



Seguretat alimentària en l'alimentació animal. Anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos

Sílvia Borràs i Agudé

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Facultat de Química
Departament de Química Analítica

Programa de doctorat
Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

Tesi doctoral

SEGURETAT ALIMENTÀRIA EN L'ALIMENTACIÓ ANIMAL.
ANÀLISI D'AGENTS ANTIMICROBIANS EN PINSOS

Memòria presentada per

SÍLVIA BORRÀS i AGUADÉ

per optar al títol de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Sota la direcció de

Dr. RAMON COMPANYÓ BELTRAN
Dr. JACINTO GUITERAS RODRÍGUEZ

El Dr. **Ramon Companyó Beltran**, catedràtic del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i el Dr. **Jacinto Guiteras Rodríguez**, professor titular del mateix departament,

FAN CONSTAR

Que la present memòria titulada **Seguretat alimentària en l'alimentació animal. Anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos** ha estat realitzada sota la nostra direcció per la Sra. **Sílvia Borràs i Agudé** en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona i que tots els resultats presentats en la mateixa són fruit de les experiències realitzades per la citada doctoranda.

I per a que així es faci constar, expedim i signem el present certificat.

Barcelona, abril de 2014

Dr. Ramon Companyó Beltran

Dr. Jacinto Guiteras Rodríguez

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AcEt	Acetat d'etil
ACN	Acetonitril
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
AIF	Fragmentació de tots els ions <i>All ion fragmentation</i>
ALARA	Principi "tan baix com sigui raonablement possible" <i>"As low as reasonably achievable" principle</i>
AMP	Amprolium
APCI	Ionització química a pressió atmosfèrica <i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>
ASFAC	Associació Catalana de Fabricants de Pinsos
ASPB	Agència de Salut Pública de Barcelona
ASPCAT	Agència de Salut Pública de Catalunya
BAC	Bacitracina
CAP	Cloramfenicol
CBX	Carbadox
CC α	Límit de decisió <i>Decision limit</i>
CC β	Capacitat de detecció <i>Detection capability</i>
CE	Electroforesi capil·lar <i>Capillary electrophoresis</i>
CESFAC	Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales
CIP	Ciprofloxacina
CLOP	Clopidol
COMAR	Base de dades internacional de materials de referència certificats <i>Code d'indexation des matériaux de référence</i>
CRM	Material de referència certificat <i>Certified reference material</i>
CTC	Clortetraciclina
DAAM	Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural

DAN	Danofloxacina
DART	Anàlisi directa en temps real <i>Direct analysis in real time</i>
DC	Doxiciclina
DCQ	Decoquinat
DCZ	Diclazuril
DIF	Difloxacina
DMC	Demeclociclina
DNA	Àcid desoxiribonucleic <i>Deoxyribonucleic acid</i>
d-SPE	Extracció en fase sòlida dispersiva <i>Dispersive solid-phase extraction</i>
EDTA	Àcid etilendiaminatetraacètic
EFSA	Autoritat Europea de Seguretat Alimentària <i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Assaig d'immunoabsorció enzimàtica <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	Agència Europea del Medicament <i>European Medicines Agency</i>
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
ENR	Enrofloxacina
EPTIS	Base de dades d'assajos d'aptitud <i>European proficiency testing information system</i>
ERY	Eritromicina
ESI	Ionització per electroesprai <i>Electrospray ionization</i>
EUA	Estats Units d'Amèrica
FAO	Organització de les Nacions Unides per a l'Alimentació i l'Agricultura <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FEFAC	Federació Europea de Fabricants d'Aliments Compostos <i>Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés</i>
FEN	Fenbendazole

FL	Fluorescència
FLOR	Florfenicol
FLU	Flumequina
FLUB	Flubendazole
FTD	Furaltadona
FWHM	Amplada a mitja alçada <i>Full width at half maximum</i>
HACCP	Anàlisi de perills i punts crítics de control <i>Hazard analysis and critical control points</i>
HLB	Equilibri hidròfil-lipòfil <i>Hydrophilic-lipophilic balance</i>
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució <i>High-performance liquid chromatography</i>
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució <i>High-resolution mass spectrometry</i>
IP	Punt d'identificació <i>Identification point</i>
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries
IS	Patró intern <i>Internal standard</i>
KLZH	<i>Official Food Control Authority of the canton of Zürich (Kantonales Labor Zürich, Suïssa)</i>
LAC	Laboratori Agroalimentari de Cabriels
LAS	Lasalocid
LC	Cromatografia de líquids <i>Liquid chromatography</i>
LC-FL	Cromatografia de líquids amb detecció fluorimètrica
LC-MS	Cromatografia de líquids amb detecció per espectrometria de masses
LC-MS/MS	Cromatografia de líquids amb detecció per espectrometria de masses en tàndem
LC-UV	Cromatografia de líquids amb detecció a l'ultraviolat
LIN	Lincomicina

LIT	Trampa iònica lineal <i>Linear ion trap</i>
LLE	Extracció líquid-líquid <i>Liquid-liquid extraction</i>
LOD	Límit de detecció <i>Limit of detection</i>
LOQ	Límit de quantificació <i>Limit of quantification</i>
<i>m/z</i>	Relació massa/càrrega
MA	Exactitud de massa <i>Mass accuracy</i>
MAE	Extracció assistida per microones <i>Microwave assisted extracion</i>
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
MAR	Marbofloxacina
MeOH	Metanol
MON	Monensina
MRL	Límit màxim de residu <i>Maximum residue limit</i>
MRM	Monitoratge de reaccions múltiples <i>Multiple reaction monitoring</i>
MRPL	Límit mínim de funcionament exigit <i>Minimum required performance limit</i>
MS	Espectrometria de masses <i>Mass spectrometry</i>
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem <i>Tandem mass spectrometry</i>
MSDP	Dispersió de matriu en fase sòlida <i>Matrix solid-phase dispersion</i>
NAR	Narasina
NCZ	Nicarbazina
NIF	Nifursol
NIG	Nigericina

NOR	Norfloxacina
NOR-d ₅	Norfloxacina-d ₅
OIE	Organització Mundial de Sanitat Animal <i>Office International des Epizooties</i>
OLQ	Olaquinox
OMS	Organització Mundial de la Salut
OTC	Oxitetraciclina
OXI	Oxibendazole
OXO	Àcid oxolínic
PABA	Àcid p-aminobenzoic <i>p-aminobenzoic acid</i>
PHWE	Extracció amb aigua calenta pressuritzada <i>Pressurized hot water extraction</i>
PIR	Pla d'Investigació de Residus
PLE	Extracció amb líquids pressuritzats <i>Pressurized liquid extraction</i>
PSA	Amina primària secundària <i>Primary secondary amine</i>
PT	Assaig d'aptitud <i>Proficiency test</i>
Q	Quadrupol
QqQ	Triple quadrupol
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>
RASFF	Sistema d'Alerta Ràpida per a Aliments i Pinsos <i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>
RDZ-d ₃	Ronidazole-d ₃
ROX	Roxitromicina
RP	Poder de resolució <i>Resolving power</i>
RSD	Desviació estàndard relativa <i>Relative standard deviation</i>
SAL	Salinomicina

SAR	Sarafloxacina
SCP	Sulfacloropiridazina
SDD	Sulfadimidina
SDD- ¹³ C	Fenilsulfadimidina- ¹³ C ₆
SDM	Sulfadimetoxina
SDX	Sulfadoxina
SDZ	Sulfadiazina
SLE	Extracció sòlid-líquid <i>Solid-liquid extraction</i>
SME	Sulfametoxidiazina
SMP	Sulfametoxipiridazina
SMR	Sulfamerazina
SMX	Sulfametoxazole
SPD	Sulfapiridina
SPE	Extracció en fase sòlida <i>Solid-phase extraction</i>
SPI	Espiramicina
SQX	Sulfaquinoxalina
STZ	Sulfatiazole
TC	Tetraciclina
TIA	Tiamulina
TOF	<i>Temps de vol</i> <i>Time-of-flight</i>
TRI	Trimetoprim
TYL	Tilosina
UAE	Extracció assistida per ultrasons <i>Ultrasound-assisted extraction</i>
UE	Unió Europea
UHPLC	Cromatografia de líquids d'ultra alta resolució <i>Ultra-high-performance liquid chromatography</i>
UV	Ultraviolat

VAL

Valnemulina

VBA

Visual Basic per a Aplicacions

Visual Basic for Applications

AGRAÏMENTS

En primer lloc, agraeixo al Dr. Ramon Companyó, director d'aquesta tesi, el seu tracte, orientació i dedicació al llarg de tots aquests anys sense excepció. M'has ajudat a créixer no tan sols científica i professionalment, treballant amb serietat i rigor, sinó també a nivell personal. Sense la teva tasca aquesta tesi tampoc hauria estat possible. Així mateix, agrair al Dr. Jacinto Guiteras la seva col·laboració.

Donar les gràcies també a la Dra. Maria Dolors Prat i la Dra. Mercè Granados per la seva participació en algun dels treballs, la seva amabilitat i, en definitiva, per estar sempre disposades a donar un cop de mà sempre que ho he necessitat.

En segon lloc, voldria fer extensiu el meu agraïment al Jaume Bosch i la Mireia Medina per la col·laboració establerta i obrir-me les portes del Laboratori Agroalimentari de Cabriels. També a tots els companys del LAC, la Laia, l'Àlex l'Albert i el Carlos, entre d'altres, per la seva bona acollida i simpatia i, molt especialment, a la Sílvia Termes per la seva ajuda, paciència i suport en tot moment.

I would also like to thank Mr. Anton Kaufmann and all his team, Kathryn, Mirjam, Stephan and Patrick, for the opportunity to work with them in the Official Food Control of the Canton of Zürich. Thanks Toni for introducing me to the world of high-resolution mass spectrometry and the useful programming with VBA. I hope to come back and visit you soon.

Com no, donar les gràcies a tots els meus companys del grup de Fluorescència per tots els grans moments que he viscut amb vosaltres, perquè amb el vostre bon humor i complicitat els dies (i anys) m'han passat volant. Al Marc, per ser l'únic amb qui ens hem aguantat mútuament des del primer a l'últim dia. Gràcies per la teva ajuda, ànims i interessants dissertacions sobre temes de diversitat infinita, tant aquí com en la distància. Al Quim per unir-se a nosaltres aquest últim any i fer aquesta escriptura més suportable i, fins i tot, en molts dies divertida (ànims que ja ets el següent!). A la resta de veterans, la Vane, el Fernando i el Jordi perquè també sou culpables de que m'animés a fer aquesta tesi. Al Kumar, el Carles, la Neus i la resta de família fluorescent, l'Aina, la Sònia, la Montse, la Su i la Míriam, i fluorescents d'adopció, el Lluís, per totes les hores genials compartides dins i fora del laboratori (sopars, celebracions, calçotades, sortides, etc.). En definitiva, gràcies perquè després de tots aquests anys heu passat de companys a amics i sens dubte tots

vosaltres sou el millor que m'emporto d'aquesta etapa. Espero que els bons moments continuïn per molts anys.

Gracias Bea por abrirme las puertas de tu casa y hacerme sentir como en la mía, fuiste una excelente compañera de piso. También por iniciarme en la escalada y por las muchas excursiones que hicimos y increíbles sitios de Suiza que me mostraste. *Ahorita* a Michi, por todas las charlas, visitas guiadas, días en el lago y barbacoas compartidas, fuiste un gran apoyo. A Vania y a Diego por una de las mejores noches de fiesta en Winterthur. Entre todos hicisteis que esta experiencia en Zúrich fuese una de las mejores de mi vida. Gràcies també al Quim, el Carles i el Lluís, perquè la vostra visita em va fer moltíssima il·lusió i tinc molts bons records d'aquells dies.

A les meves millors amigues per la infinitat d'experiències inoblidables que he viscut amb vosaltres. A la Sílvia, l'Ester i la Míriam per totes les nostres trobades a Barcelona, a Lleida o a mig camí, caps de setmana de desconexió a Biscarri, etc. També a l'Albert, perquè t'has convertit en un amic i sense tu les nostres trobades ja no serien el mateix, i a l'Òscar per acompanyar-nos de tant en tant i fer-les encara més divertides. A la Gemma, per tots els teatres, excursions, pel·lícules per oblidar i viatges per recordar. A la Laura, per les tardes de compres, cap d'anys i vacances compartides des de petites i fins ara. A la Joana, gracias *maluca* porque pese a la distancia un simple *skype* siempre es suficiente para ponernos al día y darme cuenta que parece que fue ayer la última vez que te vi. También por esos días en Lisboa que ayudaron a hacer esta recta final un poco más llevadera. Però sobretot gràcies a totes per escoltar-me, aconsellar-me i saber que puc comptar amb vosaltres sempre que ho necessito.

També agrair a la resta d'amics i companys de laboratori i del departament que m'han acompanyat i animat contínuament al llarg d'aquest camí.

Per acabar i el més important, donar les gràcies a tota la meva família. Als meus pares perquè sense el vostre esforç, recolzament i estima sense límits seria impossible que hagués arribat fins aquí, tot el que sóc (i seré) us ho dec a vosaltres. A la meva germana (i amiga) perquè també ets imprescindible en la meva vida i sense tu tampoc seria la mateixa persona. Gràcies per regalar-me la millor neboda i cunyat que podria tenir. I finalment, a tots els meus avis perquè, presents o no, sé

que estareu amb mi en un dia com avui i sempre. Aquesta tesi va dedicada a tots vosaltres!

