el coeficiente de determinación (R^2) mínimo en cada caso, la veracidad (expresada como sesgo en %), la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio para cada nivel de concentración, expresadas como desviación estándar relativa o coeficiente de variación en % (RSD_r % y RSD_R %, respectivamente), $CC\alpha$ y $CC\beta$.

Tabla 4.12. Resultados parámetros de validación en agua y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g/l}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g/l}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	$CC\alpha$ $\mu\text{g/l}$	$CC\beta$ $\mu\text{g/l}$
TETRACICLINAS									
Epi-tetraciclina	3,58	2,5-40,0	>0,995	2,5	-11	9	15	2,5	3,1
				10,0	6	6	9		
				40,0	-3	12	17		
Tetraciclina	4,02	2,5-40,0	>0,994	2,5	-13	8	17	2,5	3,1
				10,0	-2	4	6		
				40,0	-4	7	10		
Epi-oxitetraciclina	3,75	2,5-40,0	>0,994	2,5	-1	9	13	2,5	3,0
				10,0	2	7	9		
				40,0	-5	16	22		
Oxitetraciclina	3,95	2,5-40,0	>0,993	2,5	-13	10	16	2,5	3,1
				10,0	2	5	7		
				40,0	-4	10	15		
Epi-clortetraciclina	4,28	2,5-40,0	>0,993	2,5	-6	8	25	2,5	3,5
				10,0	-11	7	17		
				40,0	3	5	9		
Clortetraciclina	4,61	2,5-40,0	>0,993	2,5	-7	11	17	2,5	3,2
				10,0	-6	8	12		
				40,0	-3	8	12		
Doxiciclina	4,84	2,5-40,0	>0,990	2,5	-1	14	22	2,5	3,4
				10,0	1	6	11		
				40,0	-2	11	17		
β-LACTÁMICOS									
Amoxicilina	1,09	2,5-40,0	>0,995	2,5	0	4	6	2,5	2,7
				10,0	-1	3	5		
				40,0	1	3	4		
Ampicilina	3,83	2,5-40,0	>0,993	2,5	6	6	22	2,5	3,5
				10,0	-1	9	16		

04. Resultados y discusión

ANALITO	RT	Rango (µg/l)	R ²	Conc. (µg/l)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CCα µg/l	CCβ µg/l
				40,0	-4	11	15		
Penicilina V	6,00	2,5-40,0	>0,992	2,5	2	12	18	2,5	3,3
				10,0	-1	12	16		
				40,0	-6	14	21		
Oxacilina	6,13	2,5-40,0	>0,994	2,5	1	9	19	2,5	3,3
				10,0	-4	8	13		
				40,0	-8	15	24		
Cloxacilina	6,29	2,5-40,0	>0,995	2,5	7	8	14	2,5	3,1
				10,0	-4	8	14		
				40,0	-7	16	24		
Dicloxacilina	6,52	2,5-40,0	>0,991	2,5	-3	13	21	2,5	3,3
				10,0	4	12	21		
				40,0	-1	13	22		
Nafcilina	6,46	2,5-40,0	>0,992	2,5	6	12	23	2,5	3,5
				10,0	-4	13	20		
				40,0	-8	16	25		
Cefalexina	3,80	2,5-40,0	>0,991	2,5	4	7	20	2,5	3,3
				10,0	3	7	11		
				40,0	4	8	14		
Ceftiofur	5,22	2,5-40,0	>0,992	2,5	3	13	21	2,5	3,4
				10,0	4	6	9		
				40,0	8	7	11		
Cefoperazona	4,77	5,0-80,0	>0,992	5,0	1	11	18	5,0	6,5
				20,0	-1	8	12		
				80,0	0	6	10		
QUINOLONAS									
Danofloxacina	4,12	2,5-40,0	>0,996	2,5	-4	9	17	2,5	3,2
				10,0	1	4	6		
				40,0	5	6	13		
Difloxacina	4,35	2,5-40,0	>0,994	2,5	-5	12	16	2,5	3,1
				10,0	2	4	8		
				40,0	-4	3	4		

ANALITO	RT	Rango (µg/l)	R ²	Conc. (µg/l)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/l	CC _β µg/l
Ciprofloxacina	3,99	2,5-40,0	>0,995	2,5	0	8	13	2,5	3,0
				10,0	-2	5	8		
				40,0	1	4	8		
Enrofloxacin	4,17	2,5-40,0	>0,994	2,5	-7	11	18	2,5	3,2
				10,0	5	6	9		
				40,0	-1	7	11		
Flumequina	5,76	2,5-40,0	>0,994	2,5	-3	16	23	2,5	3,4
				10,0	1	7	12		
				40,0	-7	8	13		
Acido Oxolínico	5,07	2,5-40,0	>0,997	2,5	-1	8	12	2,5	3,0
				10,0	0	5	8		
				40,0	-7	6	11		
MACRÓLIDOS									
Eritromicina A	5,64	5,0-80,0	>0,997	5,0	8	12	18	5,0	6,6
				20,0	-12	16	25		
				80,0	-18	16	24		
Espiramicina 1	4,69	2,5-40,0	>0,995	2,5	-15	15	22	2,5	3,3
				10,0	-5	9	14		
				40,0	3	13	20		
Tilmicosina	5,13	2,5-40,0	>0,996	2,5	10	17	25	2,5	3,6
				10,0	-2	16	22		
				40,0	9	11	17		
Tilosina A	5,82	2,5-40,0	>0,995	2,5	9	11	16	2,5	3,2
				10,0	1	7	10		
				40,0	-1	9	14		
LINCOSAMIDAS									
Lincomicina	3,47	2,5-40,0	>0,997	2,5	-3	6	11	2,5	2,9
				10,0	3	8	12		
				40,0	2	8	12		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g/l}$)	R ²	Conc. ($\mu\text{g/l}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC α $\mu\text{g/l}$	CC β $\mu\text{g/l}$
SULFONAMIDAS									
Sulfatiazol	2,61	2,5-40,0	>0,998	2,5	1	4	7	2,5	2,8
				10,0	0	3	6		
				40,0	0	10	16		
Sulfadiazina	2,01	2,5-40,0	>0,998	2,5	-2	4	9	2,5	2,8
				10,0	2	3	5		
				40,0	-2	6	9		
Sulfamerazina	3,43	2,5-40,0	>0,997	2,5	-5	4	11	2,5	2,9
				10,0	0	3	5		
				40,0	-1	5	9		
Sulfacetamida	1,39	2,5-40,0	>0,997	2,5	-8	4	12	2,5	3,0
				10,0	1	4	6		
				40,0	0	8	12		
Sulfadimetoxina	5,06	2,5-40,0	>0,997	2,5	-12	6	9	2,5	2,8
				10,0	6	3	5		
				40,0	1	3	4		
Sulfametazina	4,05	2,5-40,0	>0,996	2,5	-8	6	11	2,5	2,9
				10,0	-1	4	6		
				40,0	1	3	4		
Sulfametoxipiridazina	4,08	2,5-40,0	>0,998	2,5	-4	4	12	2,5	3,0
				10,0	2	6	9		
				40,0	5	5	8		
Sulfapiridina	3,05	2,5-40,0	>0,997	2,5	-6	5	9	2,5	2,8
				10,0	-1	3	4		
				40,0	-3	6	9		
Sulfaquinoxalina	5,13	2,5-40,0	>0,995	2,5	6	8	11	2,5	3,0
				10,0	6	4	6		
				40,0	6	5	7		
Dapsona	4,00	2,5-40,0	>0,992	2,5	-5	8	22	2,5	3,3
				10,0	5	7	11		
				40,0	4	9	13		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g/l}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g/l}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	$\text{CC}\alpha$ $\mu\text{g/l}$	$\text{CC}\beta$ $\mu\text{g/l}$
OTROS									
Trimetoprim	3,64	2,5-40,0	>0,993	2,5	-4	11	24	2,5	3,4
				10,0	9	11	17		
				40,0	0	9	14		

Tabla 4.13 Resultados parámetros de validación en miel y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	$CC\alpha$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$	$CC\beta$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$
TETRACICLINAS									
Epi-tetraciclina	3,59	2,5-40,0	>0,991	2,5	-3	9	16	2,5	3,1
				10,0	3	5	9		
				40,0	-1	8	10		
Tetraciclina	4,02	2,5-40,0	>0,993	2,5	0	11	18	2,5	3,2
				10,0	3	5	8		
				40,0	0	5	8		
Epi-oxitetraciclina	3,76	2,5-40,0	>0,990	2,5	-4	12	24	2,5	3,4
				10,0	-2	8	11		
				40,0	-2	12	17		
Oxitetraciclina	3,95	2,5-40,0	>0,995	2,5	1	7	11	2,5	3,0
				10,0	-1	6	11		
				40,0	-2	6	9		
Epi-clortetraciclina	4,27	2,5-40,0	>0,994	2,5	0	8	12	2,5	3,0
				10,0	-2	5	8		
				40,0	-3	4	6		
Clortetraciclina	4,62	2,5-40,0	>0,993	2,5	7	11	15	2,5	3,2
				10,0	0	4	6		
				40,0	0	5	7		
Doxiciclina	4,84	2,5-40,0	>0,990	2,5	1	18	26	2,5	3,7
				10,0	-4	10	13		
				40,0	0	7	10		
β-LACTÁMICOS									
Amoxicilina	1,08	2,5-40,0	>0,991	2,5	-1	12	25	2,5	3,5
				10,0	-1	8	12		
				40,0	-2	7	11		
Ampicilina	3,84	2,5-40,0	>0,990	2,5	-5	9	22	2,5	3,4
				10,0	-2	12	19		
				40,0	-3	6	9		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R ²	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC α $\mu\text{g}/\text{Kg}$	CC β $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Penicilina V	6,00	2,5-40,0	>0,992	2,5	5	11	16	2,5	3,2
				10,0	-8	15	21		
				40,0	-3	9	14		
Oxacilina	6,14	2,5-40,0	>0,994	2,5	-6	14	24	2,5	3,4
				10,0	-6	10	15		
				40,0	-7	9	15		
Cloxacilina	6,31	2,5-40,0	>0,994	2,5	-2	14	20	2,5	3,3
				10,0	-6	13	20		
				40,0	-12	12	20		
Dicloxacilina	6,52	2,5-40,0	>0,995	2,5	0	16	23	2,5	3,4
				10,0	-5	13	20		
				40,0	-4	12	19		
Nafcilina	6,47	2,5-40,0	>0,996	2,5	4	13	21	2,5	3,4
				10,0	-2	15	26		
				40,0	-1	13	19		
Cefalexina	3,81	2,5-40,0	>0,993	2,5	-11	17	26	2,5	3,4
				10,0	-6	13	19		
				40,0	1	8	12		
Ceftiofur	5,23	2,5-40,0	>0,992	2,5	1	11	17	2,5	3,2
				10,0	6	7	12		
				40,0	-1	10	15		
Cefoperazona	4,76	5,0-80,0	>0,993	5,0	-12	14	21	5,0	6,5
				20,0	-14	6	21		
				80,0	0	13	21		
QUINOLONAS									
Danofloxacina	4,12	2,5-40,0	>0,995	2,5	2	10	14	2,5	3,1
				10,0	1	7	10		
				40,0	3	6	10		
Difloxacina	4,35	2,5-40,0	>0,990	2,5	0	16	25	2,5	3,5
				10,0	3	8	11		
				40,0	2	13	20		

04. Resultados y discusión

ANALITO	RT	Rango (µg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/Kg	CC _β µg/Kg
Ciprofloxacina	4,00	2,5-40,0	>0,993	2,5	3	6	11	2,5	3,0
				10,0	0	6	12		
				40,0	-4	7	12		
Enrofloxacin	4,17	2,5-40,0	>0,992	2,5	-11	13	19	2,5	3,2
				10,0	0	6	9		
				40,0	-1	5	8		
Flumequina	5,75	2,5-40,0	>0,995	2,5	8	8	19	2,5	3,3
				10,0	0	12	21		
				40,0	6	5	8		
Acido Oxolínico	5,06	2,5-40,0	>0,994	2,5	-6	15	24	2,5	3,4
				10,0	-5	14	20		
				40,0	3	11	16		
MACRÓLIDOS									
Eritromicina A	5,64	5,0-80,0	>0,993	5,0	2	15	24	5,0	7,0
				20,0	-4	11	16		
				80,0	2	12	19		
Espiramicina 1	4,69	2,5-40,0	>0,994	2,5	-4	9	14	2,5	3,0
				10,0	2	6	13		
				40,0	1	7	11		
Neospiramicina	4,45	2,5-40,0	>0,993	2,5	-11	13	21	2,5	3,3
				10,0	1	7	10		
				40,0	-1	6	10		
Tilmicosina	5,13	2,5-40,0	>0,992	2,5	1	18	26	2,5	3,6
				10,0	-9	16	24		
				40,0	-1	9	14		
Tilosina A	5,82	2,5-40,0	>0,994	2,5	6	15	22	2,5	3,4
				10,0	-5	16	26		
				40,0	2	9	15		
Tilosina B	5,52	2,5-40,0	>0,993	2,5	7	15	24	2,5	3,6
				10,0	-2	14	20		
				40,0	0	12	18		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R ²	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC α $\mu\text{g}/\text{Kg}$	CC β $\mu\text{g}/\text{Kg}$
LINCOSAMIDAS									
Lincomicina	3,48	2,5-40,0	>0,995	2,5	-9	12	17	2,5	3,2
				10,0	3	6	11		
				40,0	0	5	8		
SULFONAMIDAS									
Sulfatiazol	2,60	2,5-40,0	>0,995	2,5	2	12	19	2,5	3,3
				10,0	-1	3	8		
				40,0	1	3	4		
Sulfadiazina	2,01	2,5-40,0	>0,996	2,5	2	7	10	2,5	2,9
				10,0	0	4	6		
				40,0	0	3	6		
Sulfamerazina	3,44	2,5-40,0	>0,995	2,5	6	7	17	2,5	3,2
				10,0	4	4	9		
				40,0	3	3	5		
Sulfacetamida	1,39	2,5-40,0	>0,994	2,5	-8	12	18	2,5	3,2
				10,0	-1	5	8		
				40,0	1	5	9		
Sulfadimetoxina	5,07	2,5-40,0	>0,997	2,5	6	10	15	2,5	3,1
				10,0	-1	8	15		
				40,0	3	6	9		
Sulfametazina	4,05	2,5-40,0	>0,998	2,5	-2	5	7	2,5	2,8
				10,0	1	4	6		
				40,0	1	2	5		
Sulfametoxipiridazina	4,08	2,5-40,0	>0,995	2,5	1	12	20	2,5	3,3
				10,0	-1	5	8		
				40,0	0	3	4		
Sulfapiridina	3,05	2,5-40,0	>0,995	2,5	-1	7	13	2,5	3,0
				10,0	0	3	4		
				40,0	-1	3	4		
Sulfaquinoxalina	5,13	2,5-40,0	>0,992	2,5	3	14	21	2,5	3,4
				10,0	-6	13	20		
				40,0	6	9	14		

04. Resultados y discusión

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	$\text{CC}\alpha$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$	$\text{CC}\beta$ $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Dapsona	4,01	2,5-40,0	>0,993	2,5	9	13	21	2,5	3,5
				10,0	4	6	11		
				40,0	3	6	12		
OTROS									
Trimetoprim	3,65	2,5-40,0	>0,994	2,5	-19	10	15	2,5	3,0
				10,0	0	13	20		
				40,0	-4	7	11		
Fumagilina	7,16	5,0-80,0	>0,992	5,0	3	15	24	5,0	7,0
				20,0	-10	12	17		
				80,0	-9	11	18		