ÍNDEX

*ABSTRACT	1
CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ	5
1.1. Agents antimicrobians en producció animal	7
1.1.1. Usos i vies d'administració	8
1.1.2. Agents antibacterians	10
1.1.2.1. Sulfamides	15
1.1.2.2. Diaminopirimidines	17
1.1.2.3. Quinolones	18
1.1.2.4. Tetraciclins	21
1.1.2.5. Penicil·lins	22
1.1.2.6. Macròlids	24
1.1.2.7. Amfenicols	26
1.1.2.8. Lincosamides	26
1.1.2.9. Polipèptids	27
1.1.2.10. Nitrofurans	28
1.1.2.11. Quinoxalines	29
1.1.2.12. Pleuromutilins	30
1.1.3. Agents antiparasitaris	31
1.1.3.1. Benzimidazoles	31
1.1.3.2. Coccidiostàtics	32
1.1.4. Perills derivats de l'ús d'agents antimicrobians en medicina veterinària	36
1.1.4.1. Resistència microbiana	36
1.1.4.2. Residus en aliments d'origen animal	38
1.1.4.3. Toxicitat en els animals	40
1.2. Pinsos	40
1.2.1. Composició dels pinsos	43
1.2.1.1. Matèries primeres	43
1.2.1.2. Additius	47
1.2.1.3. Premescles medicamentoses	49
1.2.2. Producció higiènica de pinsos	52
1.2.3. Contaminació creuada	54
1.2.4. Plans de vigilància i controls	57

1.2.5. Sistema d'Alerta Ràpida per a Aliments i Pinsos (RASFF)	60
1.3. Anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos	61
1.3.1. Tractament de mostra.....	64
1.3.1.1. Mètodes d'extracció.....	64
1.3.1.2. Mètodes de purificació o <i>clean-up</i> dels extractes	66
1.3.2. Determinació dels anàlits.....	68
1.3.2.1. Mètodes d'immunoassaig.....	68
1.3.2.2. Mètodes cromatogràfics	71
1.3.2.3. Espectrometria de masses.....	72
1.3.3. Quantificació	75
1.3.4. Validació	77
*CAPÍTOL 2. OBJECTIUS.....	85
CAPÍTOL 3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	91
3.1. Anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos (revisió)	93
*3.1.1.Publicació I. <i>Analysis of antimicrobial agents in animal feed</i> (<i>review</i>)	95
3.2. Mètodes multiresidu per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos ...	125
*3.2.1.Publicació II. <i>Analysis of sulfonamides in animal feeds by</i> <i>liquid chromatography with fluorescence detection</i>	127
*3.2.2.Publicació III. <i>Analysis of fluoroquinolones in animal feeds</i> <i>by liquid chromatography with fluorescence detection</i>	135
3.2.3. Discussió dels resultats	141
3.2.3.1. Dopatge de les mostres de pinso.....	141
3.2.3.2. Propietats fisicoquímiques dels anàlits	142
3.2.3.3. Tractament de mostra	144
3.2.3.4. Determinació per LC-FL	147
3.3. Mètode multiclasse per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos.....	152
*3.3.1.Publicació IV. <i>Multiclass method for antimicrobial analysis in</i> <i>animal feeds by liquid chromatography-tandem mass</i> <i>spectrometry</i>	155
3.3.2. Discussió dels resultats	180
3.3.2.1. Dopatge de les mostres de pinso.....	180
3.3.2.2. Tractament de mostra	180

3.3.2.3. Determinació per LC-MS/MS	185
3.3.2.4. Calibratge i quantificació	190
3.4. Correlació d'ions en espectrometria de masses d'alta resolució.....	193
*3.4.1. Publicació V. <i>Correlation of precursor and product ions in single-stage high resolution mass spectrometry. A tool for detecting diagnostic ions and improving the precursor elemental composition elucidation</i>	195
3.4.2. Discussió dels resultats	207
3.4.2.1. Descripció de l'algoritme	207
3.4.2.2. Exemple d'aplicació: assaig d'aptitud.....	214
*CAPÍTOL 4. CONCLUSIONS.....	219
REFERÈNCIES	233

ABSTRACT

Livestock production is an important economic sector worldwide, aiming to satisfy the food demand of a growing global population. In intensive livestock production systems, the use of veterinary drugs has become a routine to prevent and control the outbreak of animal diseases and achieve the highest output at the lowest cost. Antimicrobial agents, including antibacterials and antiparasitics are, by far, the most widely administered group. Oral pharmaceutical forms applicable for mass treatment are the most common practice, either premixes for the preparation of medicated feed in feed mills, or oral powders to be blended with feeds at the farms. These management practices may result in cross-contamination of non-target feedingstuffs. The unawareness of feeding animals with contaminated feeds may compromise the animal and human health. Adverse effects for consumers are related to the occurrence of antimicrobial residues in animal food products (meat, milk, eggs, etc.), which can lead to the global issue of the selection of resistant bacteria. In order to guarantee a high level of public health protection, the European Union has implemented a legal framework which covers the whole food chain, including animal feeds. Thus, extensive regulatory monitoring programs are in place to ensure that feeds reaching the market pose no risk for food safety.

In this context, the present thesis has focused on the analysis of antimicrobial agents in animal feeds. To begin with, a review on this subject was carried out in collaboration with the Agri-Food Laboratory of Cabrils (LAC) and the Agri-Food Institute of Research and Technology (IRTA), both ascribed to the Department of Agriculture of the Government of Catalonia. In this review, a general introduction to the feed industry and the unavoidable problem of cross-contamination is presented, followed by a description of the current legal framework and the analytical methods employed in this field. The challenges faced by official control laboratories in the development and validation of methods are also highlighted. Based on the outcome it can be stated that there is a lack of published methods available for the analysis of antimicrobials in feeds.

Then, three methods based on liquid chromatography were developed: two multiresidue methods by fluorescence detection for the determination of sulfonamides and fluoroquinolones, and a method based on tandem mass spectrometry detection (MS/MS) for the confirmatory analysis of a wide range of antimicrobials, belonging to various families in a single run. In all cases, the optimal conditions for the extraction, chromatographic separation and detection were

studied. The development of the multiclass method was carried out in the LAC. It allowed to encompass all the methods implemented in the laboratory for the official controls of antimicrobials in feeds, and also to include new compounds and families.

Finally, high-resolution mass spectrometry (HRMS) is nowadays an emerging technique in routine laboratories. In this field, an automated algorithm for the correlation of precursor and product ions derived from a single-stage Orbitrap mass analyzer is presented.

INTRODUCCIÓ

Capítol 1

1.1. Agents antimicrobians en producció animal

Actualment, la Unió Europea (UE) és una de les principals regions ramaderes del món, sent Alemanya, Espanya i França, els principals països productors [1]. S'estima que l'any 2012, el sector ramader va generar un total de 148 bilions €, xifra que representa un 40 % del valor econòmic de l'activitat agrícola i ramadera dels 27 estats membres de la UE (UE-27) (Figura 1.1). Aquest alt nivell de producció és possible gràcies als sistemes d'explotació intensiva d'animals, els quals es caracteritzen per concentrar grans quantitats de bestiar en espais reduïts. No obstant, aquest tipus de pràctica priva els animals del seu comportament natural, fet que els comporta, entre d'altres conseqüències, una debilitació del sistema immunitari que afavoreix l'aparició de malalties. L'ús de medicaments veterinaris per garantir la salut i el benestar dels animals esdevé, per tant, un factor clau d'una banda, per mantenir la viabilitat i l'eficiència de la indústria ramadera i d'altra banda, per reduir el risc de transmissió de malalties als consumidors i augmentar així la seguretat de la cadena alimentària.

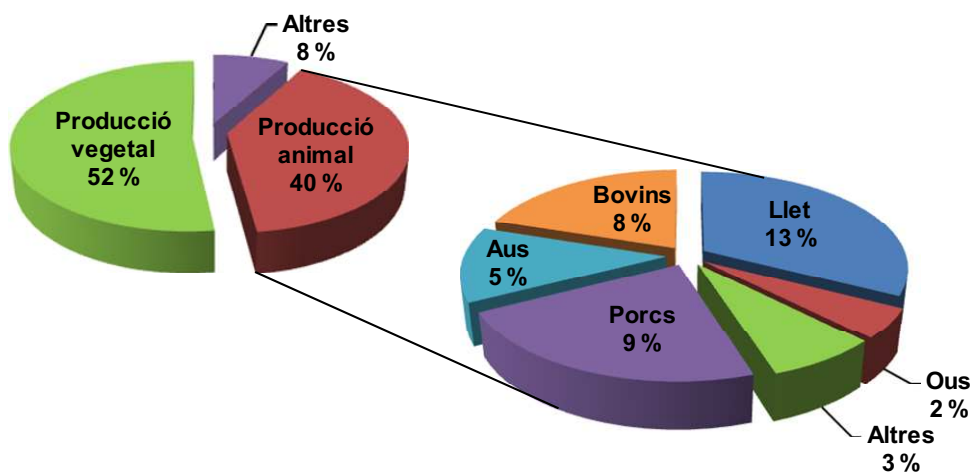


Figura 1.1. Producció agrícola i ramadera a la UE-27 l'any 2012 [1].

A la UE, la producció, comercialització, distribució i utilització de medicaments veterinaris es troba regulada per un codi comunitari d'aplicació a tots els estats membres establert en la Directiva 2001/82/CE [2]. Entre els diferents tipus de medicaments veterinaris (agents antimicrobians, β -agonistes, hormones, tranquil·litzants, etc.), els agents antimicrobians són els més emprats [3]. Aquests

es defineixen com les substàncies químiques naturals o sintètiques capaces, a baixes concentracions, d'eliminar microorganismes com bacteris, paràsits, fongs o virus, o simplement d'inhibir-ne el creixement i la proliferació sense destruir-los. Segons el substrat sobre el qual actuen poden classificar-se en:

- Agents antibacterians
- Agents antiparasitaris
- Agents antifúngics o antimicòtics
- Agents antivírics

Els agents antimicrobians d'origen natural (obtinguts a partir de microorganismes) reben també el nom d'antibiòtics, mentre que els obtinguts sintèticament s'haurien d'anomenar quimioteràpics. No obstant, en l'actualitat, la distinció entre antibiòtic i quimioteràpic no és tan senzilla, ja que alguns agents antimicrobians es poden obtenir més fàcilment per síntesi química que mitjançant processos de fermentació. A més, mitjançant la modificació de l'estructura química d'agents antimicrobians naturals és possible produir també agents semisintètics, de manera que el terme antibiòtic sovint és emprat de forma genèrica per designar totes les substàncies amb activitat antimicrobiana independentment del seu origen.

1.1.1. Usos i vies d'administració

El descobriment dels primers agents antimicrobians va ser, des del punt de vista mèdic, un dels avanços més importants del segle XX. La seva aplicació en veterinària es va iniciar pràcticament al mateix temps que en medicina humana, és a dir, ara fa més de 80 anys. Actualment, es poden emprar en animals productors d'aliments amb les següents finalitats:

- Terapèutica, per al tractament d'infeccions diagnosticades en un animal o grup d'animals malalt;
- Metafilàctica, per al tractament d'un grup d'animals quan alguns dels individus presenten els primers signes de malaltia i pel control de la propagació de la infecció en la resta d'animals sans del grup en contacte;

- Profilàctica, per a la prevenció de l'aparició d'infeccions en un animal o grup d'animals sans però que tenen un alt risc de contreure'n per determinades circumstàncies (espècies animals sensibles a certs agents infecciosos, intervencions quirúrgiques, transport, deslletament, etc.).

En tots els casos, l'administració pot tenir lloc per diferents vies:

- Via oral a través de premescles medicamentoses o pols orals incorporades als pinsos o bé mitjançant solucions orals o pols hidrosolubles dissoltes en l'aigua de beguda;
- Via parenteral per mitjà d'injeccions subcutànies, intramusculars, intravenoses, etc.;
- Via intramamària, intrauterina, tòpica, nasal, etc.

En ramaderia intensiva però, l'administració per via oral a través de pinsos medicamentosos és la forma més emprada [4]. Amb finalitat terapèutica, els agents antimicrobians són administrats en dosis relativament altes (de l'ordre de 100 a 1000 mg kg⁻¹) durant períodes curts de temps, i sota el control i la prescripció d'un veterinarí. A més, tot i que el bestiar malalt sovint disminueix dràsticament el consum de pinso, l'administració sol fer-se de manera col·lectiva, és a dir, sobre tots els animals que es troben en una mateixa nau. En conseqüència, en un moment determinat, s'estan medicant tant animals amb els primers signes o símptomes clars de la malaltia com animals sans, amb marcades diferències en el consum de pinso i, paral·lelament en la quantitat de principi actiu ingerit. Això comporta que mentre uns animals s'estan submedicant, d'altres estan rebent una medicació innecessària. Tanmateix, un canvi en aquest tipus de pauta, vers la intervenció individual sobre l'animal malalt, és sovint inviable sobretot quan es tracta de cents o milers d'animals que s'han de medicar amb l'aparició dels primers signes de malaltia, ja que de no fer-se així, els nivells de mortalitat podrien arribar a ser molt elevats.

A més, i fins fa relativament pocs anys, alguns agents antimicrobians també podien ser utilitzats en producció animal com a promotors de creixement. Amb aquesta finalitat, eren administrats com a additius en els pinsos sense necessitat de prescripció veterinària i en dosis subterapèutiques (entre 30 i 100 mg kg⁻¹) durant llargs períodes de temps. Aquestes concentracions, encara que baixes, provoquen modificacions de la flora intestinal, donant lloc a una major absorció de nutrients que

es tradueix en un augment del ritme de creixement i del pes de l'animal (2-5 % segons l'espècie) amb un menor consum de pinso. Alhora exerceixen també una funció profilàctica, encara que secundària, reduint el risc d'infeccions subclíniques i disminuint les taxes de mortalitat. Tot això, comporta un augment de la productivitat i una disminució dels costos [4, 5]. Aquests efectes, que es van observar per primera vegada l'any 1949 en pollastres alimentats amb subproductes de la fermentació resultants de la producció de clortetraciclina, es van estendre ràpidament a altres agents antimicrobians i espècies animals fins a convertir-se en una pràctica habitual en la majoria d'explotacions ramaderes. Això no obstant, ja des de l'inici es va obrir un fort debat sobre l'augment de casos de resistència microbiana en medicina humana i la possible relació amb el seu consum continuat com a promotors del creixement en medicina veterinària. Així doncs, seguint el principi de precaució la UE va iniciar la revocació progressiva dels agents antimicrobians autoritzats com a promotors de creixement, especialment d'aquells que també podien ser utilitzats en medicina humana o veterinària, o que seleccionessin resistències creuades. El procés finalitzà l'any 2006, en què el Reglament (CE) 1831/2003 [6] va prohibir l'ús d'agents antimicrobians, a excepció dels coccidiostàtics i els histomonòstats, com a additius en l'alimentació animal.

Els agents antibacterians i els antiparasitaris són les dues classes d'agents antimicrobians més utilitzades en medicina veterinària [3].

1.1.2. Agents antibacterians

Els agents antibacterians són els agents antimicrobians capaços d'inhibir el creixement i la proliferació de bacteris (efecte bacteriostàtic) o fins i tot d'eliminar-los (efecte bactericida).

Dades de l'Agència Europea del Medicament (EMA, de *European Medicines Agency*) van estimar en 8420 tones les vendes d'agents antibacterians destinats a animals d'abastament en 25 dels 27 estats membres de la UE l'any 2011 (UE-25) [7]. En la Figura 1.2 es pot comprovar que els països amb una producció animal més elevada es troben, com a conseqüència, entre els països amb un consum més elevat. Així doncs, Espanya se situa en segona posició amb un volum de vendes

que va assolir gairebé les 1800 tones, xifra que representa un increment del 3.5 % respecte l'any anterior.

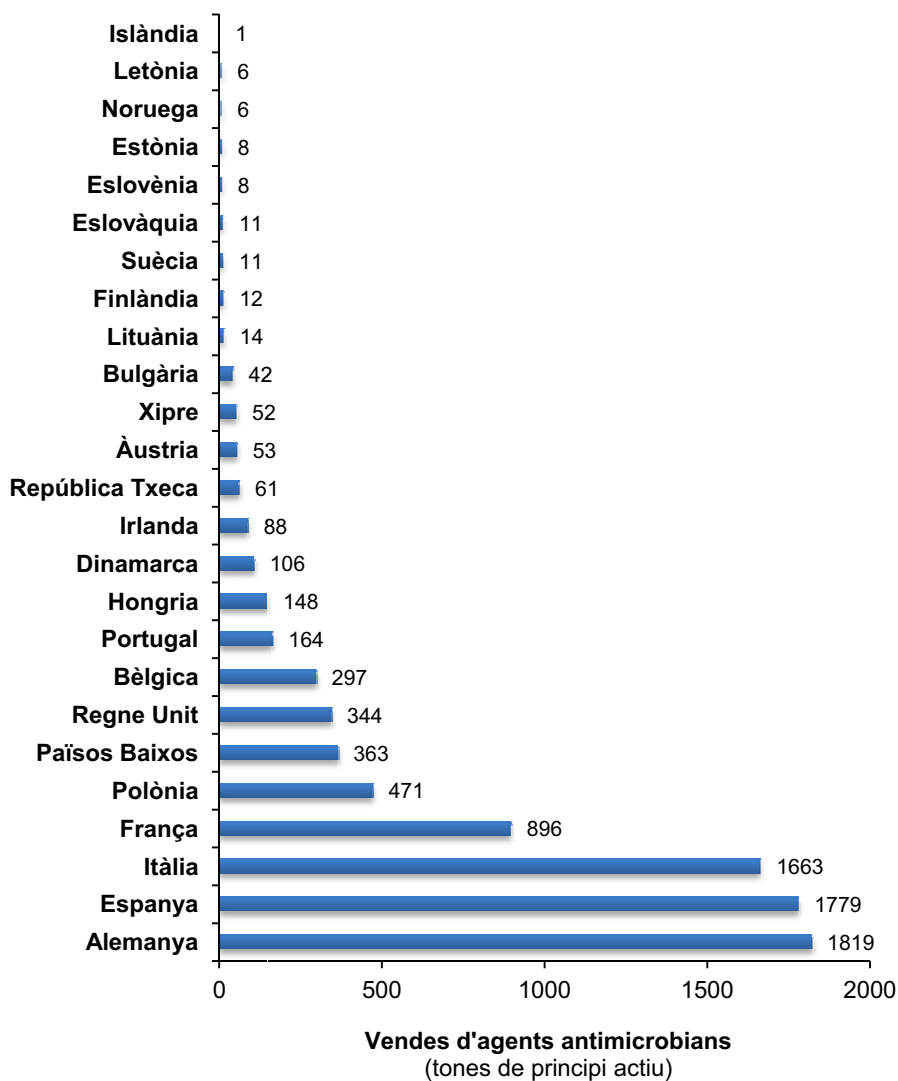


Figura 1.2. Vendes d'agents antibacterians destinats a producció animal en la UE-25 l'any 2011 [7].

Segons la seva estructura química, els agents antibacterians amb propietats generals similars s'agrupen en diferents famílies, les quals alhora es poden classificar en funció del seu mecanisme d'acció segons s'indica a la Taula 1.1. La majoria dels antibacterians actuen inhibint processos metabòlics vitals per als bacteris, relacionats amb la síntesi de la paret cel·lular, les proteïnes o els àcids

nucleics, o bé desestructurant les membranes lipídiques que els separen de l'entorn. El coneixement del seu mecanisme d'acció ajuda a predir el tipus d'activitat antibacteriana, la possibilitat de sinèrgia amb altres fàrmacs i, en certa mesura, els seus efectes adversos [8].

Taula 1.1. Mecanisme d'acció dels diferents agents antibacterians [9, 10].

Mecanisme d'acció	Efecte antibacterià	Famílies emprades en medicina veterinària
Inhibició de la síntesi de la paret cel·lular		
Actuen inhibint la síntesi o el transport de precursors del peptidoglicà que conforma la membrana de la paret bacteriana o bé inhibint la seva organització estructural.	Bactericida	Cefalosporines Glicopèptids Penicil·lines* Polipèptids (bacitracina*)
Inhibició de la síntesi d'àcids nucleics		
Interfereixen en la transcripció i replicació de l'àcid desoxiribonucleic bacterià (DNA, de <i>deoxyribonucleic acid</i>) o la polimerització dels àcids nucleics.	Bactericida	Nitrofurans* Nitroimidazoles Quinolones* Quinoxalines*
Inhibició de la síntesi proteica		
S'uneixen a les subunitats 30S o 50S del ribosoma bacterià bloquejant diferents fases de la síntesi de proteïnes (activació, formació del complex inicial, transpeptidació, translocació, etc.).	Bacteriostàtic	Amfenicols* Aminoglicòsids Lincosamides* Macròlids* Pleuromutilines* Tetraciclins*
Alteració de la membrana citoplasmàtica		
Actuen desorganitzant la membrana o produint-li porus, comprometen així la seva integritat i permeabilitat.	Bactericida	Polipèptids (polimixines)
Bloqueig de la síntesi de factors metabòlics		
Es tracta de molècules estructuralment anàlogues a diferents metabòlits essencials per a la síntesi d'àcids nucleics.	Bacteriostàtic	Diaminopirimidines* Sulfamides*

* Famílies d'agents antibacterians estudiades en aquesta tesi.

En general, cada grup actua preferentment exercint un dels dos efectes (bactericida o bacteriostàtic), encara que de vegades, un mateix agent antibacterià pot comportar-se d'ambdues maneres, depenent de la concentració que assoleixi en el punt d'actuació o de la seva afinitat pel punt d'actuació d'un determinat bacteri [10].

Entre les diferents classes d'agents antibacterians, les tetraciclins, les penicil·lins i les sulfamides, en aquest ordre, són les més emprades en producció animal (Figura 1.3).

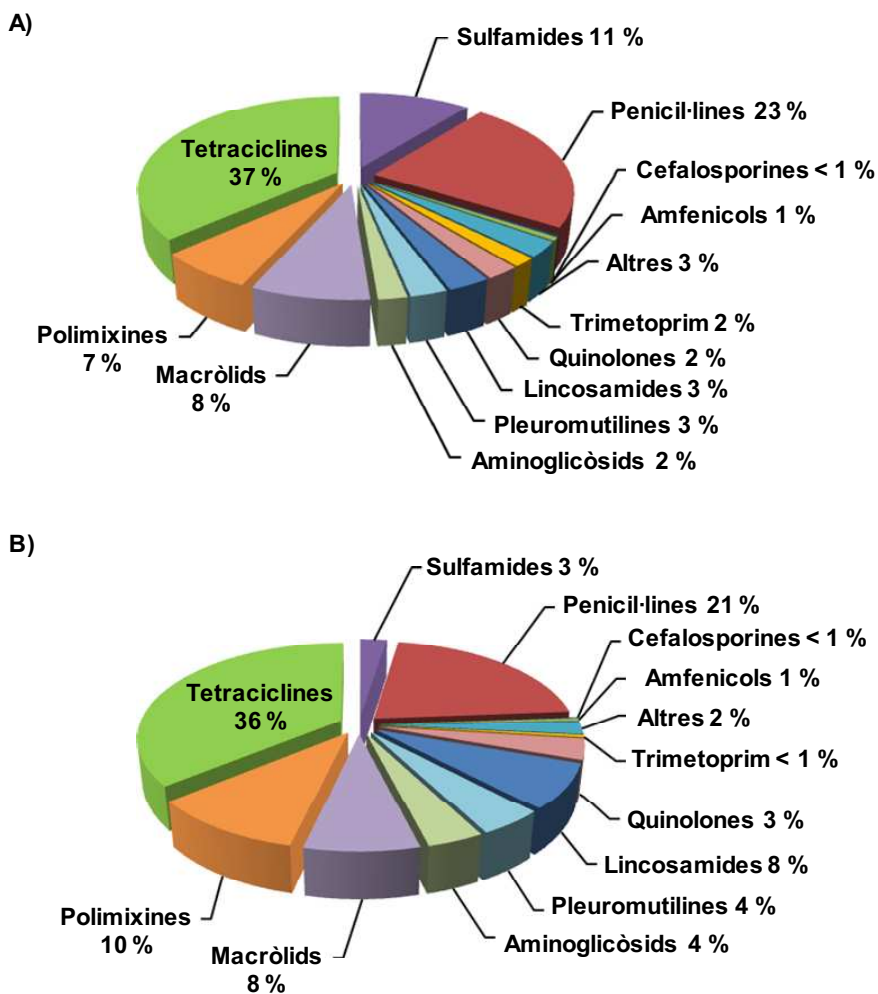


Figura 1.3. Distribució per famílies de les vendes d'agents antibacterians (percentatges sobre les tones totals) destinats a producció animal l'any 2011 a: (A) UE-25 i (B) Espanya [7].

Pel que fa a les vies d'administració, aproximadament un 90 % de les vendes d'agents antibacterians van correspondre a formes farmacèutiques d'administració oral, principalment pols orals (48 %) i premescles medicamentoses (36 %) i, en menor proporció a solucions orals (8 %), mentre que només un 7 % de les vendes van correspondre a formes injectables. No obstant, en la Figura 1.4 es pot observar com les proporcions entre aquestes quatre formes varia considerablement en funció del país considerat. Així mentre que a la majoria de països predomina l'administració col·lectiva, als països nòrdics (Dinamarca, Finlàndia, Islàndia, Noruega i Suècia) preval el tractament individualitzat. D'altra banda, les diferències entre premescles i pols orals varien en funció de si el país utilitza pinsos medicamentosos preparats a les fàbriques per mitjà de premescles o preparats a les mateixes granges per l'addició directa de pols orals als pinsos. La resta del consum d'agents antimicrobians va correspondre bàsicament a preparats intramamaris i intrauterins.

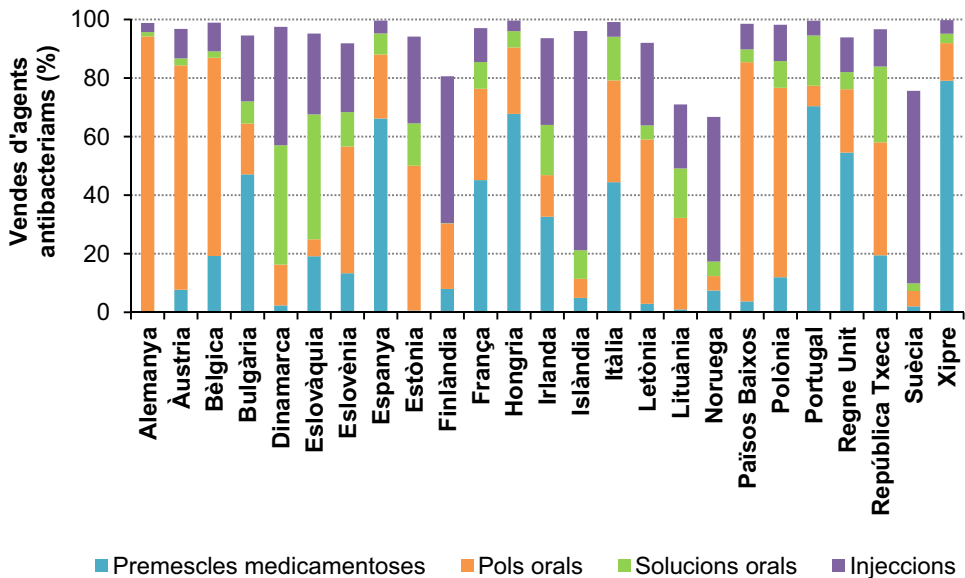


Figura 1.4. Distribució per països i formes farmacèutiques d'administració de les vendes d'agents antibacterians (percentatges sobre les tones totals) destinats a producció animal en la UE-25 l'any 2011 [7].

A continuació, es descriuen les diferents famílies d'agents antibacterians estudiades en la present tesi.

1.1.2.1. Sulfamides

Les sulfamides, també anomenades sulfonamides, són agents antimicrobians sintètics, bacteriostàtics i d'ampli espectre, és a dir, actius envers una gran varietat de microorganismes grampositius i gramnegatius. Es van descobrir a la dècada de 1930 i van ser els primers agents antibacterians eficaços en el tractament sistemàtic d'infeccions en l'ésser humà. En medicina veterinària s'utilitzen principalment en el tractament d'infeccions de les vies urinàries i respiratòries.

El seu mecanisme d'acció es basa en la inhibició de la síntesi dels àcids nucleics bacterians secundària a la seva analogia estructural amb l'àcid p-aminobenzoic (PABA, de *p-aminobenzoic acid*) (Figura 1.5). Ambdós competeixen per l'enzim dihidropteorat sintetasa que intervé en el metabolisme de l'àcid fòlic, imprescindible per a la síntesi de precursors dels àcids nucleics bacterians [11, 12].

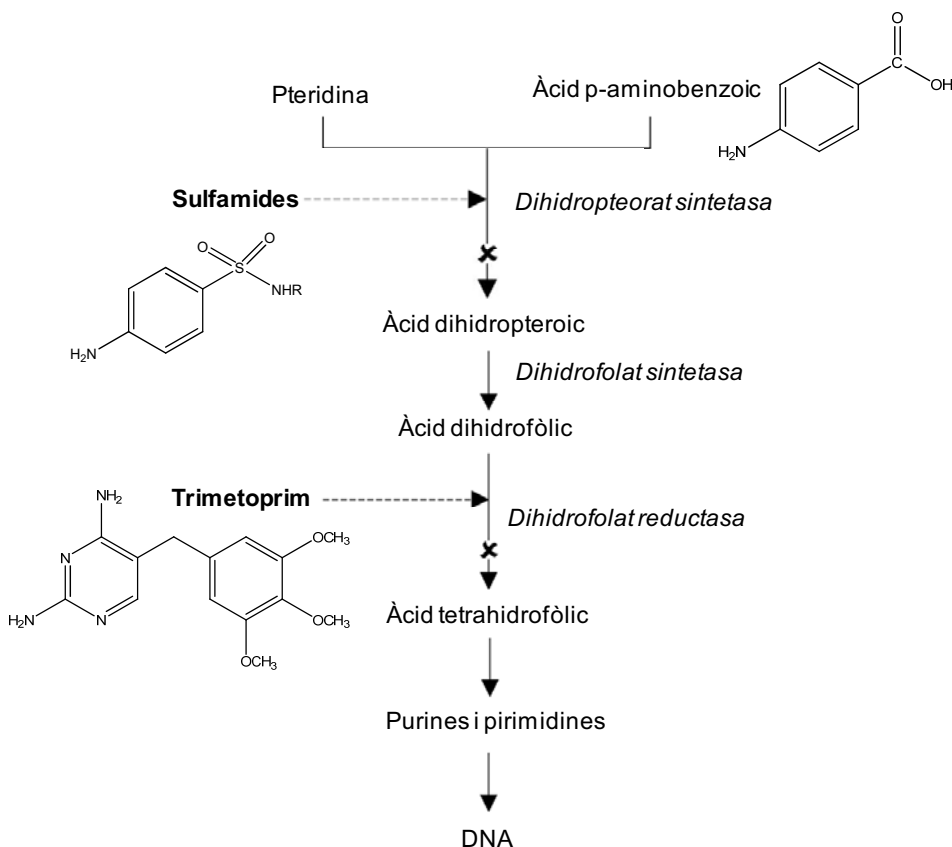


Figura 1.5. Via metabòlica bacteriana en què actuen les sulfamides i el trimetoprim.