Tabla 4.14. Resultados parámetros de validación en huevo y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g/Kg}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g/Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	$CC\alpha$ $\mu\text{g/Kg}$	$CC\beta$ $\mu\text{g/Kg}$
TETRACICLINAS									
Epi-tetraciclina	3,60	50,0- 800,0	>0,992	50,0	-12	8	11	224,0	248,0
				200,0	3	5	7		
				800,0	-5	5	6		
Tetraciclina	4,02	50,0- 800,0	>0,994	50,0	2	3	9	211,6	223,1
				200,0	-1	3	4		
				800,0	4	5	6		
Epi-oxitetraciclina	3,76	50,0- 800,0	>0,990	50,0	1	6	21	217,8	235,6
				200,0	2	4	5		
				800,0	0	5	10		
Oxitetraciclina	3,95	50,0- 800,0	>0,995	50,0	1	4	6	217,9	235,8
				200,0	0	4	5		
				800,0	-3	5	7		
Epi-clortetraciclina	4,27	50,0- 800,0	>0,994	50,0	-2	3	5	214,9	229,9
				200,0	1	3	4		
				800,0	-3	3	4		
Clortetraciclina	4,62	50,0- 800,0	>0,995	50,0	6	5	8	214,4	228,8
				200,0	2	3	4		
				800,0	-1	5	7		
Doxiciclina	4,84	5,0- 80,0	>0,991	5,0	6	12	18	5,0	6,6
				20,0	-4	9	11		
				80,0	1	9	12		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g/Kg}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g/Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC α $\mu\text{g/Kg}$	CC β $\mu\text{g/Kg}$
β-LACTÁMICOS									
Amoxicilina	1,08	2,5-40,0	>0,992	2,5	2	9	12	2,5	3,0
				10,0	-1	4	5		
				40,0	0	4	5		
Ampicilina	3,84	2,5-40,0	>0,992	2,5	-7	6	13	2,5	3,0
				10,0	-16	7	11		
				40,0	4	5	7		
Penicilina G	5,72	10,0- 160,0	>0,990	10,0	-1	13	21	10,0	13,3
				40,0	8	7	9		
				160,0	8	7	11		
Penicilina V	6,00	2,5-40,0	>0,997	2,5	7	9	12	32,0	39,0
				10,0	-6	8	16		
				40,0	-4	11	17		
Oxacilina	6,13	2,5-40,0	>0,995	2,5	9	7	10	2,5	2,9
				10,0	-12	8	12		
				40,0	-4	8	14		
Cloxacilina	6,30	2,5-40,0	>0,996	2,5	6	7	11	2,5	3,0
				10,0	-9	6	10		
				40,0	-6	8	11		
Dicloxacilina	6,52	2,5-40,0	>0,996	2,5	8	12	17	2,5	3,3
				10,0	-12	12	16		
				40,0	-6	9	11		
Nafcilina	6,46	2,5-40,0	>0,997	2,5	8	6	8	2,5	2,9
				10,0	-9	7	13		
				40,0	-8	9	11		
Cefalexina	3,81	2,5-40,0	>0,995	2,5	-12	9	19	2,5	3,2
				10,0	-10	8	12		
				40,0	8	5	7		
Ceftiofur	5,22	2,5-40,0	>0,990	2,5	-12	10	24	2,5	3,6
				10,0	-2	10	17		
				40,0	-7	5	6		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R ²	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC α $\mu\text{g}/\text{Kg}$	CC β $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Cefoperazona	4,77	5,0- 80,0	>0,992	5,0	-3	14	24	5,0	7,0
				20,0	-6	8	11		
				80,0	6	9	13		
QUINOLONAS									
Danofloxacin	4,12	2,5-40,0	>0,995	2,5	7	9	16	2,5	3,2
				10,0	-10	5	9		
				40,0	-4	5	8		
Difloxacin	4,35	2,5-40,0	>0,992	2,5	2	6	17	2,5	3,2
				10,0	3	4	6		
				40,0	-1	5	7		
Ciprofloxacina	4,00	2,5-40,0	>0,993	2,5	6	6	8	2,5	2,8
				10,0	2	5	8		
				40,0	0	3	5		
Enrofloxacin	4,17	2,5-40,0	>0,992	2,5	-4	6	17	2,5	3,2
				10,0	2	4	6		
				40,0	3	4	6		
Flumequina	5,76	2,5-40,0	>0,995	2,5	6	4	14	2,5	3,1
				10,0	7	3	7		
				40,0	0	6	13		
Acido Oxolínico	5,07	2,5-40,0	>0,996	2,5	-3	10	18	2,5	3,2
				10,0	6	5	9		
				40,0	1	5	10		
MACRÓLIDOS									
Eritromicina A	5,64	37,5- 600,0	>0,997	37,5	5	4	7	183,5	217,0
				150,0	-8	10	15		
				600,0	-5	8	12		
Espiramicina 1	4,69	2,5-40,0	>0,994	2,5	-10	12	22	2,5	3,3
				10,0	-3	7	9		
				40,0	-5	7	9		
Neospiramicina	4,45	2,5-40,0	>0,994	2,5	5	9	12	2,5	3,0
				10,0	-10	7	10		
				40,0	2	8	11		

04. Resultados y discusión

ANALITO	RT	Rango (µg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/Kg	CC _β µg/Kg
Tilmicosina	5,13	2,5-40,0	>0,996	2,5	2	10	17	2,5	3,2
				10,0	-14	10	15		
				40,0	-1	9	14		
Tilosina A	5,82	50,0- 800,0	>0,996	50,0	-6	8	12	218,5	236,9
				200,0	5	3	5		
				800,0	2	6	9		
LINCOSAMIDAS									
Lincomicina	3,49	12,5- 200,0	>0,995	12,5	-6	10	16	55,5	61,0
				50,0	-11	6	8		
				200,0	5	7	14		
SULFONAMIDAS									
Sulfatiazol	2,63	2,5-40,0	>0,997	2,5	4	2	14	2,5	3,1
				10,0	-9	3	11		
				40,0	3	3	5		
Sulfadiazina	2,03	2,5-40,0	>0,996	2,5	2	4	21	2,5	3,4
				10,0	-10	4	10		
				40,0	3	3	6		
Sulfamerazina	3,45	2,5-40,0	>0,997	2,5	4	3	8	2,5	2,9
				10,0	-5	3	6		
				40,0	4	4	5		
Sulfacetamida	1,37	5,0- 80,0	>0,997	5,0	4	6	8	5,0	5,7
				20,0	-8	6	16		
				80,0	8	6	9		
Sulfadimetoxina	5,06	2,5-40,0	>0,995	2,5	-4	3	17	2,5	3,2
				10,0	3	4	6		
				40,0	-2	3	5		
Sulfametazina	4,05	2,5-40,0	>0,998	2,5	7	3	5	2,5	2,6
				10,0	1	2	4		
				40,0	2	3	5		

ANALITO	RT	Rango ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	R^2	Conc. ($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	CC_α $\mu\text{g}/\text{Kg}$	CC_β $\mu\text{g}/\text{Kg}$
Sulfametoxipiridazina	4,08	2,5-40,0	>0,996	2,5	-1	6	16	2,5	3,1
				10,0	-2	5	9		
				40,0	8	3	8		
Sulfapiridina	3,07	2,5-40,0	>0,996	2,5	-5	6	19	2,5	3,3
				10,0	-2	6	10		
				40,0	7	5	7		
Sulfaquinoxalina	5,14	2,5-40,0	>0,994	2,5	-1	8	12	2,5	3,0
				10,0	-6	9	12		
				40,0	-2	5	7		
Dapsona	4,00	2,5-40,0	>0,993	2,5	1	8	15	2,5	3,1
				10,0	-10	8	18		
				40,0	3	6	7		
OTROS									
Trimetoprim	3,66	2,5-40,0	>0,993	2,5	-2	13	21	2,5	3,4
				10,0	-5	8	11		
				40,0	-6	5	8		

Tabla 4.15 Resultados parámetros de validación en pienso y tiempo de retención. Rango de concentración, coeficiente de determinación (R^2), nivel de concentración (Conc), veracidad (sesgo %), repetibilidad (RSD_r %), reproducibilidad intralaboratorio (RSD_R %), $CC\alpha$ y $CC\beta$.

ANALITO	RT	Rango (mg/Kg)	R^2	Conc. ($\mu\text{g/Kg}$)	Veracidad (Sesgo %)	RSD_r (%) n=30	RSD_R (%) n=30	$CC\alpha$ $\mu\text{g/Kg}$	$CC\beta$ $\mu\text{g/Kg}$
TETRACICLINAS									
Epi-tetraciclina	3,56	0,375-3,750	>0,995	375	3	4	9	375	432
				750	-1	5	8		
				3750	-1	5	9		
Tetraciclina	4,01	0,375-3,750	>0,995	375	5	5	7	375	420
				750	1	4	7		
				3750	6	6	9		
Epi-oxitetraciclina	3,74	0,275-2,750	>0,997	275	3	5	7	275	307
				550	-5	4	7		
				2750	3	4	6		
Oxitetraciclina	3,93	0,275-2,750	>0,995	275	4	4	9	275	316
				550	-4	5	7		
				2750	5	5	7		
Epi-clortetraciclina	4,27	0,375-3,750	>0,994	375	5	7	10	375	442
				750	-2	8	12		
				3750	1	6	8		
Clortetraciclina	4,62	0,375-3,750	>0,993	375	8	7	11	375	451
				750	1	6	10		
				3750	7	7	12		
Doxiciclina	4,84	1,25-12,50	>0,994	1.250	6	8	11	1.250	1.484
				2.500	1	6	8		
				12.500	3	6	8		

ANALITO	RT	Rango (mg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/Kg	CC _β µg/Kg
β-LACTÁMICOS									
Amoxicilina	1,07	2-20	>0,992	2.000	-10	8	14	2.000	2.416
				4.000	-3	7	9		
				20.000	4	5	7		
Ampicilina	3,82	0,5-5,0	>0,995	500	7	4	6	500	553
				1.000	-13	4	6		
				5.000	6	3	5		
Penicilina G	5,72	0,5-5,0	>0,993	500	-1	6	9	500	576
				1.000	-3	7	12		
				5.000	7	5	8		
Penicilina V	5,99	1-10	>0,994	1.000	4	5	10	1.000	1.163
				2.000	-8	5	7		
				10.000	4	7	10		
Oxacilina	6,13	0,3-3,0	>0,995	300	2	6	14	300	372
				600	-7	7	9		
				3.000	4	10	15		
Cloxacilina	6,30	0,3-3,0	>0,994	300	-3	9	13	300	361
				600	7	7	10		
				3.000	8	5	7		
Dicloxacilina	6,52	0,3-3,0	>0,996	300	1	12	16	300	380
				600	-7	12	15		
				3.000	10	5	9		
Nafcilina	6,46	0,3-3,0	>0,995	300	5	6	10	300	351
				600	-8	5	7		
				3.000	6	7	10		
Cefalexina	3,79	1-10	>0,997	1.000	8	5	8	1.000	1.147
				2.000	-16	5	7		
				10.000	4	6	9		
Ceftiofur	5,22	1-10	>0,998	1.000	4	1	2	1.000	1.022
				2.000	-7	3	4		
				10.000	3	5	7		

04. Resultados y discusión

ANALITO	RT	Rango (mg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/Kg	CC _β µg/Kg
Cefoperazona	4,76	0,5-5,0	>0,996	500	0	4	6	500	545
				1.000	-6	5	8		
				5.000	1	5	7		
QUINOLONAS									
Danofloxacin	4,11	0,3-3,0	>0,995	300	1	5	7	300	334
				600	-5	4	6		
				3.000	5	8	10		
Difloxacin	4,34	1-10	>0,996	1.000	1	5	8	1.000	1.127
				2.000	3	4	5		
				10.000	0	3	6		
Ciprofloxacina	3,98	1-10	>0,996	1.000	-1	4	6	1.000	1.101
				2.000	1	4	5		
				10.000	2	4	7		
Enrofloxacin	4,16	1-10	>0,996	1.000	-1	5	8	1.000	1.129
				2.000	3	4	6		
				10.000	2	4	8		
Flumequina	5,75	6,0-60,0	>0,997	6.000	-3	4	6	6.000	6.541
				12.000	10	3	6		
				60.000	-9	5	7		
Acido Oxolínico	5,06	0,5-5,0	>0,996	500	3	4	6	500	547
				1.000	8	3	5		
				5.000	-1	3	6		
MACRÓLIDOS									
Eritromicina A	5,64	0,4-4,0	>0,998	400	-3	5	7	400	490
				800	-5	4	7		
				4.000	-5	6	11		
Espiramicina 1	4,69	2,85-28,5	>0,996	2.850	8	8	13	2.850	3.515
				5.700	8	7	9		
				28.500	1	7	11		
Tilmicosina	5,13	1-10	>0,996	1.000	-1	6	8	1.000	1.273
				2.000	3	5	8		
				10.000	1	7	9		

ANALITO	RT	Rango (mg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/Kg	CC _β µg/Kg
Tilosina A	5,82	0,5-5,0	>0,997	500	-1	3	5	500	544
				1.000	1	3	4		
				5.000	3	4	7		
LINCOSAMIDAS									
Lincomicina	3,45	2,2-22,0	>0,998	2.200	4	2	4	2.200	2.350
				4.400	-7	3	5		
				22.000	5	2	6		
SULFONAMIDAS									
Sulfatiazol	2,55	1-10	>0,997	1.000	6	1	2	1.000	1.040
				2.000	-4	1	2		
				10.000	3	3	4		
Sulfadiazina	1,95	1,25-12,5	>0,997	1.250	6	2	4	1.250	1.333
				2.500	1	3	5		
				12.500	3	3	4		
Sulfamerazina	3,39	1-10	>0,998	1.000	4	1	2	1.000	1.041
				2.000	0	3	4		
				10.000	1	1	2		
Sulfacetamida	1,36	1-10	>0,997	1.000	1	4	9	1.000	1.142
				2.000	-1	3	4		
				10.000	2	3	7		
Sulfadimetoxina	5,05	1-10	>0,996	1.000	0	5	7	1.000	1.108
				2.000	2	4	5		
				10.000	2	3	5		
Sulfametazina	4,03	0,5-5,0	>0,997	500	3	2	4	500	533
				1.000	-1	2	3		
				5.000	1	2	3		
Sulfametoxipiridazina	4,06	1-10	>0,997	1.000	4	4	5	1.000	1.078
				2.000	-1	3	5		
				10.000	1	4	5		

ANALITO	RT	Rango (mg/Kg)	R ²	Conc. (µg/Kg)	Veracidad (Sesgo %)	RSD _r (%) n=30	RSD _R (%) n=30	CC _α µg/Kg	CC _β µg/Kg
Sulfapiridina	3,01	1-10	>0,996	1.000	6	2	6	1.000	1.111
				2.000	-1	3	4		
				10.000	1	2	4		
Sulfaquinoxalina	5,13	1-10	>0,996	1.000	1	3	5	1.000	1.077
				2.000	-3	4	5		
				10.000	5	3	5		
OTROS									
Trimetoprim	3,63	0,35-3,5	>0,995	350	3	5	7	350	393
				700	-3	4	5		
				3.500	3	3	6		
Florfenicol	4,54	1-10	>0,996	1.000	10	7	11	1.000	1.196
				2.000	7	6	13		
				10.000	-1	6	10		
Tianfenicol	3,77	0,5-5,0	>0,996	500	5	5	7	500	559
				1.000	-2	6	12		
				5.000	1	6	8		

4.2.8.1. Especificidad

a) Agua

En ninguna de las 24 muestras de agua de bebida para animales (6 muestras de agua para aves, 6 para porcino, 6 para bovino y 6 para ovino) ensayadas se obtuvo señal en el RRT de los analitos (con una tolerancia del 2,5%) que pudiese afectar, cualitativa (identificación de los analitos) o cuantitativamente, a los resultados.

b)Miel

En ninguna de las 36 muestras de miel (12 muestras de miel multifloral, 12 de miel de romero y 12 de miel de brezo) ensayadas se obtuvo señal en el RRT de los analitos (con una tolerancia del 2,5%) que pudiese afectar, cualitativa (identificación de los analitos) o cuantitativamente, a los resultados.

c)Huevo

En ninguna de las 21 muestras de huevo de gallina de diferentes procedencias ensayadas se obtuvo señal en el RRT de los analitos (con una tolerancia del 2,5%) que pudiese afectar, cualitativa (identificación de los analitos) o cuantitativamente, a los resultados.

d)Pienso

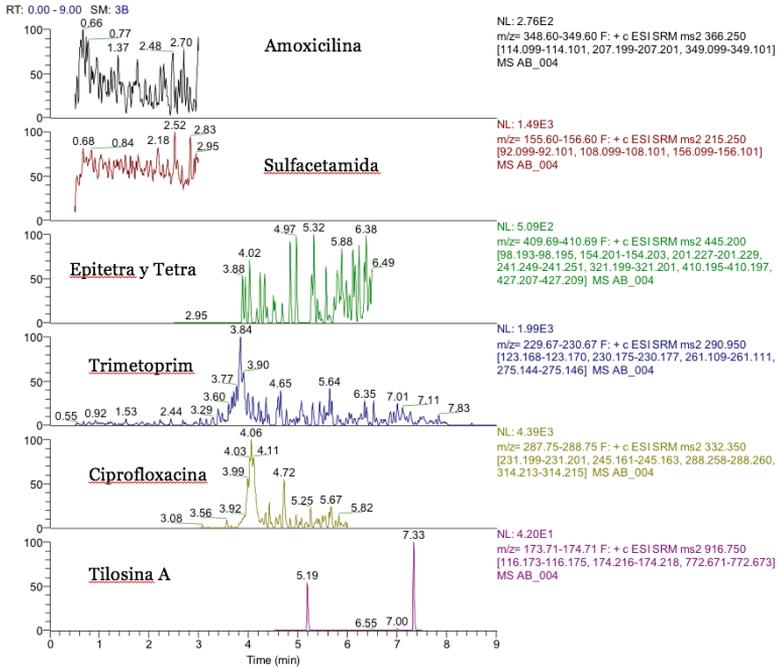
En ninguna de las 24 muestras de pienso (4 muestras de pienso para bovino, 4 para ave, 4 para equino, 4 para porcino, 4 para conejo y 4 para ovino) ensayadas se obtuvo señal en el RRT de los analitos (con una tolerancia del 2,5%) que pudiese afectar, cualitativa (identificación de los analitos) o cuantitativamente, a los resultados.

Con ello quedó demostrada la especificidad de los métodos propuestos para las matrices agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso por LC-MS/MS.

Las figuras 4.30, 4.31, 4.32 y 4.33 muestran los cromatogramas de muestras blanco y muestras adicionadas a la concentración correspondiente al límite de cuantificación para las matrices agua de bebida para animales, miel, huevo y pienso, respectivamente.

La figura 4.30. muestra el cromatograma de una muestra blanco de agua de bebida para porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

a)



b)

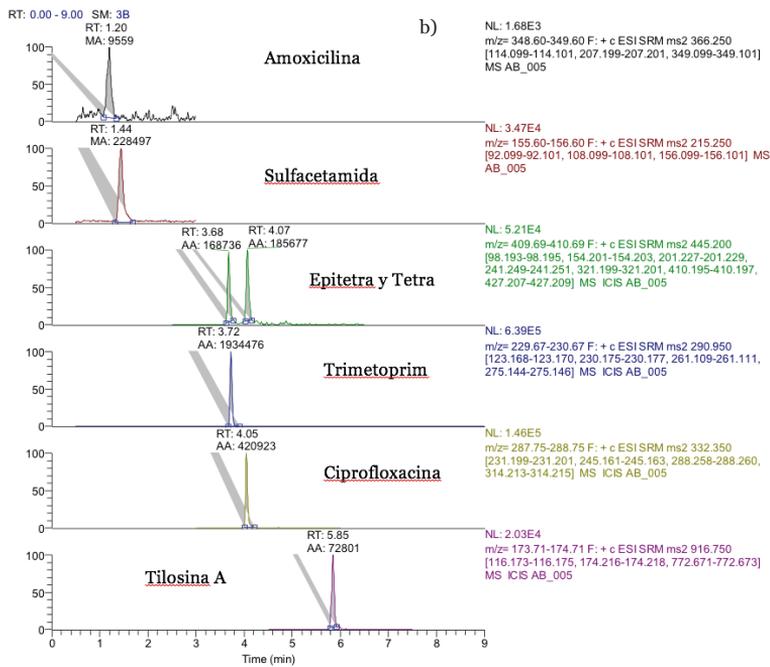


Figura 4.30. Cromatograma de una muestra blanco de agua para porcino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

La figura 4.31. muestra el cromatograma de una muestra blanco de miel de romero (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

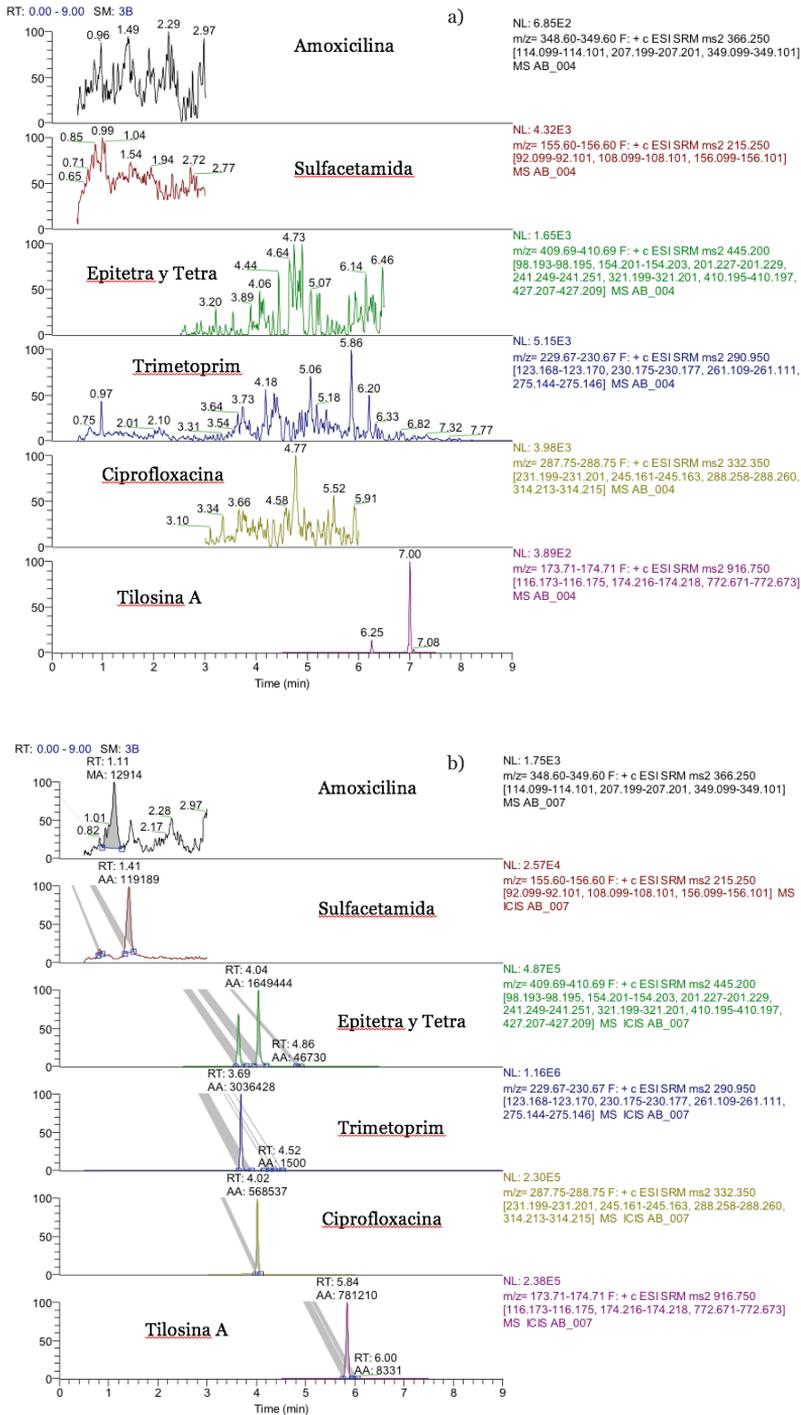


Figura 4.31. Cromatograma de una muestra blanco de miel de romero (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

La figura 4.32 muestra el cromatograma de una muestra blanco de huevo de gallina (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

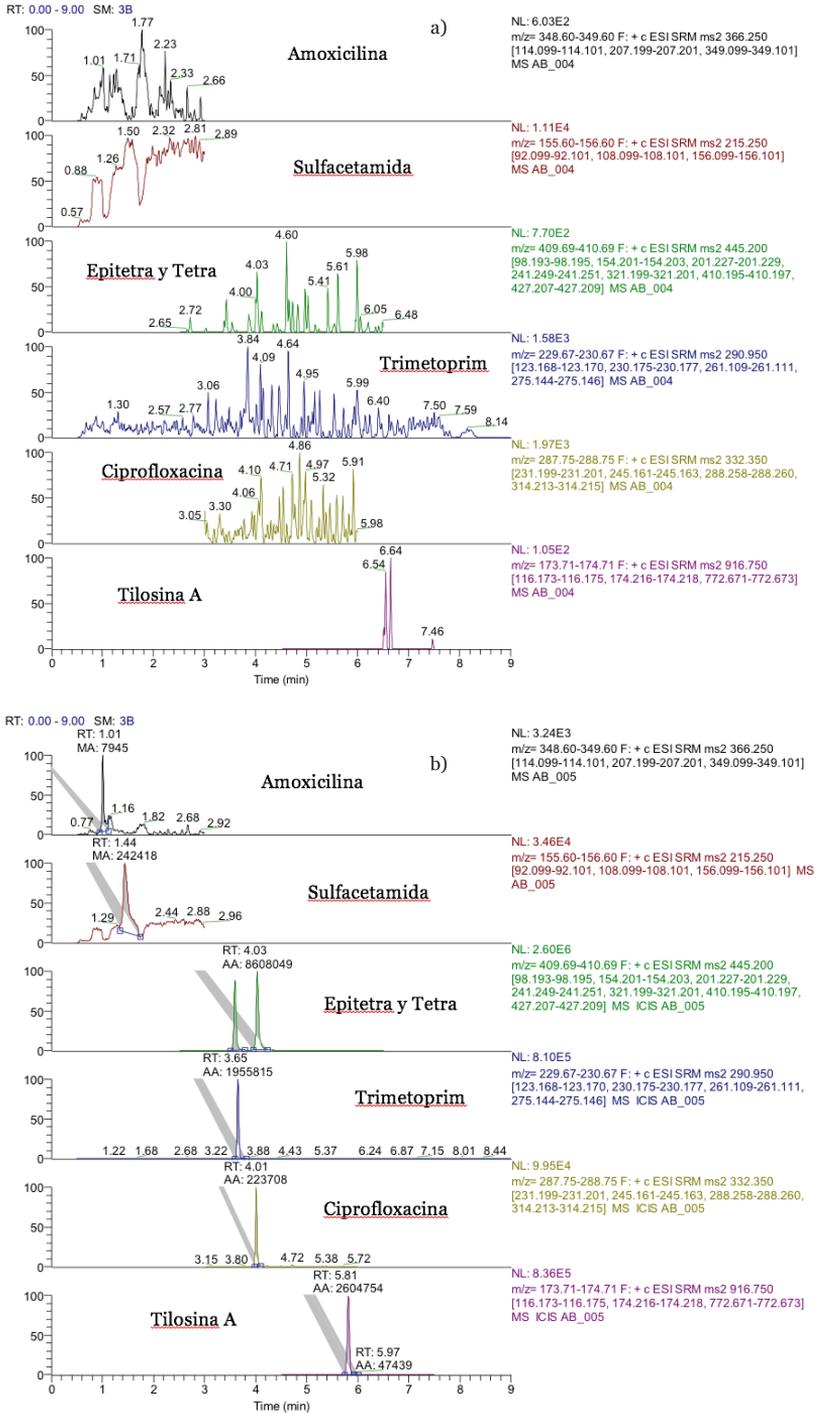


Figura 4.32. Cromatograma de una muestra blanco de huevo de gallina (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

La figura 4.33 muestra el cromatograma de una muestra blanco de pienso para ovino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

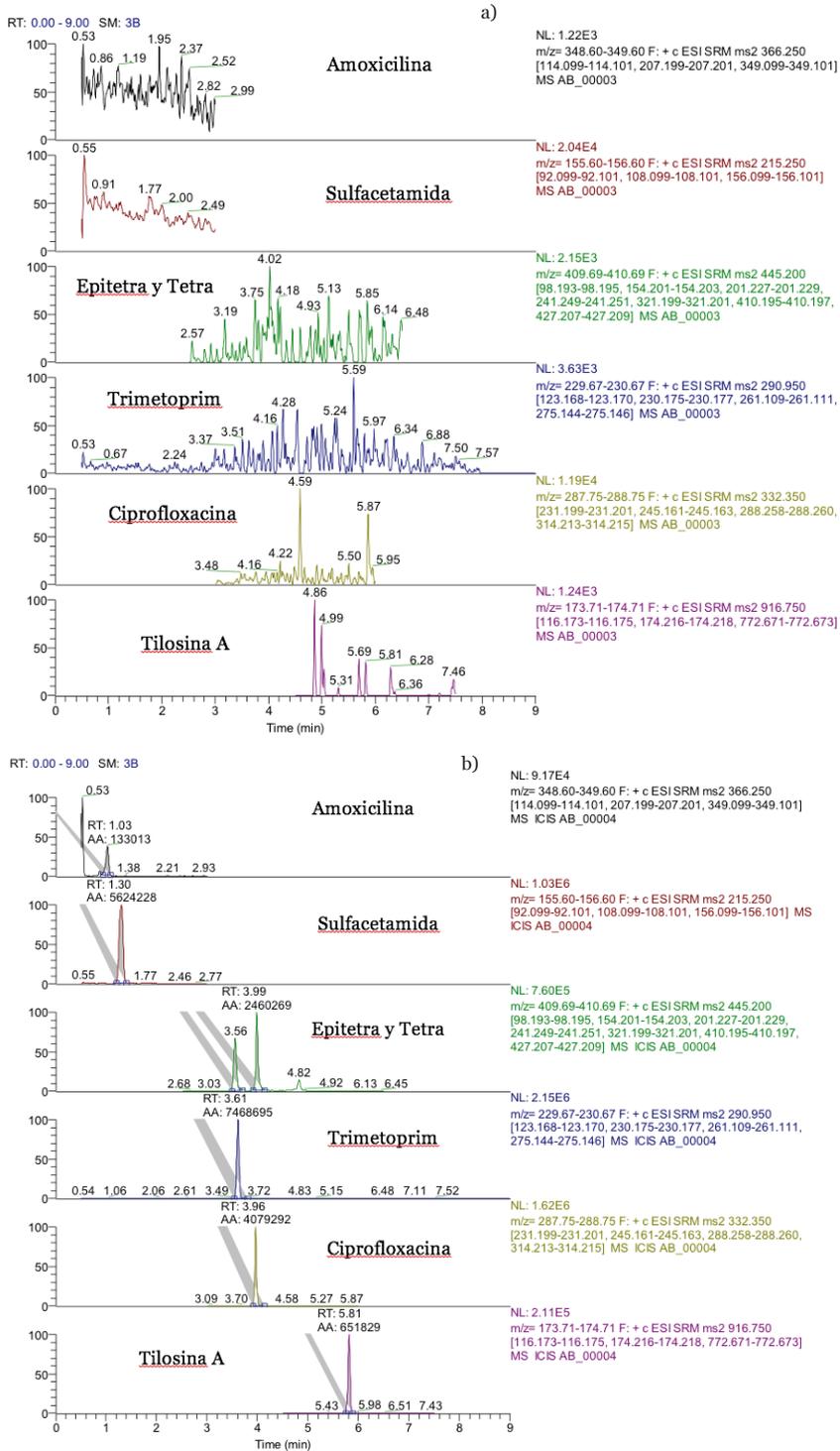


Figura 4.33. Cromatograma de una muestra blanco de pienso para ovino (a) y la misma muestra adicionada a la concentración correspondiente al LC en esa matriz para los distintos analitos (b). Se muestran analitos representativos de las distintas familias de antibióticos.

4.2.8.2. Rectas de calibrado y rango de trabajo

Para las diferentes matrices la cuantificación se realizó mediante rectas de calibrado en matriz extraída, obtenidas adicionando los compuestos de interés al inicio del proceso de extracción, y con corrección con patrón interno para todas las familias de antibióticos. Para estos métodos, se realizó una selección minuciosa de los patrones internos para cada analito de manera que se procesaron los datos de las rectas de calibrado, ayudados del software TraceFinder con los distintos patrones internos disponibles, y se seleccionaron para cada analito aquellos que producían las rectas de calibrado con mejores ajustes de los datos experimentales a las rectas teóricas. El ensayo de evaluación del efecto matriz se llevó a cabo con las respuestas relativas obtenidas con los patrones internos seleccionados en cada caso. La tabla 3.2 (apartado Material y Métodos) muestra para cada analito el patrón interno seleccionado en cada caso.

Las rectas fueron construidas representando las áreas relativas (área del analito/área del patrón interno) en el eje de ordenadas frente a la concentración en muestra en el eje de las abscisas, realizándose la regresión lineal por mínimos cuadrados.

Los coeficientes de determinación R^2 obtenidos para cada una de las 6 rectas de calibrado utilizadas para la cuantificación de los datos en cada una de las matrices fueron $>0,990$ para todos los analitos, cumpliendo además, el criterio adicional de % de desviación de los puntos experimentales a las mismas, siendo este $\leq 20\%$ para todos los niveles de concentración, con lo que se consideró adecuada la correlación para los rangos estudiados.

Los valores de los coeficientes de determinación R^2 se muestran en las tablas 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 de resultados de los parámetros de validación para las matrices

agua, miel, huevo y pienso, respectivamente. Los valores mostrados corresponden a los más desfavorables de las diferentes rectas de calibrado.

Respecto a los rangos de trabajo, en los casos de combinaciones matriz/analito no autorizadas, el nivel más bajo estudiado fue lo más bajo posible, de manera que se garantizase la confirmación y la cuantificación adecuada, y el nivel más alto estudiado fue 16 veces superior. Para las combinaciones matriz/analito autorizadas, el nivel más bajo estudiado fue $\frac{1}{4}$ LMR y el nivel más alto, 4 x LMR. En el caso de los piensos debido a que se aceptan contaminaciones cruzadas de antibióticos en piensos no medicados menores al 1% de la concentración de medicamento producido en el lote anterior de pienso medicado, a efectos de practicabilidad del método, el nivel más bajo estudiado fue $\frac{1}{2}$ del 1% de la concentración más baja de cada antibiótico en un pienso medicado y autorizado en España (ver apartado 3.3.2.6 en Material y Métodos) (Comisión Nacional de Coordinación en Materia de Alimentación Animal, 2014) o 10 veces el LMR más bajo establecido en el Reglamento(CE) 37/2010 para antibióticos en los que no existe una premezcla autorizada en España; y el nivel superior, 10 veces superior a estas.

4.2.8.3. Veracidad

a) Agua

Los resultados se muestran en la tabla 4.12 de resultados de los parámetros de validación.

La veracidad, medida como sesgo, a nivel de 2,5 µg/l osciló entre -15 % para espiramicina 1 y +10% para tilmicosina. Para las demás concentraciones osciló entre

-18% para eritromicina a nivel de 80 µg/l y +9 para tilmicosina a nivel de 40 µg/l y trimetoprim a nivel de 10 µg/l.

b)Miel

Los resultados se muestran en la tabla 4.13 de resultados de los parámetros de validación.