Provenen de la sulfanilamida i la seva estructura bàsica consta d'un anell benzènic amb un grup sulfonamido al carboni 1 i un grup amino lliure al carboni 4 (Figura 1.6). Les substitucions en el grup sulfonamido modifiquen les seves característiques farmacològiques. A partir de la sulfanilamida s'han sintetitzat un gran nombre de derivats que es diferencien per la duració de la seva acció. En la Figura 1.7 es mostren les estructures de les diferents sulfamides estudiades.

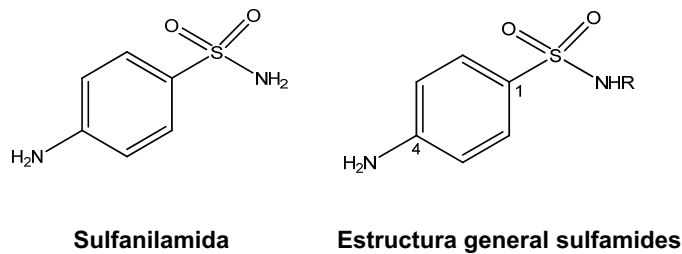
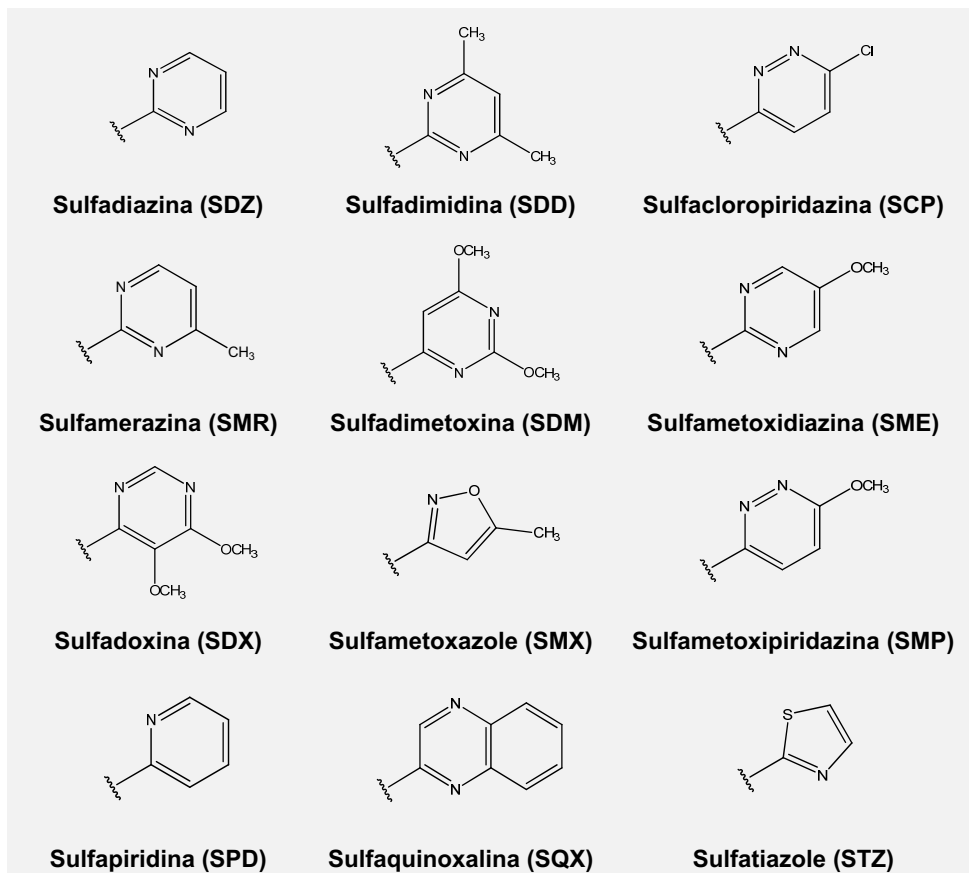


Figura 1.6. Estructura general de les sulfamides i del seu precursor.



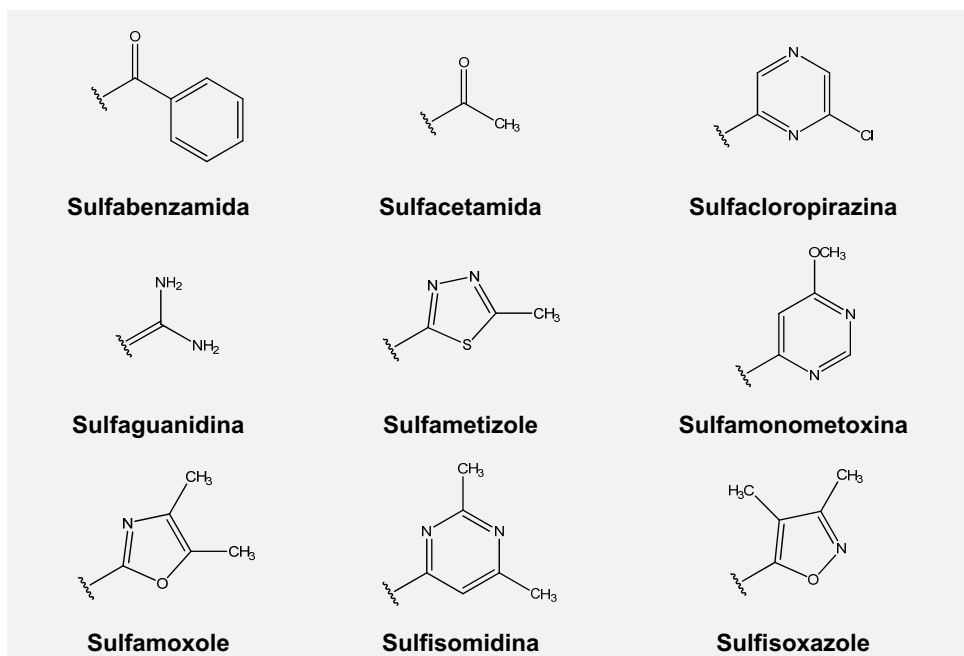


Figura 1.7. Substitucions (R) en el grup sulfonamido de les sulfamides estudiades en aquesta tesi.

1.1.2.2. Diaminopirimidines

Actualment, l'ús de les sulfamides soles és excepcional a causa de la seva baixa activitat comparada amb la d'altres agents antimicrobians i l'elevada resistència desenvolupada. No obstant, l'administració de manera conjunta amb components sintètics de la família de les diaminopirimidines, com ara el trimetoprim, potencia la seva activitat (Figura 1.8). Ambdós grups actuen per separat com a agents bacteriostàtics però en combinació són capaços d'exercir un efecte bactericida.

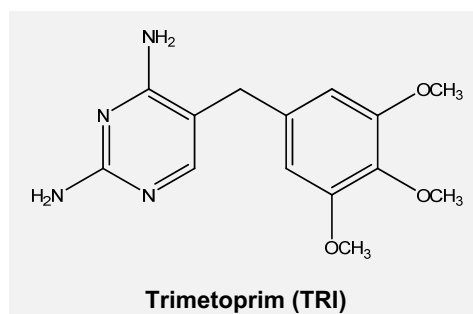


Figura 1.8. Estructura de la diaminopirimidina estudiada.

El trimetoprim actua inhibint la síntesi dels àcids nucleics mitjançant la inhibició de l'enzim dihidrofolat reductasa que intervé en el metabolisme de l'àcid fòlic. El seu mecanisme d'acció és, per tant, similar al de les sulfamides, però actua en una etapa diferent (Figura 1.5). El bloqueig seqüencial de la mateixa via metabòlica per part de sulfamides i diaminopirimidines confereix a ambdós grups un efecte sinèrgic altament eficaç enfront d'un ampli espectre de microorganismes [11, 12].

1.1.2.3. Quinolones

Les quinolones són, des d'un punt de vista farmacològic, agents antimicrobians d'origen sintètic, bactericides i amb un ampli ventall d'acció. Aquestes han estat àmpliament emprades, tant en medicina humana com en veterinària, la qual cosa ha conduït a l'aparició d'alts nivells de resistència bacteriana. En producció animal s'utilitzen en el tractament d'infeccions urinàries, digestives i respiratòries causades per bacteris.

Les quinolones actuen inhibint la síntesi dels àcids nucleics per mitjà de la inhibició d'enzims indispensables per a la replicació i la transcripció del DNA bacterià [13]. Químicament, són estructures bicícliques heteroaromàtiques, amb un nitrogen en la posició 1, un grup carboxil lliure en la posició 3 i un grup carbonil en la posició 4 (Figura 1.9).

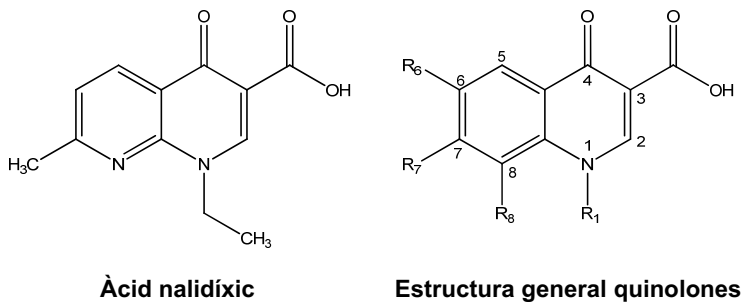


Figura 1.9. Estructura bàsica de les quinolones i del seu precursor.

La presència dels grups carboxil i carbonil són fonamentals per a la seva activitat antibacteriana ja que són els que permeten la unió de les quinolones als enzims bacterians. A més, perquè el nucli bicíclic sigui actiu i la molècula tingui activitat biològica és necessari que el nitrogen de la posició 1 incorpori una cadena lineal o

cíclica. D'altra banda, els grups carbonil i carboxil conjugats són susceptibles de formar complexos amb cations metàl·lics divalents (Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.), fet que disminueix l'adsorció de les quinolones i per consegüent, la seva acció bactericida.

La primera quinolona sintetitzada i emprada com a agent antiinfecció va ser l'àcid nalidíxic l'any 1962 (Figura 1.9). Tanmateix, aquest compost presentava una baixa penetració intracel·lular i un espectre bacterià reduït. La relació existent entre l'estructura química i l'activitat biològica d'aquestes molècules ha motivat constantment la síntesi de compostos amb substituents diferents en l'estructura bàsica. La importància d'aquesta família d'agents antimicrobians rau, per tant, en les modificacions estructurals que, a partir de finals dels anys setanta, es varen introduir en la molècula d'àcid nalidíxic, donant lloc a un gran nombre d'agents antibacterians [14]. Així doncs, les quinolones, es poden classificar, segons s'indica en la Taula 1.2, en quatre grups o generacions en funció del moment de la seva síntesi i els radicals emprats per tal d'ampliar el seu espectre d'activitat antimicrobiana [15].

Taula 1.2. Classificació de les quinolones per generacions.

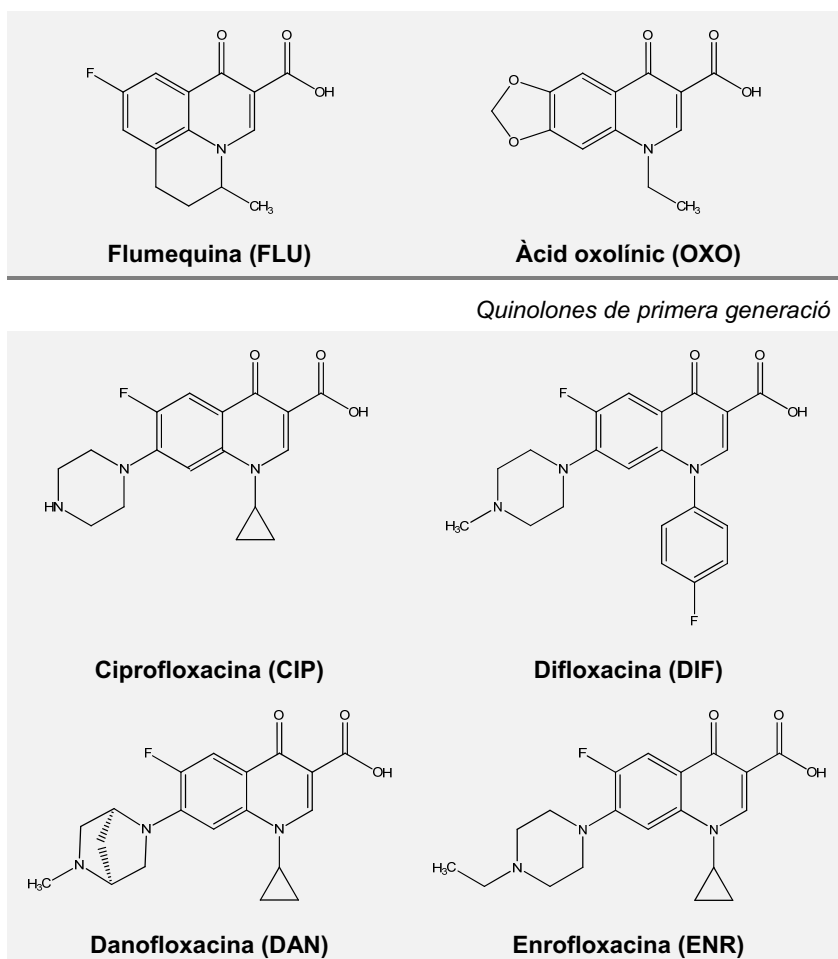
Quinolones	Exemples
Primera generació	
Serien històricament les molècules més antigues, les quals defineixen els nuclis químics bàsics d'aquesta família d'agents antimicrobians. Es caracteritzen estructuralment per l'absència d'un àtom de fluor en la posició 6, a excepció de la flumequina, i pel seu reduït espectre d'activitat.	Àcid nalidíxic Àcid oxolínic* Àcid pipemidic Flumequina*
Segona generació	
Es caracteritzen fonamentalment per la presència d'un àtom de fluor en la posició 6 i d'un grup piperazinil o metil piperazinil en la posició 7 de la molècula, donant lloc a les denominades fluoroquinolones. La incorporació del fluor va representar un augment significatiu en l'activitat antibacteriana, mentre que el substituent de la posició 7 va permetre millorar les propietats farmacocinètiques. En posició 1 els substituents més importants són un grup ciclopropil o un anell benzènic mono o difluorat.	Ciprofloxacina* Danofloxacina* Difloxacina* Enoxacina Enrofloxacina* Lomefloxacina Marbofloxacina* Norfloxacina* Ofloxacina Sarafloxacina*