La veracidad, medida como sesgo, a nivel de 2,5 µg/Kg osciló entre -19% para trimetoprim y + 8% para flumequina. Para las demás concentraciones osciló entre - 14% para cefoperazona a nivel de 20 µg/Kg y + 6% para ceftiofur a nivel de 10 µg/Kg y flumequina a nivel de 40 µg/Kg.

c)Huevo

Los resultados se muestran en la tabla 4.14 de resultados de los parámetros de validación.

La veracidad, medida como sesgo, a nivel de concentraciones < 10 µg/Kg osciló entre -12% para ceftiofur y +9% para oxacilina. Para concentraciones ≥ 10 µg/Kg, osciló entre -16% para ampicilina y +8% para penicilina G, cefalexina, sulfacetamida y sulfametoxipiridacina.

d)Pienso

Los resultados se muestran en la tabla 4.15 de resultados de los parámetros de validación.

En este caso las concentraciones estudiadas para todos los analitos fueron $> 10 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y la veracidad, medida como sesgo osciló entre -16% para cefalexina a nivel de $2.000 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y $+10\%$ para dicloxacilina a nivel de $3.000 \mu\text{g}/\text{Kg}$ y flumequina a nivel de $12.000 \mu\text{g}/\text{Kg}$.

En todos los casos, para las concentraciones estudiadas, se cumplieron los criterios de aceptación establecidos en la Decisión 2002/657/CE (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002) que establece un sesgo entre $-30\% - +10\%$ para concentraciones $> 1 \mu\text{g}/\text{l}$ o $\mu\text{g}/\text{Kg}$ a $<10 \mu\text{g}/\text{l}$ o $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y de $-20\% - +10\%$ para concentraciones $\geq 10 \mu\text{g}/\text{l}$ o $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

4.2.8.4. Precisión. Repetibilidad y Reproducibilidad intralaboratorio

Los resultados de precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio calculados como coeficientes de variación o desviaciones estándar relativas (RSD_r y RSD_R , respectivamente) se encontraron por debajo de los criterios de aceptación establecidos en la Decisión 2002/657/CE (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002) en la que se establece que los CV % intralaboratorio no superarán el valor calculado mediante la ecuación de Horwitz. Además, para valores de concentración $< 100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ se indica que estos serán lo más bajos posible.

a) Agua

Los resultados se muestran en la tabla 4.12 de resultados de los parámetros de validación.

El valor más elevado de RSD_R para concentraciones $> 1 - 10 \mu\text{g/l}$ se obtuvo para epi-clortetraciclina y tilmicosina a $2,5 \mu\text{g/l}$ (25 %) y para concentraciones $>10 \mu\text{g/l}$ y $<100 \mu\text{g/l}$ se obtuvo un 25 % para nafcilina y eritromicina a $40 \mu\text{g/l}$ y $20 \mu\text{g/l}$, respectivamente.

Los valores de RSD_r fueron \leq que los de RSD_R en todos los casos.

b) Miel

Los resultados se muestran en la tabla 4.13 de resultados de los parámetros de validación.

El valor más elevado de RSD_R para concentraciones $> 1 - 10 \mu\text{g/Kg}$ se obtuvo para doxiciclina, cefalexina y tilmicosina a $2,5 \mu\text{g/Kg}$ (26%) y para nafcilina y tilosina a $10 \mu\text{g/Kg}$. Para concentraciones $>10 \mu\text{g/Kg}$ y $<100 \mu\text{g/Kg}$ el valor más elevado de RSD_R se obtuvo para cefoperazona a $40 \mu\text{g/Kg}$ (21%).

Los valores de RSD_r fueron \leq que los de RSD_R en todos los casos.

c) Huevo

Los resultados se muestran en la tabla 4.14 de resultados de los parámetros de validación.

En esta matriz, el valor más elevado de RSD_R para concentraciones $> 1 - 10 \mu\text{g/Kg}$ se obtuvo un 24 % para ceftiofur a $2,5 \mu\text{g/Kg}$ y para cefoperazona a $5,0 \mu\text{g/Kg}$. Para el rango de concentraciones $>10 \mu\text{g/Kg}$ y $<100 \mu\text{g/Kg}$, el valor más elevado se produjo para epi-oxitetraciclina a $50 \mu\text{g/Kg}$, con un 21%. Y para concentraciones

$\geq 100 \mu\text{g/Kg}$ y $< 1.000 \mu\text{g/Kg}$ se obtuvo, como valor más elevado, el de 15% para eritromicina a $150 \mu\text{g/Kg}$.

Los valores de RSD_r fueron \leq que los de RSD_R en todos los casos.

d) Pienso

Los resultados se muestran en la tabla 4.15 de resultados de los parámetros de validación.

En esta matriz, todas las concentraciones estudiadas fueron $> 100 \mu\text{g/Kg}$. Para concentraciones $> 100 \mu\text{g/Kg}$ y $< 1.000 \mu\text{g/Kg}$, el valor más elevado de RSD_R fue 16% para dicloxacilina a la concentración de $300 \mu\text{g/Kg}$. Para concentraciones $\geq 1.000 \mu\text{g/Kg}$ el valor más elevado fue 14% para amoxicilina a $2.000 \mu\text{g/Kg}$.

Los valores de RSD_r fueron \leq que los de RSD_R en todos los casos.

4.2.8.5. Límite de decisión o $\text{CC}\alpha$ y Capacidad de detección o $\text{CC}\beta$

Los valores obtenidos para los parámetros $\text{CC}\alpha$ y $\text{CC}\beta$ se presentan en las tablas 4.12, 4.13, 4.14 y 4.15 en cada una de las matrices estudiadas, agua, miel, huevo y pienso, respectivamente. Fueron estimados de acuerdo a lo indicado en los apartados de Materiales y Métodos 3.3.2.8. c) y d).

En todos los casos, para las concentraciones estudiadas, se cumplieron los criterios de aceptación establecidos en la Decisión 2002/657/CE que establece que, en condiciones de reproducibilidad, el Coeficiente de Variación (CV%) o Desviación

Standard Relativa (RSD_R %) no superará el nivel calculado mediante la ecuación de Horwitz (Decisión de la Comisión, 2002/657/CE, 2002)

Los resultados obtenidos tanto en los estudios de efecto matriz como los obtenidos para los parámetros cuantitativos tras la validación, muestran que se pueden utilizar tanto patrones internos marcados isotópicamente como patrones internos no marcados isotópicamente, para corregir el efecto matriz y para la cuantificación, obteniéndose resultados adecuados y que cumplen los criterios establecidos en la legislación vigente.

De los métodos publicados en matrices acuosas, en ningún caso se indicó que las muestras de agua fueran tomadas de los bebederos de los animales en las explotaciones ganaderas. Las propuestas de otros autores sobre métodos de análisis de antibióticos en agua, por esta técnica, incluían aguas residuales y aguas superficiales, con el objeto de estudiar la contaminación de las aguas con estos compuestos e incluían tanto antibióticos de uso humano como veterinario y además, otros compuestos farmacéuticos (Dasenaki & Thomaidis, 2015; Senta et al., 2017; Shaaban & Górecki, 2012; Voigt et al., 2020).

Los límites de cuantificación, en general superaron el valor de 2,5 $\mu\text{g/l}$ obtenido en el método propuesto en esta tesis, a excepción de Voigt et al. (2020) que obtuvieron límites de cuantificación más bajos en algunos de los compuestos de las familias β -lactámicos y sulfonamidas.

Respecto a los métodos publicados en la matriz miel para análisis de antibióticos por cromatografía líquida con espectrometría de masas, algunos se enfocaron solamente en el análisis de unos pocos antibióticos (Orso et al., 2015; von Eyken et al., 2019; Xu et al., 2021) o en una sola familia (Amelin et al., 2020) y aquellos que

proponían un método multi-clase, en general, no cubrían todas las familias de antibióticos incluidas en el método propuesto en esta tesis. En algunos casos, la familia de β -lactámicos quedó excluida (Bohm et al., 2012; El Hawari et al., 2017; Jin et al., 2017; Louppis et al., 2017; Martínez Vidal et al., 2009). En otros casos, no se incluyó la familia quinolonas (Hammel et al., 2008) y en otros, también la familia sulfonamidas quedó excluida (Bohm et al., 2012). Además, no siempre se estudiaron los compuestos Tilosina A y Tilosina B (Gómez-Pérez et al., 2012; Hammel et al., 2008; Jin et al., 2017; Louppis et al., 2017; Martínez Vidal et al., 2009) cuyo análisis simultáneo es fundamental debido a que la Tilosina A se degrada en Tilosina B o Desmicosina durante el almacenamiento (von Eyken et al., 2019). Tampoco se publicaron muchos métodos que incluyeran entre los antibióticos analizados la fumagilina, antibiótico muy importante en el análisis de miel, ya que ha sido utilizado en el tratamiento de la nosemosis, enfermedad producida en las abejas por los protozoos *Nosema apis* o *Nosema ceranae* (Reybroeck, Daeseleire, De Brabander, & Herman, 2012). Aquellos que analizaron este compuesto lo hacían como único compuesto en el método y con límites de cuantificación experimentales superiores al obtenido en esta tesis (5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) (Kanda et al., 2011; Nozal et al., 2008; van den Heever, Thompson, Curtis, Pernal, 2015). Respecto a los niveles más bajos estudiados para todos los antibióticos objeto de análisis, en general, estos fueron superiores a los ensayados para esta matriz en esta tesis, a excepción de los mostrados por Amelin et al (2020) en su propuesta para el análisis de β -lactámicos en miel y por Dmitrovic & Durden (2013) para fumagilina como único analito analizado.

La matriz huevo ha sido menos estudiada desde el punto de vista de la propuesta de métodos multi-clase de antibióticos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Algunos de los métodos propuestos no incluyeron todas las familias de antibióticos propuestas en esta tesis (Garrido Frenich et al., 2010; Li et al., 2018) y en aquellos trabajos que las incluían, no analizaban compuestos como

dapsona, sulfacetamida, neospiramicina, ni los 4-epímeros de las tetraciclinas (Hu et al., 2021; Jiménez et al., 2011; Paoletti et al., 2021; Peters et al., 2009; Wang, Lin, Huang, & Chen, 2017). Los trabajos donde se incluyeron mayor número de antibióticos para esta matriz fueron los propuestos por Paoletti et al. (2021) que incluyeron 60 antibióticos y por Wang et al. (2017) que incluyeron 64 antibióticos. El nivel más bajo estudiado experimentalmente para aquellos antibióticos no autorizados en esta matriz fue 3,3 µg/Kg (Paoletti et al., 2021) y el resto de autores estudiaron 5 µg/Kg, 10 µg/Kg, 25 µg/Kg o superiores. Estos valores, en general, superaron el nivel más bajo estudiado en esta tesis para los antibióticos no autorizados en huevo, que fue de 2,5 µg/Kg para prácticamente todos esos compuestos, excepto para sulfacetamida, doxicilina, cefoperazona (5 µg/Kg) y penicilina G (10 µg/Kg).

Finalmente, tampoco la matriz pienso ha sido estudiada por muchos autores para desarrollar métodos multi-clase de antibióticos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Kaklamanos et al. (2013) proponían un método para analizar 48 compuestos de diferentes familias de antibióticos por cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas de alta resolución orbitrap en pienso de porcino. De los compuestos incluidos en el método, no se encontró ninguno de la familia β -lactámicos. Gómez-Pérez et al. (2015a) presentaron un método para analizar 300 compuestos que incluían medicamentos veterinarios y plaguicidas y compararon las técnicas LC-ToF con LC-HRMS orbitrap. De las familias de antibióticos que incluyeron, no se estudió ningún compuesto perteneciente al grupo de cefalosporinas dentro de la familia de β -lactámicos. Otros autores (Decheng et al., 2018; Patyra & Kwiatek, 2017) desarrollaron y validaron un método, que incluyó solamente la familia tetraciclinas en piensos de porcino y ave, por LC-MS (simple cuadrupolo), con lo que no se garantizaba la confirmación de las moléculas. El trabajo publicado por Decheng et al. (2018) contemplaba un método para la determinación de antibióticos y agentes antivirales pero aplicado a piensos de origen

animal. Ninguno de los métodos presentados incluía piensos destinados a tantas especies animales diferentes como el método presentado en esta tesis, donde se ensayaron muestras de piensos para bovino, ave, equino, porcino, ovino y conejo durante el proceso de validación.

4.2.8.6. Relación efecto matriz-reproducibilidad intralaboratorio

Al igual que se realizó para la matriz leche en el método desarrollado por LC-HRMS (apartado 4.1), de nuevo se estudió la relación entre el efecto matriz corregido y la reproducibilidad intralaboratorio como $RSD_R\%$ a nivel del límite de cuantificación para las matrices agua, miel, huevo y pienso.

La figura 4.34. muestra la relación que se establece entre el % efecto matriz corregido en valor absoluto y la reproducibilidad intralaboratorio como $RSD_R\%$ a nivel del límite de cuantificación en la matriz pienso.

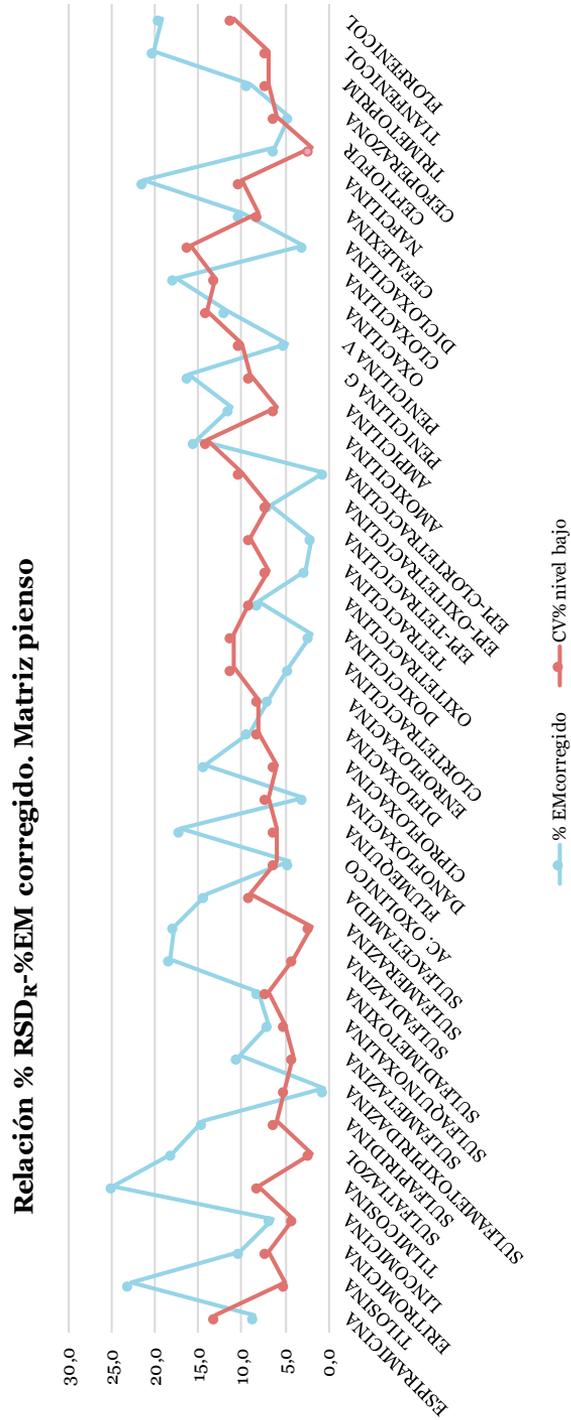


Figura 4.34. Relación entre %EM corregido (valor absoluto) y RSD_R%. Nivel límite de cuantificación. Matriz pienso.

Al representar las dos líneas de tendencia, no ocurrió como en la matriz leche en que para la mayoría de compuestos ambas líneas (%EM corregido en valor absoluto y $RSD_R\%$) seguían la misma tendencia, es decir, cuando el $RSD_R\%$ era más desfavorable, el % EM corregido era más elevado. Para las matrices agua, miel, huevo y pienso aproximadamente en la mitad de los compuestos ambas líneas seguían la misma tendencia, pero en la otra mitad, no se vió una relación directa entre un mayor valor de reproducibilidad intralaboratorio y un mayor efecto matriz. La figura 4.34 muestra, como ejemplo, lo que sucedió para la matriz pienso. Aproximadamente para la mitad de los analitos, un mayor efecto matriz corregido, no conllevó necesariamente una precisión más desfavorable.

4.2.9. Análisis de muestras

Los métodos desarrollados se aplicaron a muestras de todas las matrices estudiadas.

4.2.9.1. Agua

En el caso del agua de bebida de animales, el método se aplicó a 73 muestras de agua de bebida tomadas de explotaciones de aves.

La figura 4.35 muestra el porcentaje de muestras con valor $> CC\alpha$, es decir, No conformes, y el porcentaje de muestras con valor $< CC\alpha$ sobre la totalidad de las muestras analizadas en la matriz agua.

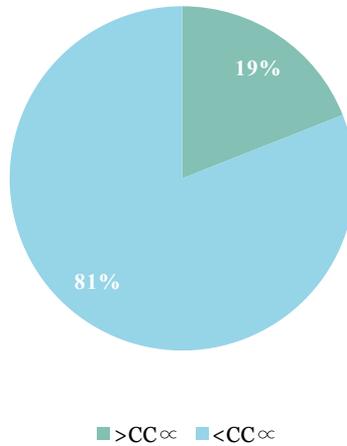


Figura 4.35. Porcentaje de muestras > CC α y < CC α . Muestras analizadas 73. Matriz agua.