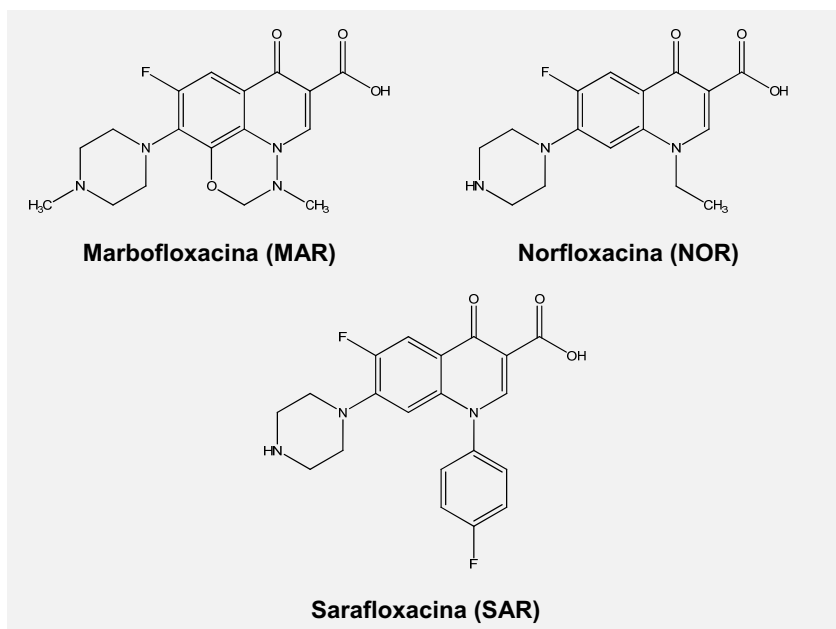
Tercera i quarta generació

Les quinolones que pertanyen a aquestes generacions expandeixen el seu espectre d'activitat. Mantenen el fluor en la posició 6 però presenten diferències estructurals en les posicions 7 i 8, que contenen substituents com pirrolidines i aminopirrolidines o halògens (fluor o clor), respectivament.

* Quinolones estudiades en aquesta tesi.

La primera generació de quinolones, àcid oxolínic i flumequina, van ser aprovades per al seu ús en producció animal a l'inici dels anys 1980 i les fluoroquinolones a finals de la mateixa dècada i principis de 1990 [16]. L'estructura de les quinolones estudiades en la present tesi es mostra a la Figura 1.10.





Quinolones de segona generació

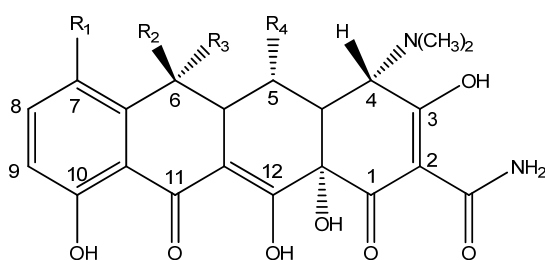
Figura 1.10. Estructura de les quinolones estudiades.

1.1.2.4. Tetraciclines

Les tetraciclines són agents bacteriostàtics d'origen natural o semisintètic. El seu ampli espectre d'activitat envers bacteris i protozous, juntament amb el seu baix cost, ha comportat que siguin els agents antimicrobians més emprats en medicina veterinària. S'utilitzen en el tractament d'infeccions respiratòries, gastrointestinals, genitourinàries i de la pell.

Els primers membres d'origen natural d'aquesta família d'agents antimicrobians van ser descoberts a finals dels anys quaranta (clortetraciclina i oxitetraciclina). Altres tetraciclines es van identificar posteriorment, ja sigui com a molècules naturals (tetraciclina i demeclociclina) o com a productes semisintètics (metaciclina, doxiciclina i minociclina). En els darrers anys, a més, l'aparició de soques de bacteris resistents i de nous agents antimicrobians més eficaços en altres famílies i amb una millor tolerància, ha portat al desenvolupament d'una tercera generació de tetraciclines semisintètiques, les gliciliclines, per tal de restablir el potencial de la seva activitat [17].

Les tetraciclines actuen inhibint la síntesi de proteïnes bacterianes mitjançant la unió reversible a la subunitat ribosomal 30S dels bacteris i impeding la incorporació d'aminoàcids [12]. La seva estructura consta d'un nucli tetracíclic lineal (quatre anells benzènics), on s'uneixen diferents grups funcionals (Figura 1.11). Les diferències entre anàlegs rauen principalment en els substituents de les posicions 5, 6 i 7. Les glicilciclines presenten a més substitucions en la posició 9. Tant el tipus de grups funcionals, com la configuració estereoquímica dels mateixos, són fonamentals a l'hora de definir la seva activitat biològica. Són també agents quelants forts i, per tant, les seves propietats antibacterianes i farmacocinètiques es veuen alhora influenciades per la formació de complexos amb cations metàl·lics com ara Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} i Fe^{2+} . Entre les que es troben disponibles comercialment, la clortetraciclina, la doxiciclina, l'oxitetraciclina i la tetraciclina són les més administrades en animals de producció (Figura 1.11) [18].



Estructura general tetraciclina

		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Clortetraciclina	CTC	Cl	CH ₃	OH	H
Doxiciclina	DC	H	H	CH ₃	OH
Oxitetraciclina	OTC	H	CH ₃	OH	OH
Tetraciclina	TC	H	CH ₃	OH	H

Figura 1.11. Estructura bàsica de les tetraciclina i de les tetraciclina estudiades.

1.1.2.5. Penicil·lines

Les penicil·lines són agents antimicrobians d'origen natural o semisintètic, bactericides i d'ampli espectre d'acció. Pertanyen, juntament amb les

cefalosporines, els monobactams i els carbapenems, a la família dels β -lactàmics. Aquests constitueixen el grup més nombrós dins l'arsenal terapèutic i probablement el més emprat en medicina veterinària, per la qual cosa l'aparició de resistències ha esdevingut un problema d'ençà que es varen introduir en la pràctica clínica [19].

El seu mecanisme d'acció es basa en la inhibició de la síntesi de la paret cel·lular bacteriana mitjançant el bloqueig dels enzims implicats en l'organització estructural del seu principal component (peptidoglicà) [10]. Les penicil·lines deriven de l'àcid 6-aminopenicil·lànic, constituït per un anell β -lactàmic unit a un anell tiazolidínic (Figura 1.12). La substitució a la cadena lateral del grup amino en posició 6 és la que defineix l'espectre antimicrobià i les propietats farmacològiques de cada un dels components de la família. El primer en ser descobert va ser la penicil·lina G l'any 1928 per Alexander Fleming.

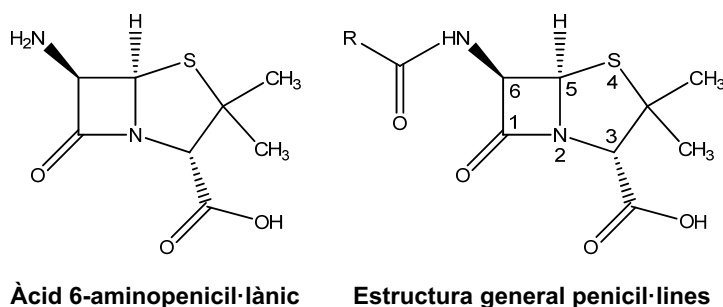
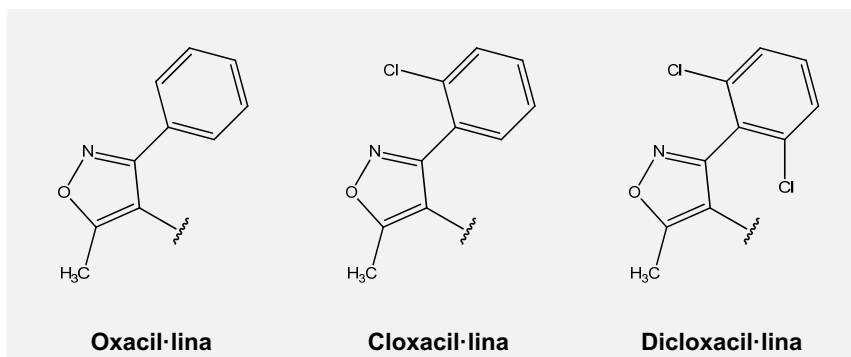


Figura 1.12. Estructura general de les penicil·lines i del seu precursor.

En la Figura 1.13 es mostra l'estructura química de les diferents penicil·lines estudiades en la present tesi.



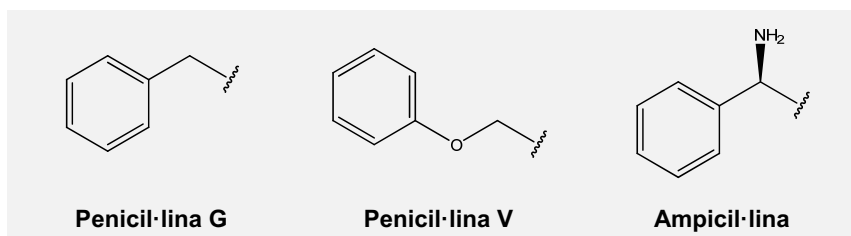


Figura 1.13. Substitucions (R) a la cadena lateral del grup amino de les penicil·lines estudiades.

1.1.2.6. Macròlids

Els macròlids són una àmplia família d'agents antimicrobians bacteriostàtics, naturals o semisintètics i d'ampli espectre d'acció. No obstant, a concentracions elevades, en medi alcalí o enfront de determinats bacteris poden comportar-se com a bactericides [20]. El primer macròlid natural obtingut va ser l'eritromicina l'any 1952. Posteriorment, se'n varen obtenir altres de naturals, a partir dels quals s'han desenvolupat una gran quantitat de macròlids semisintètics amb l'objectiu de millorar la seva activitat i estabilitat.

Els macròlids s'uneixen de manera reversible a la subunitat 50S ribosòmica i inhibeixen la síntesi de proteïnes per mitjà del bloqueig de la formació d'enllaços peptídics. Químicament, són molècules complexes formades per un anell lactònic macrocíclic, de 12 a 16 àtoms de carboni, unit mitjançant enllaços glicosídics a dos o més aminosucreb bàsics o neutres [21].

L'espíramicina va ser el primer macròlid emprat en veterinària a l'inici de la dècada de 1960, seguit de l'eritromicina i la tilosina a principis dels anys setanta (Figura 1.14). Al mateix temps, l'espíramicina i la tilosina es van començar a utilitzar com a promotors de creixement fins a la seva prohibició a la UE l'any 1999 com a additius en l'alimentació animal a causa de les resistències creuades amb d'altres macròlids emprats en medicina humana [22]. L'ús d'aquests tres macròlids amb finalitats terapèutiques i profilàctiques es troba encara autoritzat a diferents estats membres de la UE, entre ells Espanya. S'administren per al tractament de malalties infeccioses respiratòries i gastrointestinals. A través dels pinsos solen administrar-se en combinació amb d'altres agents antimicrobians com ara la colistina o alguns aminoglicòsids, però també sulfamides, trimetoprim o oxitetraciclina [23].

1.1.2.7. Amfenicols

Els amfenicols o fenicols són agents antimicrobians naturals, d'ampli espectre i bacteriostàtics, tot i que a concentracions elevades poden actuar com a bactericides. El cloramfenicol va ser el primer a obtenir-se de manera natural l'any 1947, tot i que actualment es produeix sintèticament. Altres compostos de la família són el tiamfenicol i el florfenicol. Tots ells exerceixen el seu efecte inhibint la síntesi de proteïnes mitjançant la unió reversible a la subunitat 50S del ribosoma bacterià. Eviten la formació d'enllaços peptídics i el seu lloc de fixació al ribosoma és molt proper al dels macròlids i les lincosamides, fet que afavoreix la inhibició competitiva entre si [11].

Atès el seu perfil de toxicitat, el cloramfenicol és considerat un fàrmac de risc per a la salut humana. El seu ús en veterinària està, per tant, prohibit a la UE i en nombrosos països com ara els Estats Units d'Amèrica (EUA), Austràlia i Canadà, entre d'altres, des de finals de la dècada de 1980 i principis de 1990 [24]. El florfenicol que no presenta el grup nitro en posició para, responsable de la toxicitat del cloramfenicol, és el compost emprat actualment com a substitut (Figura 1.15).

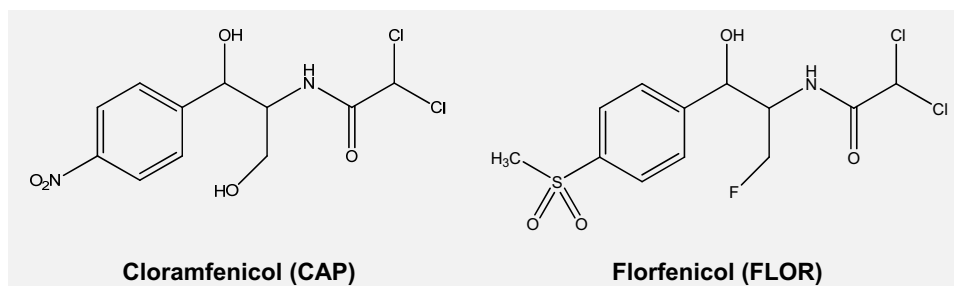


Figura 1.15. Estructura dels amfenicols estudiats.

1.1.2.8. Lincosamides

Les lincosamides són un grup d'agents antimicrobians d'origen natural, tot i que actualment s'obtenen mitjançant síntesi química. Poden ser bacteriostàtics o bactericides, depenent de la seva concentració i de l'espècie bacteriana de què es tracti [11]. La lincomicina va ser el primer compost aïllat, l'any 1962 (Figura 1.16). Modificacions posteriors de la seva estructura varen donar lloc a nous compostos de la família, com la pirlimicina i la clindamicina. Presenten propietats biològiques

similars a les dels macròlids, però amb estructura bàsica totalment diferent, la qual consta d'un aminoàcid unit a un aminosucre. Les lincosamides actuen inhibint la síntesi proteica per bloqueig de la formació d'enllaços peptídics a l'unir-se a la subunitat ribosòmica 50S. Tenen doncs, el mateix lloc diana a la subunitat 50S que els macròlids i els amfenicols.