La figura 4.36 muestra el número de muestras con resultado > CC α por cada analito para la matriz agua.

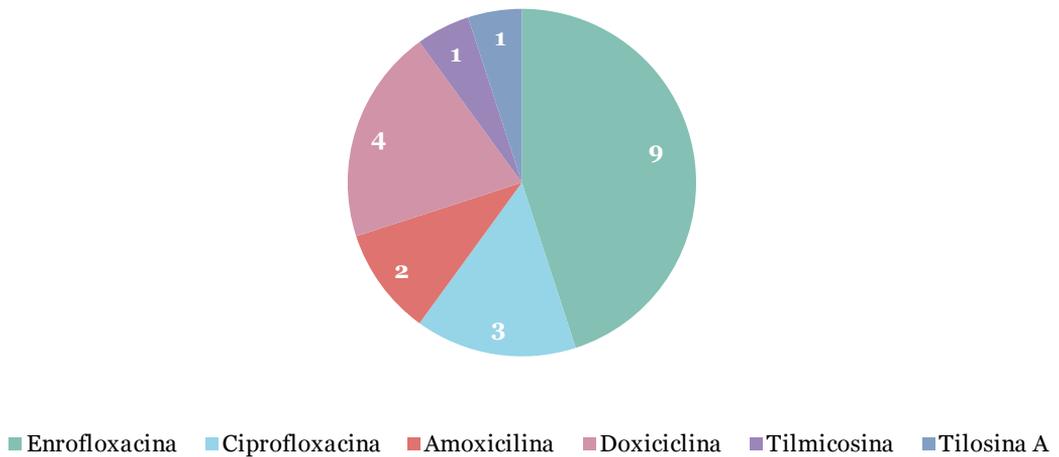


Figura 4.36. Número de muestras con resultados > CC α por cada analito. Matriz agua.

De las 73 muestras analizadas, 14 tuvieron resultado > CC α debido a la presencia de 1 o más analitos. Por lo tanto, un 19 % de las muestras fueron No conformes por superar el Límite de decisión o CC α . El analito que más frecuentemente se detectó

fue enrofloxacin, seguida de ciprofloxacina, amoxicilina, doxiciclina, tilmicosina y tilosina A.

En la tabla 4.16. se muestran los analitos detectados en las muestras de agua con valores por encima del CC α , las concentraciones obtenidas para cada analito en cada una de las muestras con resultado No conforme, así como el valor del CC α y la calificación de cada muestra.

Tabla 4.16. Analitos detectados en las muestras de agua para ave por encima del CC α y concentraciones obtenidas.

Muestra	Analito	Matriz	Resultado $\mu\text{g/l}$	CC α $\mu\text{g/l}$	Confirmado (SI/NO)	Calificación
1	Enrofloxacin	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
	Ciprofloxacina		>40	2,5	SI	
2	Enrofloxacin	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
	Amoxicilina		>40	2,5	SI	
3	Enrofloxacin	Agua para ave	7,4	2,5	SI	No Conforme
	Tilosina A		5,4	2,5	SI	
	Doxiciclina		10,9	2,5	SI	
4	Doxiciclina	Agua para ave	7,9	2,5	SI	No Conforme
5	Tilmicosina	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
6	Amoxicilina	Agua para ave	5,2	2,5	SI	No Conforme
7	Enrofloxacin	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
	Ciprofloxacina		>40	2,5	SI	
8	Enrofloxacin	Agua para ave	5,0	2,5	SI	No Conforme
9	Enrofloxacin	Agua para ave	2,7	2,5	SI	No Conforme
10	Enrofloxacin	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
11	Doxiciclina	Agua para ave	14,3	2,5	SI	No Conforme
12	Enrofloxacin	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
	Ciprofloxacina		3,3	2,5	SI	
13	Doxiciclina	Agua para ave	>40	2,5	SI	No Conforme
14	Enrofloxacin	Agua para ave	10,3	2,5	SI	No Conforme

De las 14 muestras No conformes, 5 de ellas contenían más de un antibiótico con resultado $> CC\alpha$. De las 9 muestras en las que se detectó el antibiótico enrofloxacin, solamente en 3 fue detectado, además, su metabolito ciprofloxacina. Hubo 2 muestras en las que se detectaron por encima del $CC\alpha$ más de un analito de diferentes familias. Concretamente en una se detectó enrofloxacin y amoxicilina y en otra, tilosina, enrofloxacin y doxiciclina. En la totalidad de las muestras los analitos fueron cuantificados y confirmados, pero ocurrió que, en 7 muestras, debido a que se superó el nivel superior validado ($40 \mu\text{g/l}$) para algún analito, no pudo informarse un valor numérico, sino que dichos resultados se informaron como “ $>40 \mu\text{g/l}$ ”. La presencia de estos antibióticos en estas dosis, claramente subterapéuticas, indica que los circuitos que sigue el agua en los bebederos de las aves, no sufren un proceso de limpieza exhaustivo tras los tratamientos terapéuticos.

A la vista de los antibióticos detectados, todos ellos autorizados en aves de corral, se deduce que en ningún caso se realizó un uso fuera de las prescripciones del prospecto.

4.2.9.2. Miel

El método se aplicó a 28 muestras de miel de diferentes tipos tomadas de las explotaciones apícolas de la Comunidad Valenciana. No se obtuvo ningún resultado $> CC\alpha$ para ningún antibiótico en ninguna de ellas.

4.2.9.3. Huevo

En el caso de la matriz huevo, el método fue aplicado a 50 muestras de huevos tomadas en centros clasificadores de huevos.

Solamente en 1 muestra fue detectado un antibiótico. Este fue sulfadiazina a una concentración de 5,6 µg/Kg. Teniendo en cuenta que, de acuerdo al Reglamento (UE) n° 37/2010, se trata de una sustancia no autorizada en especies que producen huevos para consumo humano, y que se superó el CC α (2,5 µg/Kg), la muestra se calificó de No conforme. Este es un ejemplo de sustancia autorizada cuyo uso se hizo fuera de las prescripciones del prospecto en aplicación del Reglamento (UE) 2017/880 para la llamada prescripción en cascada que ya se mencionó en el apartado de Introducción.

4.2.9.4. Pienso

El método fue aplicado a 44 muestras de piensos destinados a distintas especies animales.

La figura 4.37 muestra el porcentaje de muestras con valor > CC α , es decir, No conformes, y el porcentaje de muestras con valor < CC α sobre la totalidad de las muestras analizadas en la matriz pienso.

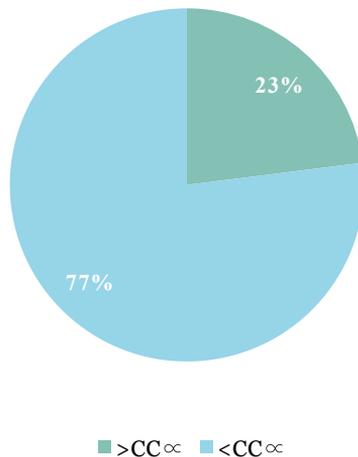


Figura 4.37. Porcentaje de muestras $> CC\alpha$ y $< CC\alpha$ Muestras analizadas 44. Matriz pienso.

La figura 4.38 muestra el número de muestras con resultado $> CC\alpha$ por cada analito para la matriz pienso.

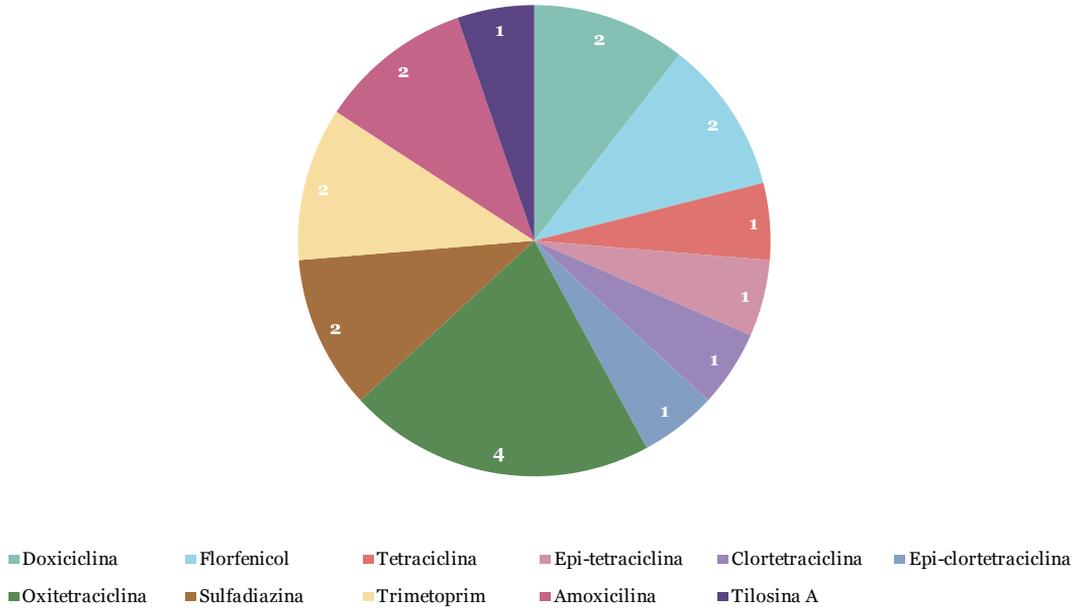


Figura 4.38. Número de muestras con resultados $> CC\alpha$ por cada analito. Matriz pienso.

De las 44 muestras analizadas, 10 tuvieron resultado $> CC\alpha$ debido a la presencia de 1 o más analitos. Por lo tanto, un 23 % de las muestras fueron No conformes por superar el Límite de decisión o $CC\alpha$. El analito más frecuentemente detectado fue oxitetraciclina, seguida de doxiciclina, florfenicol, sulfadiazina, trimetoprim, amoxicilina, epi-tetraciclina, tetraciclina, epi-clortetraciclina y tilosina.

En la tabla 4.17. se muestran los analitos detectados en las muestras de pienso con valores por encima del $CC\alpha$, las concentraciones obtenidas para cada analito en cada una de las muestras con resultado No conforme, así como el valor del $CC\alpha$ y la calificación de cada muestra.

Tabla 4.17. Analitos detectados en las muestras de pienso por encima del CC α y concentraciones obtenidas.

Muestra	Analito	Matriz	Resultado $\mu\text{g}/\text{Kg}$	CC α $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Confirmado (SI/NO)	Calificación
1	Doxiciclina	Pienso para ave	5.433	1.250	SI	No Conforme
	Florfenicol		1.671	1.000	SI	
2	Sulfadiazina	Pienso para caprino	4.664	1,250	SI	No Conforme
	Trimetoprim		1.310	350	SI	
3	Tilosina	Pienso para Porcino	1.734	500	SI	No Conforme
	Doxiciclina		2.419	1.250	SI	
	Florfenicol		>10.000	1.000	SI	
4	Oxitetraciclina	Pienso para aves	488	275	SI	No Conforme
5	Amoxicilina	Pienso para porcino	10.755	2.000	SI	No Conforme
6	Amoxicilina	Pienso para porcino	6.625	2.000	SI	No Conforme
7	Oxitetraciclina	Pienso para porcino	1.543	275	SI	No Conforme
8	Oxitetraciclina	Pienso para conejo	2.195	275	SI	No Conforme
9	Oxitetraciclina	Pienso para porcino	1.780	275	SI	No Conforme
10	Epi-tetraciclina	Pienso para ovino	579	375	SI	No Conforme
	Tetraciclina		958	375	SI	No Conforme
	Epi-Clortetraciclina		493	375	SI	No Conforme
	Clortetraciclina		1.313	375	SI	No Conforme
	Sulfadiazina		>12.500	1.250	SI	No Conforme
	Trimetoprim		>3.500	350	SI	No Conforme

De las 10 muestras No conformes, 4 de ellas contenían más de un antibiótico con resultado > CC α . La familia de antibióticos que se detectó con más frecuencia fue la de tetraciclinas y en la muestra en que se detectaron tetraciclina y clortetraciclina, también se detectaron sus correspondientes 4-epímeros. En la totalidad de las muestras los analitos fueron cuantificados y confirmados, pero hubo algún com-

puesto como, florfenicol, sulfadiazina, y trimetoprim, que, en algún caso, la concentración superó el nivel superior validado (10.000, 12.500 y 3.500 µg/Kg, respectivamente) con lo que no pudo informarse un valor numérico, sino que se informó como “> de” dichos niveles de concentración. De todos los compuestos detectados, todos ellos autorizados, el único para el que no existe premezcla autorizada para la fabricación de piensos, fue para tilosina, con lo que debió tratarse de un uso fuera de las prescripciones, que requirió investigaciones adicionales por parte de los servicios de inspección.

De acuerdo a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que los piensos analizados no son medicados, se evidencia que los niveles de contaminación cruzada de los piensos superan el 1%, respecto a la dosis del pienso anterior fabricado, acordado por la Comisión Nacional de Coordinación en Materia de Alimentación Animal. Ello implica que deben tomarse medidas adicionales en lo que respecta a la limpieza de las instalaciones de fabricación de piensos o bien implementar que la fabricación de los piensos medicados se realice en una línea diferente a la de los no medicados.

Control de calidad externo para miel, huevo y pienso

El método desarrollado en estas matrices se aplicó a la realización de muestras de control de calidad externo mediante la participación en ejercicios de intercomparación.

La tabla 4.18. muestra los resultados obtenidos en los ejercicios de intercomparación en que se participó desde 2017 a 2021 para las matrices miel, huevo y pienso.

Tabla 4.18. Resultados de la participación en ejercicios de intercomparación para los métodos por LC-MS/MS en miel, huevo y pienso. Período 2017-2021.

Fecha	Organizador/Ejercicio	Matriz	Muestra	Análito	Valor asignado (µg/Kg)	Valor informado (µg/Kg)	Z-score	Valoración
2017	FAPAS/02328	MIEL	02328	Ác. Oxolínico	114,6	114,2	0,0	Satisfactoria
				Enrofloxacina	136,9	154,7	0,6	Satisfactoria
2017	FAPAS/02316	MIEL	02316	Clortetraciclina	79,9	63,3	-0,9	Satisfactoria
				4-epi-clortetraciclina	71,7	63,3	-0,5	Satisfactoria
				4-epi-clortetraciclina + clortetraciclina	130,0	126,6	-0,1	Satisfactoria
2018	PROGETTO TRIESTE/H1846	MIEL	H1846	Tilosina A	30,87	34,9	0,59	Satisfactoria
2021	FAPAS/02420	MIEL	02420	Oxitetraciclina	23,1	18,8	-0,9	Satisfactoria
2021	FAPAS/02441	MIEL	02441	Flumequina	22,5	25,8	0,7	Satisfactoria
				Ciprofloxacina	29,4	38,4	1,4	Satisfactoria
				Enrofloxacina	17,2	23,6	1,7	Satisfactoria
2018	PROGETTO TRIESTE/E1813	Huevo	E1813	Enrofloxacina	28,0	31,8	0,61	Satisfactoria
				Ciprofloxacina	69,11	69,4	0,02	Satisfactoria
2018	PROGETTO TRIESTE/E1783	Huevo	E1783	Eritromicina A	242,15	242,3	0,00	Satisfactoria
				Tilosina A	219,0	324,5	1,90	Satisfactoria
2019	PROGETTO TRIESTE/E1927	Huevo	E1927	Sulfametazina	23,88	27,0	0,53	Satisfactoria
				4-epi-clortetraciclina + Clortetraciclina	2.000	1.710	-0,82	Satisfactoria
2020	Wageningen Food Safety Research (WFSR)	PIENSO	B	4-epi-oxitetraciclina + Oxitetraciclina	2.600	1.474	-1,43	Satisfactoria
				Florfenicol	1.300	1.129	-0,41	Satisfactoria
				Tilosina A	2.000	2.317	0,38	Satisfactoria
			C	4-epi-clortetraciclina + Clortetraciclina	1.900	2.104	0,70	Satisfactoria

En todos los casos, la valoración para todos los resultados fue satisfactoria, con lo que se demuestra que los resultados obtenidos fueron comparables a los del resto de participantes, lo que es una garantía de la fiabilidad de los mismos.

5.

Conclusiones

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

5. Conclusiones

1. Los métodos desarrollados de cribado cualitativo y cuantitativo por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de alta resolución con analizador Orbitrap y los de confirmación cuantitativos por Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas de baja resolución con analizador de triple cuadrupolo cumplen con los requisitos establecidos en la legislación europea y por tanto son aplicables al control oficial de antibióticos en las matrices estudiadas.
2. Las combinaciones de solventes acuosos con acetonitrilo, en general, en medio ácido, ofrecen buenos resultados para la extracción de los antibióticos estudiados de las matrices músculo, riñón, leche, huevo y pienso.
3. La presencia de ácido etilendiaminotetracético se hace imprescindible, tanto en los solventes de extracción, como en los solventes para preparación de la muestra previa a la Extracción en Fase Sólida (en agua y miel), cuando se incluye la familia de tetraciclinas en el análisis, especialmente si se requiere llegar a límites bajos de cuantificación.
4. El método QuEChERS UNE-EN-15662 no ofrece buenos resultados en numerosos compuestos de las familias tetraciclinas, β -lactámicos, macrólidos y quinolonas lo que indica que debe ser modificado para adaptarlo a esos compuestos.
5. La utilización de fases móviles conteniendo ácido fórmico 0,1 % como fase acuosa y metanol o combinación de metanol/acetonitrilo conteniendo ácido fórmico 0,1% como fase orgánica, junto con columnas de C₁₈ de núcleo

duro, ofrece una adecuada respuesta, separación cromatográfica y simetría de pico en los métodos propuestos.

6. La utilización de patrones internos, tanto marcados isotópicamente, como compuestos análogos, y de rectas de calibrado en matriz extraída son estrategias adecuadas para corregir el efecto matriz tanto en los análisis cualitativos como cuantitativos, si bien, en ocasiones, no se corrige por completo.

7. La presencia de antibióticos como sulfadiazina en huevo, y de tilosina en pienso para porcino, demuestra que se está realizando uso de antibióticos fuera de las prescripciones, lo que requiere prestar especial atención y estos usos deben ser investigados.

8. La presencia de algunos antibióticos tanto en agua de bebida para animales como en pienso demuestra la falta de eficacia de los procesos de limpieza tanto de los bebederos de animales como de las líneas de fabricación de piensos, lo que requeriría tomar medidas adicionales.

Artículo científico

En relación con esta tesis, se ha publicado el siguiente artículo científico ya disponible *online* desde 8 noviembre de 2021:

Validation of a multi-residue UHPLC-HRMS method for antibiotics screening in milk, fresh cheese and whey.

Igualada, C., Giraldo, J., Font G., & Yusà V. *Journal of Food Composition and Analysis*, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104265>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Food Composition and Analysis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jfca

Original Research Article

Validation of a multi-residue UHPLC-HRMS method for antibiotics screening in milk, fresh cheese, and whey

Carmen Iguálada^a, Jennifer Giraldo^{b,*}, Guillermina Font^c, Vicent Yusà^a^a Public Health Laboratory of Valencia-FISABIO, Avda. de Catalunya 21, Valencia, 46020, Spain^b Institute for Animal Science and Technology, Polytechnic University of Valencia, Camino de Vera s/n., Valencia, 46022, Spain^c Faculty of Pharmacy, University of Valencia, Avda. Vicente Andrés s/n., Burjassot, 46100, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Antibiotics
Screening
Milk
Fresh cheese
Whey
UHPLC-HRMS
Orbitrap
dSPE

ABSTRACT

The aim of this study was to develop a UHPLC-HRMS methodology as a suitable tool for the screening of antibiotics in milk, fresh cheese, and whey. Compounds were analysed using an Orbitrap Exactive™ analyser working at a resolving power of 50,000 FWHM in full scan, both in positive and negative electrospray ionization mode, and a high mass accuracy (<5 ppm) and a retention time deviation of $\pm 2.5\%$ were set as identification criteria. The multiclass method was developed for the simultaneous determination of 36 substances from different antibiotic groups (β -lactams, lincosamides, macrolides, quinolones, sulfonamides, and tetracyclines) and the quantification was performed by using matrix-matched calibration curves corrected by the corresponding internal standards. Matrix effect and recovery percentages were also calculated prior to the selection of internal standard. After comparing different sample preparation procedures, a quick and easy extraction with acetate buffer at pH 5.2 and acetonitrile (20/80, v/v), followed by C18 dispersive Solid Phase Extraction (dSPE) bulk sorbent was selected. The detection capabilities (CC β s) were established at 25 % or 50 % of the Maximum Residue Limit (MRL) set in milk (no regulation for cheese and whey), and precision (repeatability and reproducibility) and trueness (recovery) were satisfactory according to Commission Decision 2002/657/EC.

1. Introduction

The benefits of antibiotic therapy in dairy animals are counteracted by the presence of residues of these substances in milk and dairy products that can be related to potential repercussions for the food safety and dairy industry. Veterinary residues in milk could promote harmful consequences for human health, causing disturbances in the intestinal flora (Jeong et al., 2009) and/or allergic reactions which can, in extreme cases, lead to anaphylaxis (Graham et al., 2014). Moreover, the use of antibiotics in livestock has largely contributed to the evolution of microorganism resistant strains with the resulting development and spread of antimicrobial resistance (AMR) which can be easily transferred to humans (Sharma et al., 2018). On the other hand, the presence of antibiotics in milk is able to generate technological failures on dairy products that require fermentative processes, like yogurt and cheese, promoting economic losses for farmers and dairies.

To protect public health, MRLs of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin have been established by Commission Regulation (EU) N° 37/2010 (EU, 2010). Although the safety

limits for antibiotic residues have been established for raw milk, there are not for dairy products, and consumers might be exposed to significant amounts of these residues, even higher than those indicated for milk in concentrated milk products like cheese (Cabizza et al., 2017; Quintanilla et al., 2019).

To ensure the safety of milk and dairy products in the EU, an integrated control system with shared responsibilities for farmers, processors, and food inspection is used. The control program for antibiotic residues in milk is usually carried out in two steps: a primary screening to detect potentially non-compliant samples and a second confirmation phase to identify the analyte present in the sample and to quantify it. In this sense, the International Dairy Federation (IDF) published the Guidance on the application of screening and confirmatory methods in integrated dairy chain management for the detection of antibiotic residues in milk (IDF, 2014).

Commission Decision 2002/657/EC (EC, 2002) provides rules for the analytical methods (routine and reference methods) to be used in the testing of official samples and specifies common criteria for the interpretation of analytical results. Moreover, the Community Reference

* Corresponding author.

E-mail addresses: iguálada_car@gva.es (C. Iguálada), jengigme@etsia.upv.es (J. Giraldo), guillermina.font@uv.es (G. Font), yusa_vic@gva.es (V. Yusà).

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104265>

Received 11 May 2021; Received in revised form 1 November 2021; Accepted 2 November 2021

Available online 8 November 2021

0889-1575/© 2021 Published by Elsevier Inc.

Bibliografía

Análisis de antibióticos en alimentos de origen animal, agua de bebida para animales y piensos por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de baja y alta resolución

Bibliografía

- Abdallah, H., Arnaudguilhem, C., Jaber, F., & Lobinski, R. (2014). Multiresidue analysis of 22 sulfonamides and their metabolites in animal tissues using quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe extraction and high resolution mass spectrometry (hybrid linear ion trap-orbitrap). *Journal of Chromatography A*, 1355, 61-72. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.078
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) (24 de noviembre 2021). Recuperado de <http://www.aesan.gob.es/>
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) (24 de noviembre de 2021). Recuperado de <http://www.aemps.gob.es>
- Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (24 de noviembre 2021). Recuperado de <https://www.efsa.europa/eu>
- Alechaga, E., Moyano, E., & Galceran, M. T. (2013). Atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry of the phenicol drug family. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(11), 1241-1251.
- Aguilera-Luiz, M. M., Vidal, J. L. M., Romero-González, R., & Frenich, A. G. (2008). Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1205(1), 10-16.

- Albero, B., Tadeo, J. L., Perez, R. A., Albero, B., Tadeo, J. L., Delgado, M. d. M., Pérez, R. A. (2019a). Analysis of multiclass antibiotics in lettuce by liquid Chromatography–Tandem mass spectrometry to monitor their plant up-take. *Molecules*, *24*, 4066. Basel, Switzerland: Molecular Diversity Preservation International. doi:10.3390/molecules24224066
- Albero, B., Tadeo, J. L., Perez, R. A., Albero, B., Tadeo, J. L., Miguel, E., & Pérez, R. A. (2019b). Rapid determination of antibiotic residues in cereals by liquid chromatography triple mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*, 6129-6139. Heidelberg: Springer-Verlag. doi:10.1007/s00216-019-02003-w
- Amelin, V. G., Bol'shakov, D. S., Podkolzin, I. V., Amelin, V. G., Bol'shakov, D. S., & Podkolzin, I. V. (2020). Rapid screening and determination of residual amounts of β -lactam antibiotics in foods by ultrahigh-performance liquid Chromatography–High-resolution quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, *75*(9), 1177-1188. doi:10.1134/S1061934820070023
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, *86*(2), 412-431.
- Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, *49*(7), 1041-1044.
- Antignac, J., de Wasch, K., Monteau, F., De Brabander, H., Andre, F., & Le Bizec, B. (2005). The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–

- mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta*, 529(1–2), 129-136. doi://doi.org/10.1016/j.aca.2004.08.055
- Bedale, W. A. (2019). Veterinary drug residues in foods of animal origin. En Frans J.M. Smulders, Ivonne M.C.M. Rietjens, Martin D. Rose (Eds). *Chemical Hazards in Foods of Animal Origin*, vol 7, (p 51). Wageningen Academic Publishers.
- Berendsen, B. J. A., Gerritsen, H. W., Wegh, R. S., Lameris, S. L., Sebille, v., R, Stolker, A. A. M., & Nielen, M. W. F. (2013). Comprehensive analysis of B-lactam antibiotics including penicillins, cephalosporins and carbapenems in poultry muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(24), 7859-7874.
- Berendsen, B. J., Essers, M. L., & Nielen, M. W. (2011). Quantitative trace analysis of eight chloramphenicol isomers in urine by chiral liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(41), 7331-7340.
- Bernal, J., Nozal, M. J., Jiménez, J. J., Martín, M. T., & Sanz, E. (2009). A new and simple method to determine trace levels of sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(43), 7275-7280. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.046
- Beyene, T. (2016). Veterinary drug residues in food-animal products: Its risk factors and potential effects on public health. *J Vet Sci Technol*, 7(1), 1-7.

- Bian, H., Qin, Y., Yu, C., Zhang, K., Wang, C., Lin, Y., Ge, Y. (2019). Simultaneous determination of 120 veterinary antibiotics in meat by combined pretreatment system coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 37(2), 162-176. doi:10.3724/SP.J.1123.2018.10003
- Bladek, T., Szymanek-Bany, I., Posyniak, A., Bladek, T., Szymanek-Bany, I., & Posyniak, A. (2020). Determination of polypeptide antibiotic residues in food of animal origin by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Molecules*, 25, 3261. Basel, Switzerland: Molecular Diversity Preservation International. doi:10.3390/molecules25143261
- Blasco, C., Corcia, A. D., & Picó, Y. (2009). Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 116(4), 1005-1012. doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.055
- Blasco, C., Masiá, A., Morillas, F. G., & Picó, Y. (2011). Comparison of the effectiveness of recent extraction procedures for antibiotic residues in bovine muscle tissues. *Journal of AOAC International*, 94(3), 991-1003. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21797029>
- Bohm, D. A., Stachel, C. S., & Gowik, P. (2012). Validation of a multi-residue method for the determination of several antibiotic groups in honey by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(10), 2943-2953. doi:10.1007/s00216-012-5868-z

- Bohm, D. A., Stachel, C. S., Hackenberg, R., & Gowik, P. (2011). Preparation and characterisation of in-house reference material of tylosin in honey and results of a proficiency test. *Analytica Chimica Acta*, 700(1), 58-62. 10.1016/j.aca.2011.01.058
- Boison, J. O., Lee, S., & Matus, J. (2015). A multi-residue method for the determination of seven polypeptide drug residues in chicken muscle tissues by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(14), 4065-4078.
- Boix, C., Ibáñez, M., Sancho, J. V., León, N., Yusa, V., & Hernández, F. (2014). Qualitative screening of 116 veterinary drugs in feed by liquid chromatography-high resolution mass spectrometry: Potential application to quantitative analysis. *Food Chemistry*, 160, 313-320.
- Chemicalize (22 de noviembre 2021). Recuperado de:
<https://www.chemicalize.com>
- Chen, Y., & Schwack, W. (2013). Planar chromatography mediated screening of tetracycline and fluoroquinolone antibiotics in milk by fluorescence and mass selective detection. *Journal of Chromatography A*, 1312, 143-151. doi://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.09.006
- Chico, J., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R., Prat, M. D., & Granados, M. (2008). High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1213(2), 189-199. //doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.023

- Chiesa, L., Nobile, M., Arioli, F., Britti, D., Trutic, N., Pavlovic, R., & Panseri, S. (2015). Determination of veterinary antibiotics in bovine urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *185*, 7-15. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.098>
- Chiesa, L., Panseri, S., Pasquale, E., Malandra, R., Pavlovic, R., & Arioli, F. (2018). Validated multiclass targeted determination of antibiotics in fish with high performance liquid chromatography–benchtop quadrupole orbitrap hybrid mass spectrometry. *Food Chemistry*, *258*, 222-230. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.072>
- Chin, C., Zhang, Z. P., & Karnes, H. T. (2004). A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *35*(5), 1149-1167.
- Choi, B. K., Hercules, D. M., & Gusev, A. I. (2001). LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, *369*(3), 370-377.
- Comisión Nacional de Coordinación en Materia de Alimentación Animal. (2014). Acuerdo de la comisión nacional de coordinación en materia de alimentación animal sobre aceptabilidad de los autocontroles de homogeneidad y contaminaciones cruzadas realizados por los fabricantes de piensos y premezclas. *PDOC-CNAA 3/2014*. Recuperado de <http://www.mapa.gob.es>
- Community Reference Laboratories (CRLs). (2010). *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. (Initial validation and transfer)*. Community Reference Laboratories Residues

- (CRLs). 2010. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cs_vet-med-residues_guideline_validation_screening_en.pdf
- Cortéjade, A., Kiss, A., Cren, C., Vulliet, E., & Buleté, A. (2016). Development of an analytical method for the targeted screening and multi-residue quantification of environmental contaminants in urine by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry for evaluation of human exposures. *Talanta*, 146, 694-706 <https://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.038>
- Coscollà, C., León, N., Pastor, A., & Yusà, V. (2014). Combined target and post-run target strategy for a comprehensive analysis of pesticides in ambient air using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1368, 132-142. [//dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.067](https://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.067)
- Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. (2015). Multianalyte method for the determination of pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(15), 4229-4245. doi:10.1007/s00216-015-8654-x
- De Carlo, R. M., Rivoira, L., Ciofi, L., Ancillotti, C., Checchini, L., Del Bubba, M., & Bruzzoniti, M. C. (2015). Evaluation of different QuEChERS procedures for the recovery of selected drugs and herbicides from soil using LC coupled with UV and pulsed amperometry for their detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(4), 1217-1229. doi:10.1007/s00216-014-8339-x

Decheng, S., Peilong, W., Yang, L., Ruiguo, W., Shulin, W., Zhiming, X., & Su, Z. (2018). Simultaneous determination of antibiotics and amantadines in animal-derived feedstuffs by ultraperformance liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, *1095*, 183-190. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.07.025>

Decisión de la Comisión, 2002/657/CE (2002) de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la directiva 96/23/CE en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE L221 (2002), 8-36.

Desmarchelier, A., Fan, K., Minh Tien, M., Savoy, M., Tarres, A., Fuger, D., Mottier, P. (2018). Determination of 105 antibiotic, anti-inflammatory, antiparasitic agents and tranquilizers by LC-MS/MS based on an acidic QuEChERS-like extraction. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, *35*(4), 647-661. doi:10.1080/19440049.2018.1429677

Di Rocco, M., Moloney, M., O'Beirne, T., Earley, S., Berendsen, B., Furey, A., & Danaher, M. (2017). Development and validation of a quantitative confirmatory method for 30 β -lactam antibiotics in bovine muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1500*, 121-135. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.04.022>

Directiva del Consejo 81/602/CEE, de 31 de julio de 1981, referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y de sustancias de efecto tireostático. DOCE. L222 (1981) 32-33, (1981).

Directiva del Consejo 85/358/CEE, de 16 de julio de 1985, por la que se complementa la directiva 81/602/CEE, referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático. DOCE. L191 (1985) 46-49, (1985).

Directiva del Consejo 85/649/CEE, de 31 de diciembre de 1985, por la que se prohíbe la utilización de ciertas sustancias de efecto hormonal en el sector animal. DOCE. L382 (1985) 228-231, (1985).

Directiva del Consejo 88/146/CEE, de 7 de marzo de 1988, por la que se prohíbe la utilización de ciertas sustancias de efecto hormonal en el sector animal. DOCE. L70 (1988) 16-18,

Directiva del Consejo 88/299/CEE, de 17 de mayo de 1988, relativa al intercambio de animales tratados con determinadas sustancias de efecto hormonal y su carne, contemplados en el artículo 7 de la directiva 88/146/CEE. DOCE L128. 36-38.

Directiva del Consejo 96/22/CE, de 26 de abril de 1996, por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tireostático y sustancias beta-agonistas en la cría de ganado, y por la que se derogan las directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE. DOCE L125 (1996) 3-9.

Directiva del Consejo 96/23/CE, de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. DOCE L125 (1996)10-32.