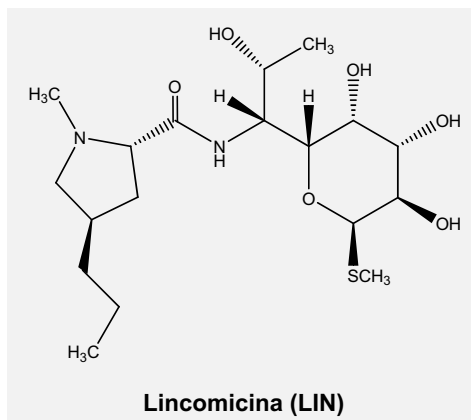


Figura 1.16. Estructura de la lincosamida estudiada.

Actualment, a la UE només dues lincosamides, la lincomicina i la pirlimicina, estan autoritzades en espècies animals destinades a la producció d'aliments. S'utilitzen com a substàncies alternatives als macròlids per al tractament de malalties respiratòries i gastrointestinals. La lincomicina s'administra per via oral, parenteral o intramamària, sovint en combinació amb d'altres agents antimicrobians com ara l'espectinomomicina i la neomicina de la família dels aminoglicòsids o la sulfadiazina quan s'afegeix als pinsos. En el cas de la pirlimicina només l'administració intramamària està permesa [23].

1.1.2.9. Polipèptids

El grup d'agents antimicrobians polipeptídics inclou compostos com la bacitracina i les polimixines (polimixina B i polimixina E també anomenada colistina). La bacitracina, estudiada en aquesta tesi, és un agent bactericida d'origen natural aïllat per primera vegada l'any 1945 que actua en les fases inicials de la síntesi del peptidoglicà de la paret cel·lular bacteriana. És una mescla complexa de polipèptids cíclics (A-G), el component majoritari de la qual és la bacitracina A (Figura 1.17). La forma més emprada és la salt de zinc a causa de la seva major estabilitat.

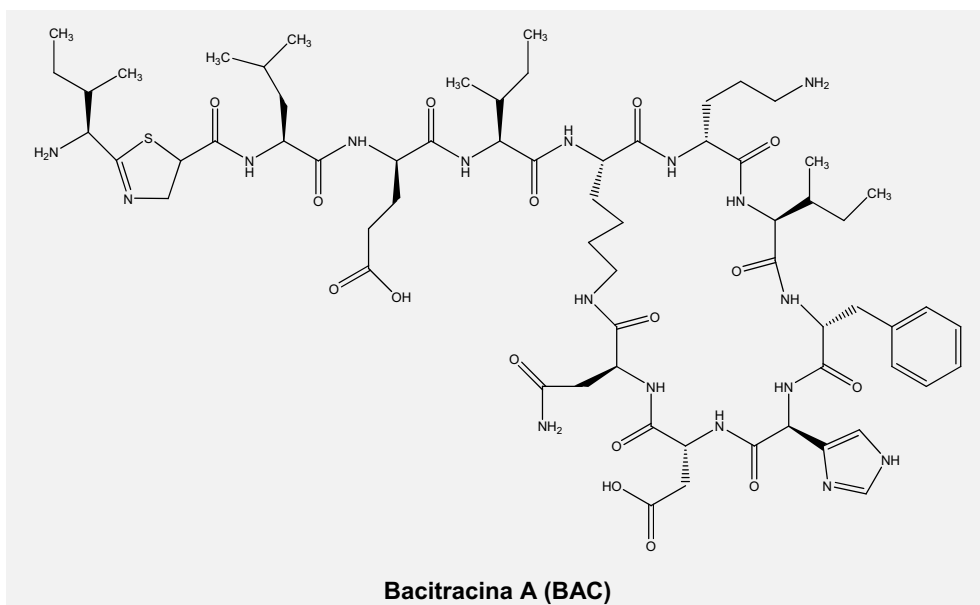


Figura 1.17. Estructura del polipèptid estudiat.

A la UE, l'autorització de l'ús de la bacitracina com a additiu promotor del creixement en pinsos va ser revocada l'any 1999, juntament amb l'espíramicina i la tilosina, per tal de preservar la seva eficàcia com a agent terapèutic en medicina humana [22].

1.1.2.10. Nitrofurans

Els nitrofurans són agents antimicrobians sintètics, bacteriostàtics i d'ampli espectre. Tot i actuar principalment contra bacteris, alguns protozous també són sensibles a la seva acció. Els cinc compostos principals d'aquesta família són la furaltadona, la furazolidona, la nitrofurazona, la nitrofurantoïna i el nifursol. La seva estructura consta d'un anell heterocíclic de 5 membres amb un grup nitro (NO_2) en la posició 5. Els seu efecte es basa en la reducció del grup nitro al citoplasma bacterià amb la consegüent generació de derivats tòxics capaços de danyar el DNA per un mecanisme no del tot conegut. Al mateix temps, sembla ser que també interfereixen en la síntesi de proteïnes a l'unir-se a la subunitat 30S del ribosoma bacterià [10].

A finals de la dècada de 1980 i principis dels anys 1990, es va prohibir l'ús dels nitrofurans en animals destinats a la producció d'aliments a la UE i en nombrosos països com ara els EUA, Austràlia, Japó, Canadà i la Xina, a causa de la seva toxicitat [24]. El nifursol però, no va ser prohibit a la UE fins l'any 2002 [25]. Aquest, juntament amb la furaltadona, han estat els dos nitrofurans estudiats en la present tesi (Figura 1.18). Tot i la prohibició, un estudi recent demostra que a la Xina alguns nitrofurans són encara administrats de manera il·lícita a través dels pinsos [26].

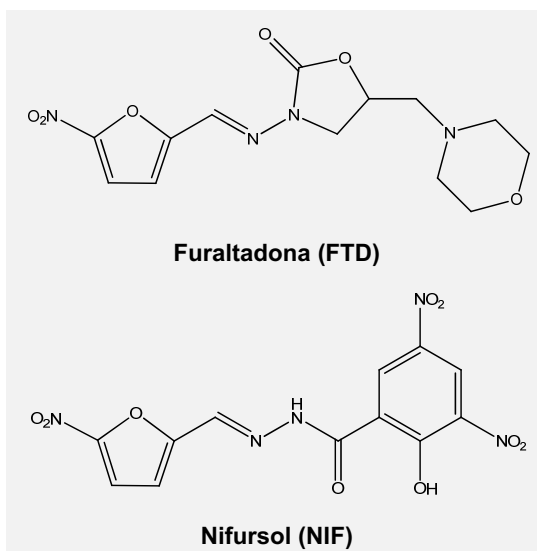


Figura 1.18. Estructura química dels nitrofurans estudiats.

1.1.2.11. Quinoxalines

Les quinoxalines són agents antimicrobians sintètics actius contra bacteris i alguns protozoous. La seva activitat s'atribueix a la inhibició de la síntesi del DNA per mitjà d'un mecanisme no del tot conegut. No obstant, com en el cas dels nitrofurans, es postula que radicals lliures produïts en la reducció intracel·lular d'aquests compostos podrien inhibir la síntesi de nou DNA i danyar el ja existent [24].

Les dues quinoxalines més emprades en veterinària, el carbadox i l'olaquindox (Figura 1.19), van ser prohibides a la UE a partir de l'any 1999 a causa de la seva toxicitat [27]. Això no obstant, el carbadox encara està autoritzat als EUA i l'olaquindox a Austràlia, on s'utilitzen en el tractament de malalties digestives en porcs.

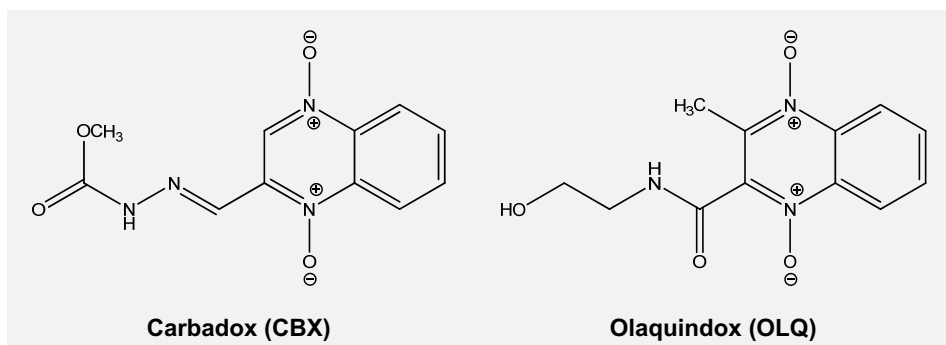


Figura 1.19. Estructura de les quinoxalines estudiades.

1.1.2.12. Pleuromutilines

Les pleuromutilines són agents antibacterians bacteriostàtics d'origen natural o semisintètic. El primer compost natural aïllat d'aquesta família fou la pleuromutilina, de la qual en derivaren posteriorment altres de semisintètics com la tiamulina i la valnemulina (Figura 1.20). El seu mecanisme d'acció es basa en la inhibició de la síntesi de proteïnes a l'unir-se a la subunitat 50S del ribosoma bacterià i inhibir l'enzim peptidil transferasa encarregat de la formació d'enllaços peptídics entre aminoàcids adjacents. No presenten aplicació en medicina humana.

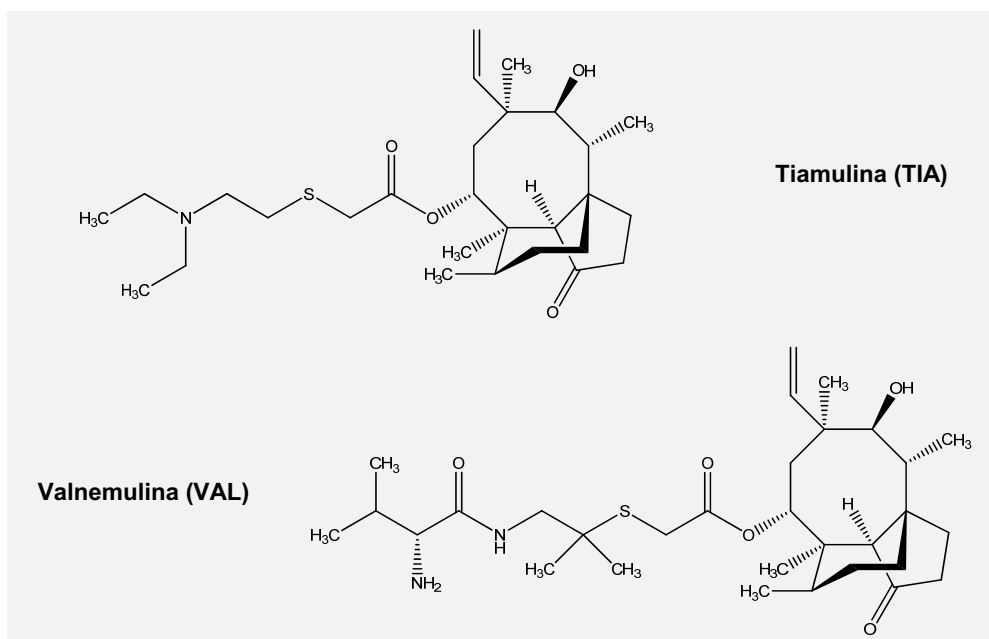


Figura 1.20. Estructura de les pleuromutilines estudiades.

La tiamulina i la valnemulina van ser aprovades per al seu ús exclusiu en medicina veterinària els anys 1979 i 1999, respectivament. S'administren per via oral o parenteral en el tractament d'infeccions respiratòries i intestinals, especialment en porcs i en menor mesura en aus i conills [28].

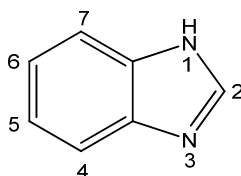
1.1.3. Agents antiparasitaris

Els agents antiparasitaris es troben, juntament amb els agents antibacterians, entre les classes d'agents antimicrobians més emprades en medicina veterinària [3]. Aquests són capaços d'eliminar i/o inhibir el creixement i la proliferació de paràsits. Dins dels agents emprats en el tractament de paràsits interns (endoparàsits) s'inclouen dos grans grups de fàrmacs: els antihelmíntics i els antiprotozoaris, entre els quals destaquen els benzimidazoles i els coccidiostàtics, respectivament.

1.1.3.1. Benzimidazoles

Els benzimidazoles són agents antiparasitaris emprats per combatre les infeccions intestinals causades per helmints o cucs (helminthiasis). Actuen interferint en el metabolisme energètic del paràsit inhibint l'absorció de glucosa, fet que comporta la mort de l'helminth per inanició. El primer compost de la família en ser descobert fou el tiabendazole l'any 1961.

La seva estructura bàsica consta d'un anell benzimidazole, el qual en els diferents compostos actius presenta modificacions en les posicions 2 i 5 o en ambdues alhora (Figura 1.21) [29]. Els tres benzimidazoles estudiats en la present tesi han estat el fenbendazole, el flubendazole i l'oxibendazole (Figura 1.22).



Anell benzimidazole

Figura 1.21. Estructura bàsica dels benzimidazoles.

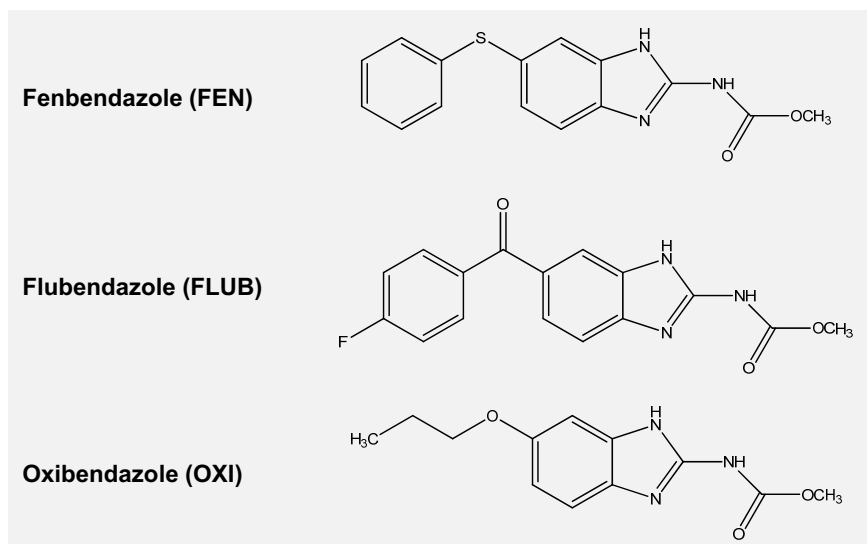


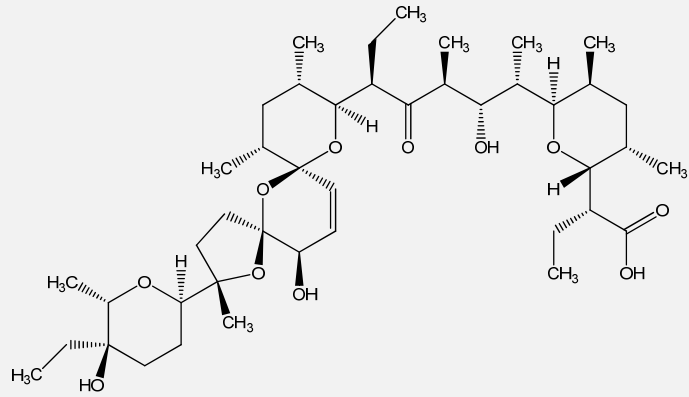
Figura 1.22. Estructura química dels benzimidazoles estudiats.