Dmitrovic, J., & Durden, D. (2013). Analysis of fumagillin in honey by LC-MS/MS. *Journal of AOAC International*, 96(3), 687-695. doi:10.5740/jaoacint.12-174

Domínguez Rodríguez, L., Moreno Romo, M. Á, Porrero Calonge, M. C., & Peña, S. T. (2010). Uso prudente de antimicrobianos y propuestas de mejora en veterinaria. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 28, 40-44. doi:10.1016/S0213-005X(10)70042-2. Recuperado de <https://www.clinicalkey.es/playcontent/1-s2.0-S0213005X10700422>

El Hawari, K., Mokh, S., Verdon, E., El Hawari, K., Mokh, S., Doumyati, S., Verdon, E. (2017). Development and validation of a multiclass method for the determination of antibiotic residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: PART A*, 34(4), 582-597. London : Taylor & Francis. doi:10.1080/19440049.2016.1232491

European Medicines Agency (EMA). (24 de noviembre 2021). Recuperado de <http://www.ema.europa.eu/ema/>

Fagerquist, C. K., Lightfield, A. R., & Lehotay, S. J. (2005). Confirmatory and Quantitative Analysis of β -Lactam Antibiotics in Bovine Kidney Tissue by Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry (Washington)*, 77(5), 1473-1482.

Ferrer, C., Lozano, A., Agera, A., Girn, A. J., & Fernández-Alba, A. R. (2011). Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods

- for fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7634-7639.
- Filigenzi, M. S., Ehrke, N., Aston, L. S., & Poppenga, R. H. (2011). Evaluation of a rapid screening method for chemical contaminants of concern in four food-related matrices using QuEChERS extraction, UHPLC and high resolution mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants—Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 28(10), 1324-1339.
- Freitas, A., Barbosa, J., & Ramos, F. (2014). Multi-residue and multi-class method for the determination of antibiotics in bovine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Meat Science*, 98(1), 58-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.04.003>
- Freitas, L. G., Götz, C. W., Ruff, M., Singer, H. P., & Müller, S. R. (2004). Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1028(2), 277-286. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.11.094>
- Freitas, S. K. B., Paim, A. P. S., & de Souza e Silva, Paula Tereza. (2013). Development of a LC-IT-TOF MS procedure to quantify veterinary drug residues in milk employing a QuEChERS approach. *Food Analytical Methods*, 7(1), 39-46. doi:[10.1007/s12161-013-9595-7](https://doi.org/10.1007/s12161-013-9595-7)

- Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., & Lehane, M. (2013). Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta*, *115*, 104-122. doi:10.1016/j.talanta.2013.03.048
- Garrido Frenich, A., Aguilera-Luiz, M. d. M., Martínez Vidal, J. L., & Romero-González, R. (2010). Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *661*(2), 150-160. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.016>
- Gaspar, A. F., Santos, L., Rosa, J., Leston, S., Barbosa, J., Vila Pouca, A. S., . . . Ramos, F. (2019). Development and validation of a multi-residue and multi-class screening method of 44 antibiotics in salmon (*salmo salar*) using ultra-high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry: Application to farmed salmon. *Journal of Chromatography B*, *1118-1119*, 78-84. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.04.038>
- Gaugain-Juhel, M., Delépine, B., Gautier, S., Fourmond, M. P., Gaudin, V., Hurtaud-Pessel, D., . . . Sanders, P. (2009). Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: A qualitative approach. *Food Additives and Contaminants–Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *26*(11), 1459-1471. doi:10.1080/02652030903150575
- Gentili, A., Perret, D., & Marchese, S. (2005). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *24*(7), 704-733. [//dx.doi.org/10.1016/j.trac.2005.02.007](https://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2005.02.007)

- George, K., Vincent, U., & von Holst, C. (2013). Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1293, 60-74.
- Gómez-Pérez, M. L., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J. L., & Garrido-Frenich, A. (2012). Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1248, 130-138.
- Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Martínez Vidal, J. L., & Garrido Frenich, A. (2015a). Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: Comparison between time-of-flight and orbitrap. *Food Additives and Contaminants–Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, doi:10.1080/19440049.2015.1023742
- Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Martinez-Vidal, J. L., & Garrido-Frenich, A. G. (2015b). Identification of transformation products of pesticides and veterinary drugs in food and related matrices: Use of retrospective analysis. *Journal of Chromatography A*, 1389, 133-138. doi:10.1016/j.chroma.2015.02.052
- Gómez-Pérez, M., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J.L., & Garrido-Frenich, A. (2015c). Analysis of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to orbitrap high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 131, 1-7. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.066

- Gómez-Pérez, M. L., Romero-González, R., Plaza-Bolaños, P., Génin, E., Vidal, J. L. M., & Frenich, A. G. (2014). Wide-scope analysis of pesticide and veterinary drug residues in meat matrices by high resolution MS: Detection and identification using exactive-orbitrap. *Journal of Mass Spectrometry*, *49*(1), 27-36.
- Guidi, L. R., Tette, P. A. S., Fernandes, C., Silva, L. H. M., & Gloria, M. B. A. (2017). Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food. *Talanta*, *162*, 324-338. doi:10.1016/j.talanta.2016.09.068
- Hammel, Y., Mohamed, R., Gremaud, E., LeBreton, M., & Guy, P. A. (2008). Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1177*(1), 58-76. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.112
- Harrabi, M., Aloulou, F., Rodriguez-Mozaz, S., Verela, S., & Elluech, B. (2018). Rapid analysis of antibiotic residues in urban wastewater of south sfax WWTP by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Recent advances in environmental science from the euro-mediterranean and surrounding regions* (pp. 1131-1133). Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-70548-4_327 Recuperado de http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-70548-4_327
- Hird, S. J., Lau, B. P., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2014). Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *59*, 59-72. doi://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.04.005

- Holstege, D. M., Puschner, B., Whitehead, G., & Galey, F. D. (2002). Screening and Mass Spectral Confirmation of β -Lactam Antibiotic Residues in Milk Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(2), 406-411. 10.1021/jf010994s
- Hou, X., Xu, X., Xu, X., Han, M., & Qiu, S. (2020). Application of a multiclass screening method for veterinary drugs and pesticides using HPLC-QTOF-MS in egg samples. *Food Chemistry*, *309*, 125746. 10.1016/j.foodchem.2019.125746
- Hu, F., Bian, K., Liu, Y., Su, Y., Zhou, T., Song, X., & He, L. (2014). Development of a modified QUick, easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method for the determination of multi-class antimicrobials in vegetables by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1368*, 52-63. doi://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.074
- Hu, M., Ben, Y. J., Zheng, C. M., Hu, M., Ben, Y., Wong, M. H., & Zheng, C. (2021). *Trace Analysis of Multiclass Antibiotics in Food Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Method Development*. American Chemical Society, Books and Journals Division. 10.1021/acs.jafc.0c05778
- Hurtaud-Pessel, D., Jagadeshwar-Reddy, T., & Verdon, E. (2011). Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-orbitrap instrument. *Food Additives and Contaminants—Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *28*(10), 1340-1351.

- Ibrahim, M., Ahmad, F., Yaqub, B., Ramzan, A., Imran, A., Afzaal, M., Akram, Q. (2020). Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. En Muhammed Zaffar Hashmi (Ed.). *Antibiotics and antimicrobial resistance genes in the environment*. Vol. 1 en Advances in Environmental Pollution Research Series. Chapter 4 (pp. 39-69) Elsevier.
- Igualada, C., Giraldo, J., Font G., & Yusà V. (2021). Validation of a multi-residue UHPLC-HRMS method for antibiotics screening in milk, fresh cheese and whey. *Journal of Food Composition and Analysis*. Disponible online desde 8 de noviembre 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104265>
- Jank, L., Martins, M. T., Arsand, J. B., Motta, T. M. C., Feijó, T. C., dos Santos Castilhos, T., Pizzolato, T. M. (2017). Liquid Chromatography–Tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: Development and validation. *Food Analytical Methods*, 10(7), 2152-2164. doi:10.1007/s12161-016-0755-4
- Jia, W., Chu, X., Ling, Y., Huang, J., & Chang, J. (2014). High-throughput screening of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1347, 122-128.
- Jiménez, V., Rubies, A., Centrich, F., Companyó, R., & Guiteras, J. (2011). Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(11), 1443-1451. doi://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.021

- Jin, H., Kumar, A. P., Paik, D., Ha, K., Yoo, Y., & Lee, Y. (2010). Trace analysis of tetracycline antibiotics in human urine using UPLC–QToF mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 94(2), 139-147. doi:10.1016/j.microc.2009.10.010
- Jin, Y., Zhang, J., Zhao, W., Zhang, W., Wang, L., Zhou, J., & Li, Y. (2017). Development and validation of a multiclass method for the quantification of veterinary drug residues in honey and royal jelly by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 221, 1298-1307. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.026
- Joint FAO/WHO (1985). Residues of Veterinary drugs in foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 29 october-5 november, 1984. Serie FAO food and nutrition paper. Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (pp. 11-21).
- Kaklamanos, G., Vincent, U., & Von Holst, C. (2013). Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1293, 60-74.
- Kanda, M., Sasamoto, T., Takeba, K., Hayashi Hiroshi, Kusano, T., Matshushima, Y., Takano, I. (2011). Rapid determination of fumagillin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using the QuEChERS method. *Journal of AOAC International*, 94(3), 878-885. doi:10.1093/jaoac/94.3.878
- Kang, J. W., Park, S., Park, H., Hossain, M. A., Kim, M., Son, S., & Cho, B. (2017). Multiresidue screening of veterinary drugs in meat, milk, egg, and fish using liquid chromatography coupled with ion trap time-of-flight mass

spectrometry. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(2), 635-652. doi:10.1007/s12010-016-2350-y

Kaufmann, A. (2014). Combining UHPLC and high-resolution MS: A viable approach for the analysis of complex samples? *TrAC–Trends in Analytical Chemistry*, 63, 113-128. doi:10.1016/j.trac.2014.06.025

Kaufmann, A., Butcher, P., & Maden, K. (2012a). Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Analytica Chimica Acta*, 711, 46-53. doi://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.10.042

Kaufmann, A., Butcher, P., & Maden, K. (2012b). Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Analytica Chimica Acta*, 711, 46-53. doi:10.1016/j.aca.2011.10.042

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2010). Comprehensive comparison of liquid chromatography selectivity as provided by two types of liquid chromatography detectors (high resolution mass spectrometry and tandem mass spectrometry: “Where is the crossover point?”). *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 60-72.

Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2011a). Quantitative and confirmative performance of liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry compared to tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(7), 979-992.

- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2011b). Semi-targeted residue screening in complex matrices with liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: Current possibilities and limitations. *Analyst*, *136*(9), 1898-1909.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2014). Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*, *820*, 56-68.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2015). Reliability of veterinary drug residue confirmation: High resolution mass spectrometry versus tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *856*, 54-67. doi:10.1016/j.aca.2014.11.034
- Kaufmann, A., & Walker, S. (2013). Post-run target screening strategy for ultra high performance liquid chromatography coupled to orbitrap based veterinary drug residue analysis in animal urine. *Journal of Chromatography A*, *1292*, 104-110.
- Kaufmann, A., & Widmer, M. (2013). Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *797*, 81; 81-88; 88.
- Kaufmann, A., Widmer, M., & Maden, K. (2010). Post-interface signal suppression, a phenomenon observed in a single-stage orbitrap mass spectrometer coupled to an electrospray interfaced liquid chromatograph. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *24*(14), 2162-2170. doi:10.1002/rcm.4615

- Kellmann, M., Muenster, H., Zomer, P., & Mol, H. (2009). Full scan MS in comprehensive qualitative and quantitative residue analysis in food and feed matrices: How much resolving power is required? *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 20(8), 1464-1476. doi://dx.doi.org/10.1016/j.jasms.2009.05.010
- Khaled, A., Belinato, J. R., & Pawliszyn, J. (2020). Rapid and high-throughput screening of multi-residue pharmaceutical drugs in bovine tissue using solid phase microextraction and direct analysis in real time-tandem mass spectrometry (SPME-DART-MS/MS). *Talanta*, 217, 121095.
- Knolhoff, A. M., Callahan, J. H., & Croley, T. R. (2014). Mass accuracy and isotopic abundance measurements for HR-MS instrumentation: Capabilities for non-targeted analyses. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 25(7), 1285-1294. doi:10.1007/s13361-014-0880-5
- Lees, P., Pelligand, L., Giraud, E., & Toutain, P. (2021). A history of antimicrobial drugs in animals: Evolution and revolution. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(2), 137-171. doi:10.1111/jvp.12895
- Lefevre, S., Bois-Maublanc, J., Hocqueloux, L., Bret, L., Francia, T., Eleout-Da violante, C., & Got, L. (2017). A simple ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry assay for the simultaneous quantification of 15 antibiotics in plasma. *Journal of Chromatography B*, 1065-1066, 50-58. doi:https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.014
- Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., Nuñez, A., Dutko, T., Ng C., & Bluhm, L. (2013). Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1313, 103-112. doi://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.103
- Lehotay, S. J., Sapozhnikova, Y., & Mol, H. G. (2015). Current issues involving screening and identification of chemical contaminants in foods by mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 69, 62-75.
- León, N., Roca, M., Igualada, C., Martins, C. P. B., Pastor, A., & Yusà, V. (2012). Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1258, 55-65.
- León, N., Pastor, A., & Yusà, V. (2016). Target analysis and retrospective screening of veterinary drugs, ergot alkaloids, plant toxins and other undesirable substances in feed using liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Talanta*, 149, 43-52. //dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.11.032
- Li, Y., Chen, Z., Wen, S., Hou, X., Zhang, R., & Ma, M. (2018). Multiresidue determination of antibiotics in preserved eggs using a QuEChERS-based procedure by ultrahigh-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Acta Chromatographica*, 30(1), 9-16. 10.1556/1326.2017.29211
- Lopez, M. I., Pettis, J. S., Smith, I. B., & Chu, P. (2008). Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1553-1559. doi:10.1021/jf073236w

- Lou, X., Tang, Y., Fang, C., Kong, C., Yu, H., Shi, Y., . . . Xiao, D. (2020). Simultaneous determination of ten aminoglycoside antibiotics in aquatic feeds by high-performance liquid chromatography quadrupole-orbitrap mass spectrometry with pass-through cleanup. *Chirality*, *32*(3), 324-333. doi:<https://doi.org/10.1002/chir.23159>
- Louppis, A. P., Kontominas, M. G., & Papastephanou, C. (2017). Determination of antibiotic residues in honey by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, *10*(10), 3385-3397. doi:[10.1007/s12161-017-0899-x](https://doi.org/10.1007/s12161-017-0899-x)
- Lu, Z., Deng, F., He, R., Tan, L., Luo, X., Pan, X., & Yang, Z. (2019). A pass-through solid-phase extraction clean-up method for the determination of 11 quinolone antibiotics in chicken meat and egg samples using ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, *151*, 104213. doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104213>
- Lucatello, L., Cagnardi, P., Capolongo, F., Ferraresi, C., Bernardi, F., & Montessisa, C. (2015). Development and validation of an LC-MS/MS/MS method for the quantification of fluoroquinolones in several matrices from treated turkeys. *Food Control*, *48*, 2-11. doi:[dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.011](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.011)
- Magalhaes, D., Freitas, A., Vila Pouca, A.S. & Barbosa, J. (2020). The use of ultra-high-pressure-liquid-chromatography tandem time-of-flight mass spectrometry as a confirmatory method in drug residue analysis: Application to the determination of antibiotics in piglet liver. *Journal of Chromatography B*, *1153*(122264), 1-7.

- Manini, P., Andreoli, R., & Niessen, W. M. A. (2004). Liquid chromatography–mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *Journal of Chromatography A*, 1058(1–2), 21-37. doi://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.104
- Martínez-Martínez, L., & Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28(supl 4), 4-9.
- Martínez Vidal, J. L., Aguilera-Luiz, M., Romero-González, R., & Frenich, A. G. (2009). Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1760-1767. 10.1021/jf8034572
- Martos, P. A., Jayasundara, F., Dolbeer, J., Jin, W., Spilsbury, L., Mitchell, M., Shurmer, B. (2010). Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5932-5944. doi:10.1021/jf903838f
- Mastovska, K., & Lightfield, A. R. (2008). Streamlining methodology for the multiresidue analysis of β -lactam antibiotics in bovine kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1202(2), 118-123.
- Mol, H. G. J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T. C., Stolker, A. A. M., & Mulder, P. P. J. (2008). Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs

in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry*, 80(24), 9450-9459.
doi:10.1021/ac801557f

Mompelat, S., Fourmond, M., Laurentie, M., Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D., & Abjean, J. (2015). Validation of a liquid chromatography–high-resolution mass spectrometry method for the analysis of ceftiofur in poultry muscle, kidneys and plasma: A unique accuracy profile for each and every matrix. *Journal of Chromatography A*, 1407, 119-129. doi://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.06.043

Moragues, F. & Igualada, C. (2009). How to decrease ion suppression in a multiresidue determination of β -agonists in animal liver and urine by liquid chromatography–mass spectrometry with ion-trap detector. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 193-195. //doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.065

Moragues, F., Igualada, C., & León, N. (2016). Confirmatory method for the determination of amphenicols in muscle and kidney of several animal species. *Food Analytical Methods*, 10(3), 610-617. doi:10.1007/s12161-016-0623-2

Moretti, S., Cruciani, G., Romanelli, S., Rossi, R., & Saluti, G. (2016a). Multiclass method for the determination of 62 antibiotics in milk. *Journal of Mass Spectrometry*, 51(9), 792; 792-804; 804.

Moretti, S., Dusi, G., Giusepponi, D., Pellicciotti, S., Rossi, R., Saluti, G., . . . Galarini, R. (2016b). Screening and confirmatory method for multiclass determination of 62 antibiotics in meat. *Journal of Chromatography A*, 1429, 175-188. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.021

- Mortier, K. A., Verstraete, A. G., Zhang, G., & Lambert, W. E. (2004). Enhanced method performance due to a shorter chromatographic run-time in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for paclitaxel. *Journal of Chromatography A*, 1041(1–2), 235–238. doi://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.04.026
- Ninga, E., Sapozhnikova, Y., Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., & Monteiro, S. H. (2020). High-throughput mega-method for the analysis of pesticides, veterinary drugs, and environmental contaminants by ultra-high-performance liquid Chromatography–Tandem mass spectrometry and robotic mini-solid-phase extraction cleanup low-pressure gas Chromatography–Tandem mass spectrometry, part 2: Catfish. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(4), 1169–1174.
- Nozal, M. a. J., Bernal, J. L., Martín, M. a. T., Bernal, J., Álvaro, A., Martín, R., & Higes, M. (2008). Trace analysis of fumagillin in honey by liquid chromatography–diode array–electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1190(1), 224–231. Oka, H., Ito, Y., & Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882(1–2), 109–133. 10.1016/S0021-9673(99)01316-3
- Oka, H., Ito, Y., & Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882(1–2), 109–133. 10.1016/S0021-9673(99)01316-3
- Oka, H., Ikai, Y., Ito, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Suzuki, M., Odani, H., & Maeda, K. (1997). Improvement of chemical analysis of antibiotics. XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray

high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography.B, Biomedical Sciences and Applications*, 693(2), 337-344.

Oka, H., Ito, Y., Ikai, Y., Kagami, T., & Ken-ichi Harada. (1998). Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 812(1-2), 309-319. //dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(97)01278-8

Oliveira, N. A., Gonçalves, B. L., Lee, S., Oliveira, C., & Corassin, C. H. (2020). Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology*, 6(01), 40-47.

Orso, D., Floriano, L., Ribeiro, L. C., Bandeira, N. M. G., Prestes, O. D., & Zanella, R. (2015). Simultaneous determination of multiclass pesticides and antibiotics in honey samples based on ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 9(6), 1638-1653. doi:10.1007/s12161-015-0339-8

Ortelli, D., Spörri, A. S., & Edder, P. (2018). Veterinary drug residue in food of animal origin in Switzerland: A health concern? *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 72(10), 713-717.

Ouma, J., Gachanja, A., Mugo, S., & Gikunju, J. (2021). Antibiotic residues in milk from juja and githurai markets in Kenya by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemistry Africa*. The Tunisian Chemical Society and Springer Nature Switzerland AG 2021. <https://doi.org/10.1007/s42250-021-00269-1>.

- Oyedeji, A. O., Msagati, T. A. M., Williams, A. B., & Benson, N. U. (2019). Determination of antibiotic residues in frozen poultry by a solid-phase dispersion method using liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Toxicology Reports*, 6, 951-956. doi:<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.09.005>
- Palma, E., Tilocca, B., & Roncada, P. (2020). Antimicrobial resistance in veterinary medicine: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1914.
- Paoletti, F., Sdogati, S., Barola, C., Giusepponi, D., Moretti, S., & Galarini, R. (2021). Development and validation of a multiclass confirmatory method for the determination of over 60 antibiotics in eggs using liquid-chromatography high-resolution mass spectrometry. *Food Control*, 127, 108109. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108109>
- Pastor-Belda, M., Campillo, N., Arroyo-Manzanares, N., Hernández-Córdoba, M., & Viñas, P. (2020). Determination of amphenicol antibiotics and their glucuronide metabolites in urine samples using liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1146, 122122. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122122>
- Patyra, E., & Kwiatek, K. (2017). Development and validation of multi-residue analysis for tetracycline antibiotics in feed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Food additives and Contaminants: PART A*, 34 (9), 15553-1561. doi:[10.1080/19440049.2017.1364430](https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1364430)
- Peters, R. J. B., Bolck, Y. J. C., Rutgers, P., Stolker, A. A. M., & Nielen, M. W. F. (2009). Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat

using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8206-8216.

R.D. 1945/1983, Real Decreto 1945/1983, de 22 de junio, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agro-alimentaria. BOE nº 168 (1983) 19830-19835.

RD. 1749/1998, 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 (1998) 26910-26927.

Rana, M. S., Lee, S. Y., Kang, H. J., & Hur, S. J. (2019). Reducing veterinary drug residues in animal products: A review. *Food Science of Animal Resources*, 39(5), 687-703.

Real Decreto legislativo 1/2015, de 24 de julio, por el que se aprueba el texto refundido de la ley de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE 177 (2015) 62935-63030, Real Decreto Legislativo (2015). Recuperado de <https://www.boe.es/eli/es/rdlg/2015/07/24/1/con>

Reglamento (CE) nº 470/2009 del Parlamento Europeo y del consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios de fijación de límites máximos de residuos de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el reglamento (CEE) nº 2377/90 del consejo y se modifican la directiva 2001/82/CEE del parlamento europeo y del consejo y el reglamento (CE) nº 726/2004 del parlamento europeo y del consejo. DOCE L152 (2009) 11-22.

Reglamento (CEE) nº 2377/90 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. DOCE L224 (1990) 1-8.

Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión, de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en productos alimenticios de origen animal. DOUE L15 (2010) 1-72.

Reglamento de ejecución (UE) 2021/808 de la Comisión. (2021) de 22 de marzo de 2021, relativo al funcionamiento de los métodos analíticos para los residuos de sustancias farmacológicamente activas utilizadas en animales productores de alimentos y a la interpretación de resultados, así como a los métodos que deben utilizarse para el muestreo y por el que se derogan las Decisiones 200/657/CE y 98/179/CE. DOUE L 180 (2021) 84-109.

Reglamento (CE) nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. OJ L 268, 18.10.2003, p. 29-43,

Reglamento (UE) 2017/880 de la Comisión por el que se establecen normas sobre el uso de un límite máximo de residuos establecido para una sustancia farmacológicamente activa en un producto alimenticio determinado para otro producto alimenticio derivado de la misma especie y de un límite máximo de residuos establecido para una sustancia farmacológicamente activa de una o más especies para otras especies, con arreglo al reglamento (CE) nº 470/2009. DOUE L 135. 24.5.2017, (2017).

- Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo a los controles y otras actividades oficiales realizados para garantizar la aplicación de la legislación sobre alimentos y piensos, y sobre las normas sobre salud y bienestar de los animales, sanidad vegetal y productos fitosanitarios. OJ L 95, 7.4.2017, p. 1–142,
- Rejczak, T., & Tuzimski, T. (2015). A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, *13*(1), 980-1010. doi:10.1515/chem-2015-0109
- Reybroeck, W., Daeseleire, E., De Brabander, H. F., & Herman, L. (2012). Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary Microbiology*, *158*(1-2), 1-11. 10.1016/j.vetmic.2012.01.012
- Roca, M., Leon, N., Pastor, A., & Yusà, V. (2014). Comprehensive analytical strategy for biomonitoring of pesticides in urine by liquid chromatography–orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1374*, 66-76. //dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.010
- Rocha, D. G., Santos, F. A., da Silva, Júlio César C, Augusti, R., & Faria, A. F. (2015). Multiresidue determination of fluoroquinolones in poultry muscle and kidney according to the regulation 2002/657/EC. A systematic comparison of two different approaches: Liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry or tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1379*, 83-91. doi:10.1016/j.chroma.2014.12.058
- Rossi, R., Saluti, G., Moretti, S., Diamanti, I., Giusepponi, D., & Galarini, R. (2018). Multiclass methods for the analysis of antibiotic residues in milk by liquid chromatography coupled to mass spectrometry: A review. *Food*

- additives and Contaminants: PART A, 35 (2), 241-257. doi:10.1080/19440049.2017.1393107
- Rúbies, A., Antkowiak, S., Granados, M., Companyó, R., & Centrich, F. (2015). Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples. *Food Chemistry*, 181, 57-63. 10.1016/j.foodchem.2015.02.067
- Shaaban, H., & Górecki, T. (2012). Fast ultrahigh performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of 25 emerging contaminants in surface water and wastewater samples using superficially porous sub-3 μm particles as an alternative to fully porous sub-2 μm particles. *Talanta*, 100, 80-89. //dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.010
- Schneider, M. J., Lehotay, S. J., & Lightfield, A. R. (2012). Evaluation of a multi-class, multi-residue liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for analysis of 120 veterinary drugs in bovine kidney. *Drug Testing and Analysis*, 4(S1), 91-102. doi:10.1002/dta.1359
- Senta, I., Krizman-Matasic, I., Terzic, S., & Ahel, M. (2017). Comprehensive determination of macrolide antibiotics, their synthesis intermediates and transformation products in wastewater effluents and ambient waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1509, 60-68. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.06.005
- Smith, S., Gieseke, C., Reimschuessel, R., Decker, C., & Carson, M. C. (2009). Simultaneous screening and confirmation of multiple classes of drug residues in fish by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8224-8232. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.06.077

- Sollic, M., Roy-Lachapelle, A., & Sauvé, S. (2015). Quantitative performance of liquid chromatography coupled to Q-exactive high resolution mass spectrometry (HRMS) for the analysis of tetracyclines in a complex matrix. *Analytica Chimica Acta*, 853(1), 415-424. doi:10.1016/j.aca.2014.10.037
- Song, X., Huang, Q., Zhang, Y., Zhang, M., Xie, J., & He, L. (2019). Rapid multi-residue analysis of authorized/banned cyclopolypeptide antibiotics in feed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on dispersive solid-phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 170, 234-242. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.03.050
- Spisso, B. F., de Araújo Júnior, Marcus Antônio Gonçalves, Monteiro, M. A., Lima, A. M. B., Pereira, M. U., Luiz, R. A., & Nóbrega, A. W. d. (2009). A liquid chromatography–tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto–enol tautomerism and epimerization phenomena. *Analytica Chimica Acta*, 656(1), 72-84. doi:10.1016/j.aca.2009.10.012
- Steiner, D., Sulyok, M., Malachová, A., Mueller, A., & Krska, R. (2020). Realizing the simultaneous liquid chromatography-tandem mass spectrometry based quantification of >1200 biotoxins, pesticides and veterinary drugs in complex feed. *Journal of Chromatography A*, 1629, 461502. doi:https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461502
- Stoey, G., Xuan, Y., Peycheva, M., & Scigelova, M. (2012). Quantitative assessment of the contribution of high resolution mass spectrometric analysis to the reliability of compound confirmation. *Talanta*, 98, 19-27. doi://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.06.026

- Stolker, A. A. M., & Brinkman, U. A. T. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *Journal of Chromatography A*, 1067(1–2), 15–53. [//dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.037](https://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.037)
- Stubbings, G., & Bigwood, T. (2009). The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) approach. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 68–78. doi://doi.org/10.1016/j.aca.2009.01.029
- Subirats i Vila, X., Rosés Pascual, M., & Bosch, E. (2009). Efecto de la solución amortiguadora de pH en la selectividad cromatográfica de compuestos ácido-base. *Cromatografía y Técnicas Afines*, 30(1), 15–28. Recuperado de <https://recercat.cat/handle/2072/266506>
- Tang, J., Wang, J., Shi, S., Hu, S., & Yuan, L. (2018). Determination of β -agonist residues in animal-derived food by a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method combined with molecularly imprinted stir bar sorptive extraction. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2018, 9053561–10. doi:10.1155/2018/9053561
- Tang, L., & Kebarle, P. (1993). Dependence of ion intensity in electrospray mass spectrometry on the concentration of the analytes in the electrosprayed solution. *Analytical Chemistry*, 65(24), 3654–3668.
- Tao, Y., Chen, D., Yu, H., Huang, L., Liu, Z., Cao, X., Yuan, Z. (2012). Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived

foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 135(2), 676-683. doi://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.086

Tasci, F., Canbay, H. S., & Doganturk, M. (2021). Determination of antibiotics and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *Food Control*, 127, 108147. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108147

Tiseo, K., Huber, L., Gilbert, M., Robinson, T. P., & Van Boeckel, T. P. (2020). Global trends in antimicrobial use in food animals from 2017 to 2030. *Antibiotics*, 9(12), 918.

Thompson, T. S., & Noot, D. K. (2005). Determination of sulfonamides in honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 551(1), 168-176. https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.03.077

Turnipseed, S. B., Lohne, J. J., Storey, J. M., Andersen, W. C., Young, S. L., Carr, J. R., & Madson, M. R. (2014). Challenges in implementing a screening method for veterinary drugs in milk using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(17), 3660-3674.

UNE-EN-15662 Método múltiple para la determinación de residuos de plaguicidas mediante análisis basados en GC y LC tras extracción con acetonitrilo y limpieza mediante SPE por dispersión. Método QuEChERS. (2019).

- van den Heever, Thompson, T.S., Curtis, J.M., & Pernal, S.F. (2015). Determination of dicyclohexylamine and fumagillin in honey by LC-MS/MS. *Food Anal. Methods*, 8, 767-777.
- Vanhaecke, L., Bussche, J. V., Wille, K., Bekaert, K., & De Brabander, H. F. (2011). Ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high-throughput confirmation and quantification of 34 anabolic steroids in bovine muscle. *Analytica Chimica Acta*, 700(1), 70-77. doi:10.1016/j.aca.2010.10.006
- VISAVET (24 de noviembre 2021). Recuperado de <http://www.visavet.es/vav>.
- Voigt, A. M., Skutlarek, D., Timm, C., Schreiber, C., Felder, C., Exner, M., & Faerber, H. A. (2020). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a fast and simple method for the determination of several antibiotics in different aqueous matrices. *Environmental Chemistry (Online)*, 17(1), 54-74. <http://dx.doi.org/10.1071/EN19115>
- von Eyken, A., Furlong, D., Bayen, S., von Eyken, A., Furlong, D., Arooni, S., Bayen, S. (2019). *Direct injection high performance liquid chromatography coupled to data independent acquisition mass spectrometry for the screening of antibiotics in honey*. Amsterdam] : Elsevier. doi:10.1016/j.jfda.2018.12.013
- Wang, J., Leung, D., Chow, W., Chang, J. S., Wong, J.W. (2015). Development and validation of a multi-class method for analysis of veterinary drug residues in milk using ultrahigh performance liquid chromatography electrospray ionization quadrupole orbitrap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 9175-9187.

- Wang, K., Lin, K., Huang, X., & Chen, M. (2017). A Simple and Fast Extraction Method for the Determination of Multiclass Antibiotics in Eggs Using LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(24), 5064-5073. doi:10.1021/acs.jafc.7b01777
- Wang, X., Liu, Y., Su, Y., Yang, J., Bian, K., Wang, Z., & He, L. -. (2014). High-throughput screening and confirmation of 22 banned veterinary drugs in feedstuffs using LC-MS/MS and high-resolution orbitrap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(2), 516-527.
- Wang, M., Wang, Y., Peng, B., Zhao, N., Zhao, J., Xiong, Z., & Zhao, L. (2019). Multi-class determination of steroid hormones and antibiotics in fatty hotpot ingredients by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 171, 193-203. doi:https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.019
- Web of science (22 de noviembre 2021). Recuperado de <https://www.webofscience.com>
- Wu, I., Turnipseed, S. B., Andersen, W. C., & Madson, M. R. (2020). Analysis of peptide antibiotic residues in milk using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). *Food additives and Contaminants: PART A*, 37(8), 1264-1278. doi:10.1080/19440049.2020.1766703
- Xu, Y., Tian, X., Ren, C., Huang, H., Zhang, X., Gong, X., . . . Zhang, L. (2012). Analysis of colistin A and B in fishery products by ultra performance liquid chromatography with positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 899, 14-20. doi://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.04.028

- Xu, J., Yang, M., Wang, Y., Yang, Y., Tu, F., Yi, J., Chen, D. (2021). Multiresidue analysis of 15 antibiotics in honey using modified QuEChERS and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103, 104120. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104120>
- Zhan, J., Zhong, Y., Yu, X., Peng, J., Chen, S., Yin, J., . . . Zhu, Y. (2013). Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2), 827-834. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.130>
- Zhang, Y., Li, X. Q., Li, H. M., Zhang, Q. H., Gao, Y., & Li, X. J. (2019). Antibiotic residues in honey: A review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 110, 344-356. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.015>
- Zhang, L., Shi, L., Li, Y., Zhang, L., Shi, L., He, Q., & Li, Y. (2021). A rapid multi-class method for antibiotic residues in goat dairy products by UPLC-quadrupole/electrostatic field orbitrap high-resolution mass spectrometry. *Journal of Analytical Science and Technology*. Daejeon: Korea Basic Science Institute. doi:[10.1186/s40543-021-00268-4](https://doi.org/10.1186/s40543-021-00268-4)
- Zhi, S., Zhou, J., Liu, H., Wu, H., Zhang, Z., Ding, Y., & Zhang, K. (2020). Simultaneous extraction and determination of 45 veterinary antibiotics in swine manure by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1154, 122286. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122286>

Zhou, J., Xu, J., Cong, J., Cai, Z., Zhang, J., Wang, J., & Ren, Y. (2018). Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk. *Journal of Chromatography A*, 1532, 20-29. 10.1016/j.chroma.2017.11.050



VNIVERSITAT D VALÈNCIA