1.1.3.2. Coccidiostàtics

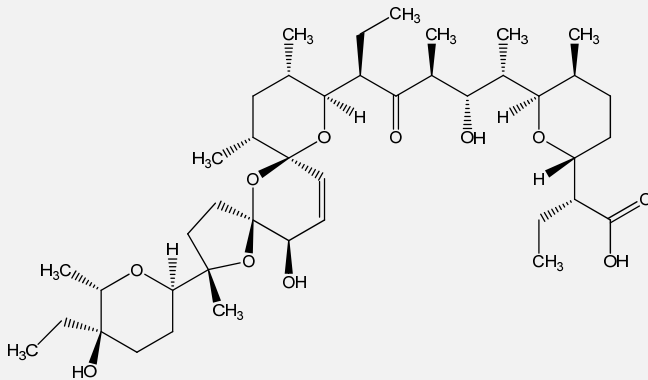
Els coccidiostàtics són agents antiparasitaris eficaços per combatre la coccidiosi, és a dir, les infeccions intestinals causades per protozous de l'ordre dels coccidis. Aquests poden classificar-se en dos grans grups: els ionòfors i els no ionòfors.

Els ionòfors són els coccidiostàtics d'origen natural obtinguts per fermentació. El primer en ser descobert va ser el lasalocid l'any 1951, seguit de la monensina, la salinomicina i la narasina al 1967, 1972 i 1975, respectivament (Figura 1.23). Posteriorment se'n descobriren altres com la maduramicina i la semduramicina. El primer en ser introduït en producció animal fou la monensina als anys setanta. Són àcids carboxílics polièters formats per una seqüència d'anells de tetrahidrofur i tetrahidropiran. Actuen alterant la integritat de la membrana i pertorbant les condicions d'osmolaritat interna. Concretament, interfereixen en els sistemes de transport d'ions a través de la membrana augmentant el flux de cations monovalents (K^+ i Na^+) i divalents (Mg^{2+} i Ca^{2+}) cap a l'interior de les cèl·lules, provocant-ne l'acumulació i per consegüent la mort dels coccidis. Aquest fet és possible gràcies a la conformació macrocíclica que adopten: hidròfila a l'interior, amb els grups polars orientats cap endins que els permeten incorporar els cations, i hidrofòbica en l'exterior, amb els grups no polars orientats cap enfora que els permeten creuar la bicapa lipídica. Són, per tant, macromolècules poc solubles en aigua.

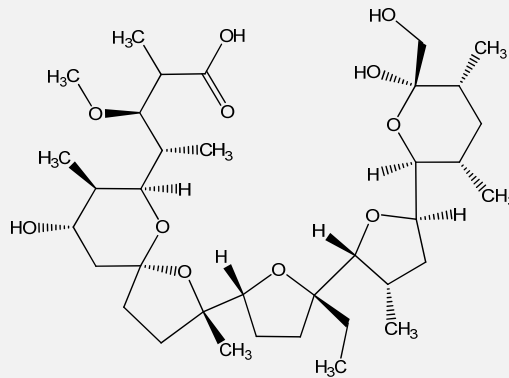
Narasina (NAR)



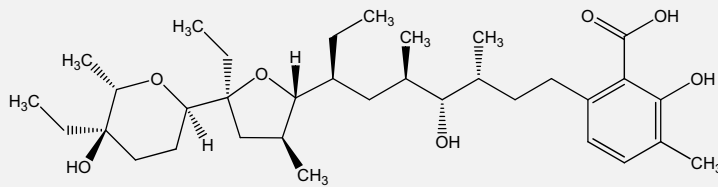
Salinomicina (SAL)



Monensina (MON)

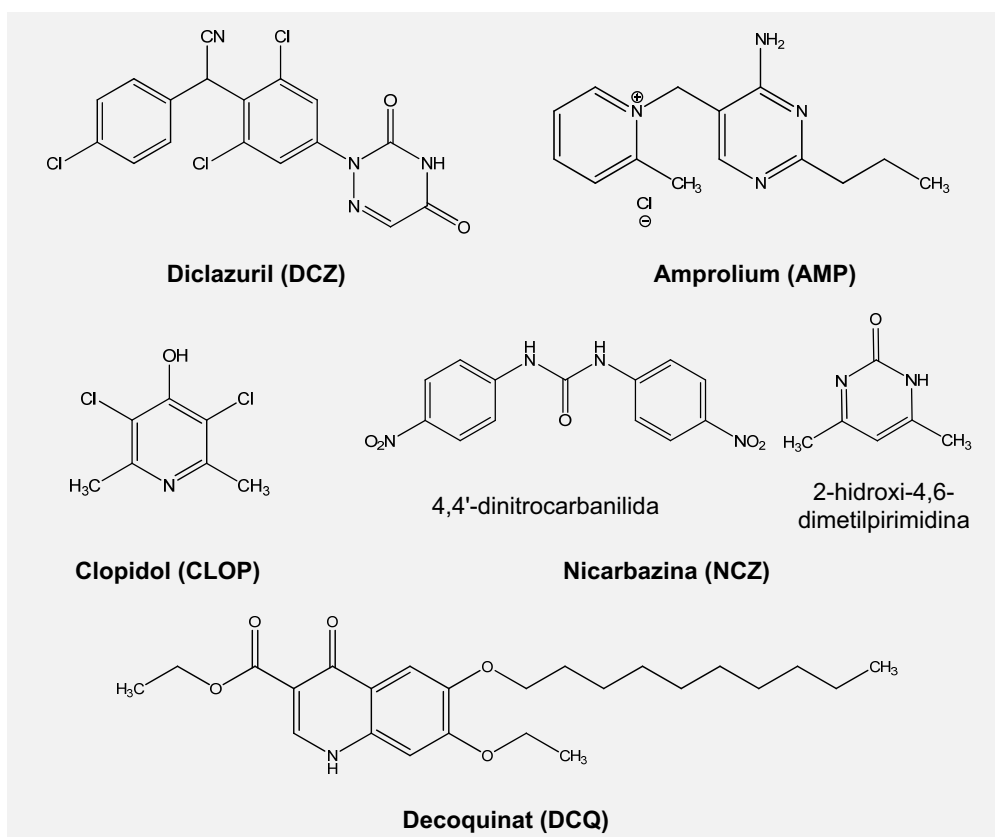


Coccidiostàtics ionòfors monovalents



Lasalocid (LAS)

Coccidiostàtic ionòfor divalent



Coccidiostàtics no ionòfors

Figura 1.23. Estructura dels coccidiostàtics estudiats.

D'altra banda, els coccidiostàtics no ionòfors són produïts per síntesi química. Pertanyen a famílies molt diverses, i per tant, presenten mecanismes d'acció diferents i sovint poc estudiats i/o coneguts. En la Figura 1.23 es mostra l'estructura dels coccidiostàtics no ionòfors estudiats. El diclazuril, el decoquinat, el clopidol (també anomenat metilclorpidol) i la nicarbazina pertanyen a la família dels acetonitrils de benzè, les quinolones, les piridones i les carbanilides, respectivament, mentre que l'amprolium és un anàleg de la tiamina [30].

La coccidiosi és una malaltia que afecta principalment les aus de corral (gallines, pollastres, galls d'indi, etc.) i els conills, i en menor proporció els porcins i els bovins. És altament contagiosa i de no controlar-se pot comportar la mort de les espècies més sensibles. Per evita-ho, els coccidiostàtics són administrats com a additius en els pinsos de manera continuada des dels primers dies de vida, ja que són capaços d'inhibir la reproducció dels paràsits però no d'eliminar-los totalment. El motiu pel

qual la UE no va prohibir, a través del Reglament (CE) 1831/2003 [6], el seu ús com a additiu a partir de l'any 2006 rau en el fet que la seva funció profilàctica preval sobre la seva activitat en la microflora intestinal, la qual es considera secundària i residual, mentre que en el cas dels agents antibacterians la seva activitat principal era la de promoure el creixement. A més, els coccidiostàtics autoritzats en producció animal no presenten aplicació en humans i fins al moment, no s'han trobat indicis de resistències creuades amb d'altres agents antimicrobians emprats en medicina humana o veterinària. No obstant, el mateix reglament indicava la possibilitat d'una supressió progressiva de l'ús dels coccidiostàtics i histomonòstats com a additiu a partir del 2013, decisió que finalment la Comissió Europea va considerar com a inapropiada arran d'un informe presentat l'any 2008 [31]. Aquest informe posava de manifest que la incidència de la coccidiosi és tal que a dia d'avui es troba present en la majoria de les explotacions d'aviram i que la prohibició de l'ús dels coccidiostàtics pot comprometre seriosament la productivitat i la viabilitat econòmica del sector. A més, exposava que les alternatives disponibles no ofereixen els mateixos avantatges que es deriven de l'administració de coccidiostàtics com a additiu. Es va concloure, per tant, que en aquestes circumstàncies la disponibilitat i l'ús continu dels coccidiostàtics com a mesura preventiva per al control de la coccidiosi resulta essencial d'una banda, per contribuir a un alt nivell de protecció de la salut i el benestar dels animals i d'altra banda, per produir aliments d'acord amb els estàndards de la UE en matèria de seguretat alimentària. Actualment hi ha 11 coccidiostàtics autoritzats (6 ionòfors i 5 no ionòfors) en el registre d'additiu en pinsos de la UE (Taula 1.3) [32].

Taula 1.3. Coccidiostàtics autoritzats com a additiu per a l'alimentació animal [32].

Ionòfors	No ionòfors
Monensina*	Diclazuril*
Narasina*	Decoquinat*
Lasalocid*	Nicarbazina*
Salinomicina*	Robenidina
Maduramicina	Halofuginona
Semduramicina	

* Estudiats en aquesta tesi.

A diferència del que succeeix amb els agents antibacterians, la producció i l'ús de coccidiostàtics és difícil de quantificar ja que són pocs els països que en fan públiques les dades o bé aquestes són de difícil accés. Dades publicades per alguns estats membres de la UE reflecteixen grans diferències de consum. Així per exemple, mentre que l'any 2012 al Regne Unit les vendes de coccidiostàtics es van estimar en 301 tones, a països nòrdics com Noruega i Suècia el consum va ser de només 12 i 15 tones, respectivament [33-35]. De manera global, s'estima que l'any 2006 un 45 % dels pinsos fabricats a la UE-27 per a l'alimentació d'aus contenia coccidiostàtics [31].

1.1.4. Perills derivats de l'ús d'agents antimicrobians en medicina veterinària

L'administració correcta d'agents antimicrobians en producció animal resulta beneficiosa tant en termes econòmics com sanitaris, amb la consegüent repercussió en la salubritat dels aliments. Això no obstant, l'ús inadequat o fins i tot fraudulent d'aquestes substàncies amb efecte farmacològic comporta una sèrie de perills tant per a la salut de les persones com per a la salut i el benestar dels animals.

1.1.4.1. Resistència microbiana

La resistència microbiana és la capacitat que tenen els microorganismes de resistir als efectes d'un agent antimicrobià. Microorganismes prèviament sensibles a la seva acció poden adquirir o desenvolupar mecanismes adaptatius que li permetin sobreviure en la seva presència. Si bé ja hi ha una resistència natural als agents antimicrobians abans de la seva introducció en el tractament mèdic, s'accepta generalment que el seu ús en animals d'abastament contribueix a l'increment de soques de microorganismes resistents d'importància en patologia humana i animal. D'una banda, la generació de resistències microbianes en els animals augmenta el seu patiment i mortalitat, i provoca pèrdues de producció i costos suplementaris. D'altra banda, la selecció de microorganismes resistents en animals poden transmetre's als humans, a través de la cadena alimentària o per contacte amb els animals, i disminuir l'eficàcia d'agents antimicrobians emprats en medicina humana. A més, generalment la resistència desenvolupada a un agent antimicrobià no es

limita únicament a aquest en particular, sinó que s'estén també a altres compostos estructuralment anàlegs de la mateixa família o bé, a agents antimicrobians d'altres classes estructuralment diferents però que comparteixen el mateix punt d'actuació (resistència creuada) [36].

En els últims anys, l'aparició i propagació de resistències s'ha convertit en un problema ja que cal variar les estratègies de tractament i utilitzar nous antimicrobians cada vegada més selectius. Aquesta situació però, no és sostenible ja que per al descobriment i comercialització de noves molècules són necessaris entre 15 i 20 anys de recerca, situació que fa impossible disposar de nous medicaments amb la rapidesa que requereix l'aparició de microorganismes resistents.

L'any 2007, l'Organització Mundial de la Salut (OMS) i l'Organització Mundial de Sanitat Animal (OIE, de *Office International des Epizooties*) van elaborar una llista sobre la importància de les diferents classes d'agents antimicrobians en el tractament de les malalties en medicina humana i veterinària, respectivament. En la Taula 1.4 es recull la llista corresponent a medicina veterinària. Les famílies es van classificar com d'importància crítica, d'importància elevada i d'importància.

Taula 1.4. Classificació dels agents antimicrobians emprats en medicina veterinària en funció de la seva importància en el tractament de les malalties animals.

Importància crítica	Importància elevada	Importants
Tetraciclines*	Rifamicines	Biciclomicina
Sulfamides	Fosfomicina	Àcid fusídic
Quinolones*	Ionòfors	Novobiocina
Macròlids*	Lincosamides	Ortosomicines
Amfenicols	Pleuromutilines	Quinoxalines
Aminoglicòsids*	Polipèptids	Estreptogramines
Cefalosporines*		
Penicil·lines*		

* També classificades com a d'importància crítica en medicina humana.

La comparació d'ambdues llistes mostra que la major part de les famílies s'utilitzen tant en els humans com en els animals productors d'aliments. A més, algunes famílies són considerades d'importància crítica en ambdues llistes. Aquest solapament posa de manifest la necessitat de dur a terme una vigilància de la resistència microbiana i la de preservar l'eficàcia dels agents antimicrobians. Amb aquest objectiu, la UE ha adoptat diverses mesures, entre les quals es troba la ja mencionada prohibició del seu ús com a additius promotors del creixement en l'alimentació animal (apartat 1.1.1).

1.1.4.2. Residus en aliments d'origen animal

L'ús d'agents antimicrobians en animals d'abastament pot determinar la presència de residus d'aquestes substàncies o dels seus metabòlits en els aliments per al consum humà que se'n deriven (carn, llet, ous, etc.). D'una banda, l'exposició continuada a traces d'aquests fàrmacs a través dels aliments pot provocar efectes tòxics sobre l'organisme i reaccions al·lèrgiques adverses, especialment en persones hipersensibles. D'altra banda, la incorporació de residus d'agents antimicrobians a la cadena alimentària proporciona un mitjà idoni per al desenvolupament de resistències microbianes en els humans.

Per tal de garantir la salut dels consumidors, en el Reglament (CE) 470/2009 [37] s'estableixen procediments comunitaris per a la fixació de límits màxims de residu (MRL, de *maximum residue limit*) de substàncies farmacològicament actives en aliments d'origen animal. Els MRL es fixen per a cada combinació d'espècie animal i teixit (múscul, fetge, ronyó, etc.) o producte (llet, ous, etc.) en funció dels riscos toxicològics, la contaminació mediambiental i els efectes microbiològics i farmacològics no desitjats dels residus. D'acord amb la Directiva 2001/82/CE [2], els MRL són els valors de referència per a la determinació del temps d'espera, és a dir, del període de temps necessari entre l'última administració del medicament a un animal, en les condicions normals d'ús, i l'obtenció de productes alimentaris d'aquest animal que no continguin residus en quantitats que superin els MRL fixats en el Reglament (UE) 37/2010 [38]. En aquest mateix reglament s'estableixen les substàncies farmacològicament actives emprades en medicaments veterinaris i la seva classificació en dues categories: autoritzades i prohibides (Taula 1.5). Per a les substàncies permeses s'estableix un MRL, el qual haurà d'adaptar-se

permanentment en funció de l'evolució dels coneixements científics i tècnics de que es disposi. En el cas de les substàncies no autoritzades, per a les quals la tolerància legal és zero (no MRL fixat), s'estableix l'anomenat límit mínim de funcionament exigít (MRPL, de *minimum required performance limit*). El MRPL es defineix com la concentració mínima a la qual una substància prohibida ha de ser detectada i confirmada.

Taula 1.5. Classificació de les substàncies farmacològicament actives respecte als MRL en els aliments d'origen animal [38].

Annex Reglament (UE) 37/2010
1. Substàncies autoritzades
Substàncies farmacològicament actives (en ordre alfabètic) per a les quals:
<ul style="list-style-type: none">• S'ha fixat un MRL.• No és necessari fixar un MRL.• S'ha fixat un MRL provisional.
2. Substàncies prohibides
Substàncies farmacològicament actives per a les quals no es possible establir un MRL perquè els seus residus, sigui quin sigui el seu límit, constitueixen un risc per a la salut humana:
<ul style="list-style-type: none">• <i>Aristolochia spp.</i> i les seves formulacions• Cloramfenicol• Cloroform• Clorpromazina• Colquicina• Dapsona• Dimetridazole• Metronidazole• Nitrofurans (incloent-hi la furazolidona)• Ronidazole

L'incompliment dels temps d'espera o l'administració en dosis inadequades del medicament veterinari, que provoqui que el temps d'espera resulti insuficient per a l'eliminació del fàrmac fins als nivells permesos, pot donar lloc a la superació dels MRL fixats.

1.1.4.3. Toxicitat en els animals

L'ús d'agents antimicrobians en dosis superiors a les recomanades o l'administració a espècies animals susceptibles, inclús a baixes concentracions, pot provocar efectes adversos en els animals tractats (inapetència, diarrees, cardiopaties, etc.) que poden comportar des de una simple disminució de la producció (per exemple de llet en les vaques) fins a la mort de l'animal.

1.2. Pinsos

La producció animal ocupa un lloc molt important en el sector primari de la UE. Els pinsos són la forma òptima d'alimentació dels animals i, des del punt de vista econòmic, constitueixen entre el 70-80 % del cost de producció de les explotacions ramaderes [39]. Es defineixen com els productes d'origen vegetal o animal en estat natural, fresc o conservat, i els derivats de les seves transformacions industrials, així com les substàncies orgàniques o inorgàniques, simples o barrejades, continguin o no additius, que estiguin destinades a l'alimentació animal per via oral [40].

La Federació Europea de Fabricants d'Aliments Compostos (FEFAC, de *Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés*), fundada l'any 1959, té com a objectiu principal promoure un marc de competitivitat i competència lleial per al desenvolupament de l'activitat empresarial de fabricació de pinsos compostos a la UE [41]. La FEFAC té els seus orígens en la unió de les associacions nacionals de fabricants de pinsos compostos de 5 països (França, Bèlgica, Alemanya, Itàlia i els Països Baixos). Actualment, consta de 23 associacions nacionals en 22 estats membres de la UE com a membres de ple dret, així com també d'un nombre creixent de membres de països no comunitaris (Suïssa, Turquia, Noruega, Sèrbia i Rússia) en condició d'observadors o associats. Espanya es troba representada per la Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales (CESFAC) fundada l'any 1978 [42].

La producció mundial de pinsos compostos ha estat tradicionalment difícil de quantificar atès que, a diferència del que succeeix a la UE, molts països no disposen d'una associació nacional de fabricants. Això no obstant, les últimes dades publicades per la FEFAC, corresponents a l'any 2012, van estimar aquesta

producció en 945 milions de tones, un 9 % més que l'any anterior. Com a conseqüència de l'estructura del mercat regional i l'elevat cost del transport, els països amb una producció animal més elevada resulten ser també els majors productors industrials de pinsos compostos. Així doncs, la Xina, els EUA i la UE, en aquest ordre, esdevenen els fabricants capdavanters al món (Figura 1.24) [39].

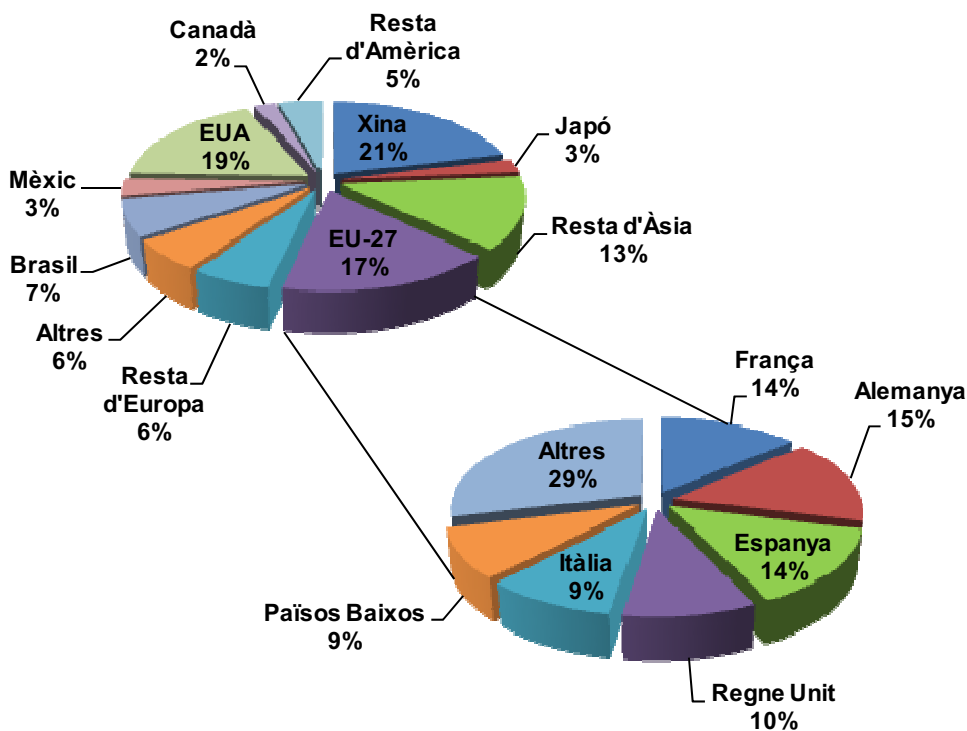


Figura 1.24. Distribució de la producció de pinsos compostos a nivell mundial i europeu l'any 2012 [1].

D'altra banda, la FEFAC va estimar la quantitat de pinso consumida pels animals de producció a la UE en aproximadament 470 milions de tones l'any 2012, de les quals 153 milions (32 %) van ser produïdes per les indústries europees de pinsos compostos amb uns guanys de 45 bilions d'euros [39]. La diferència correspon a farratges i cereals que han estat conreats i destinats a l'alimentació animal en les mateixes granges d'origen. Dins la UE, Espanya encapçala, amb 21 milions de tones, la llista de principals països productors juntament amb Alemanya i França. Tanmateix, dades del mateix any publicades pel Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) difereixen significativament i xifren la producció de pinsos compostos a Espanya en 29 milions de tones [43]. Quant a la

distribució territorial, Catalunya és la primera comunitat autònoma espanyola, superant els 6 milions de tones fabricades l'any 2012, que representen més d'un 20 % del total d'Espanya (Figura 1.25). Aquest fet explica en gran mesura la diferència en les xifres de producció publicades per les dues fonts, FEFAC i MAGRAMA, atès que l'Associació Catalana de Fabricants de Pinsos (ASFAC) no forma part de la CESFAC ja que actualment disposa d'una estructura de gestió pròpia [44].

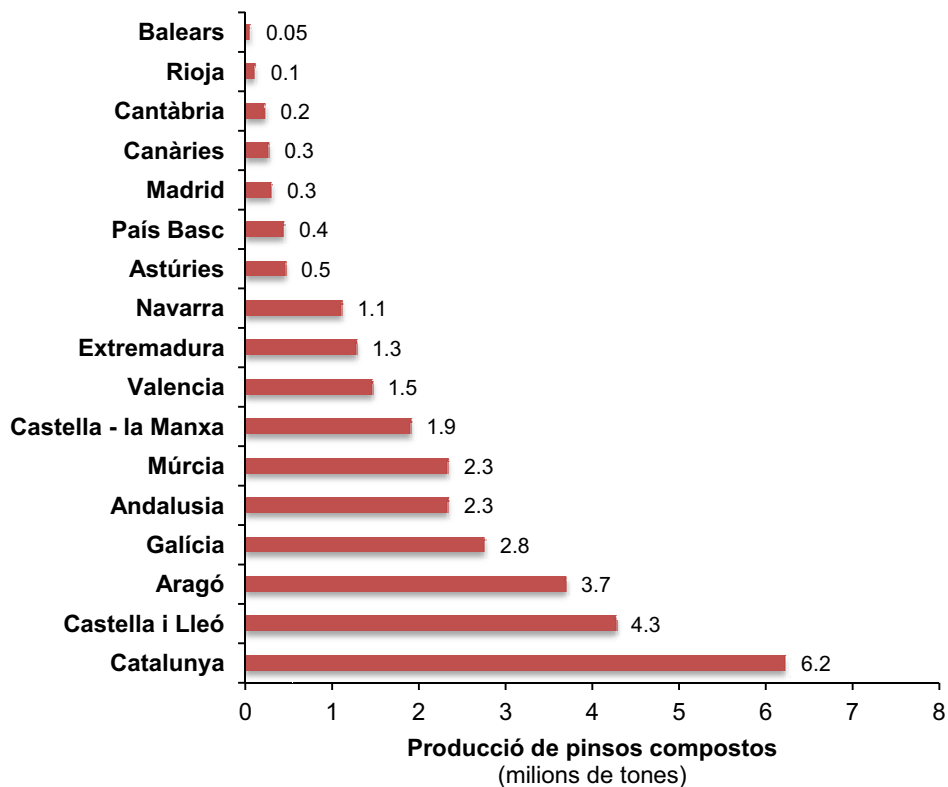


Figura 1.25. Distribució de la producció de pinsos compostos per comunitats autònomes a Espanya l'any 2012 [43].

Pel que fa a la distribució per espècies, es constata que a la UE les aus i els porcs són els principals animals destinataris, seguits dels bovins, mentre que a Espanya destaca clarament en primer lloc la producció de pinsos per al sector porcí, seguida de la del bestiar boví i de l'aviram. En el cas de Catalunya, l'elaboració de pinsos segueix la tendència espanyola amb més de la meitat de la producció destinada a l'espècie porcina (Figura 1.26). A nivell mundial però, predomina la fabricació de

pinsos per a aus, fet que pot explicar-se per les influències religioses i el baix cost de la seva carn.

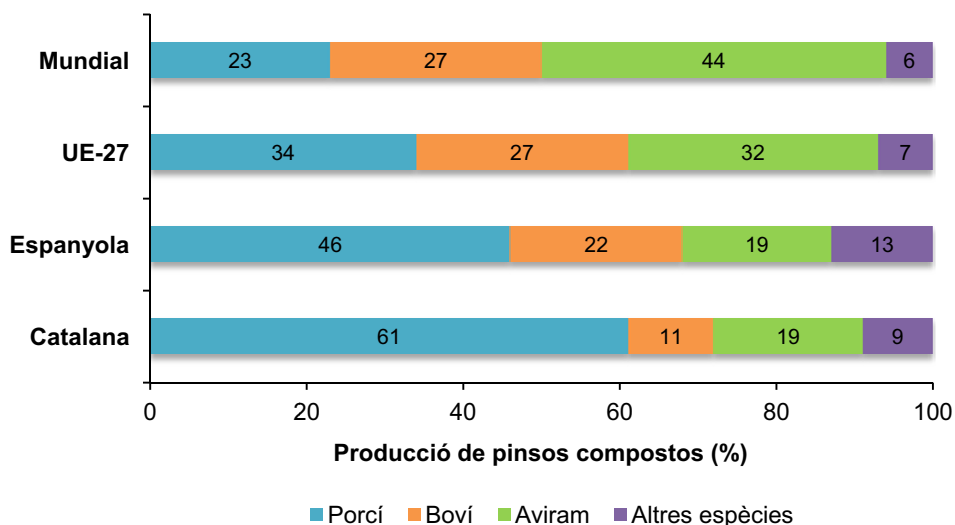


Figura 1.26. Distribució de la producció de pinsos compostos per espècies al món, a la UE-27, a Espanya i a Catalunya l'any 2012 (altres espècies inclou: oví-cabrum, conills, èquids, peixos, animals de companyia, etc.) [1, 43, 45, 46].

1.2.1. Composició dels pinsos

Els pinsos han de presentar la qualitat i composició adients per tal d'aportar a l'animal tots els elements nutritius necessaris i indispensables per a la seva salut, benestar i productivitat. Així doncs, els pinsos compostos, obtinguts actualment en processos industrials, són el resultat de la mescla de desenes d'ingredients o matèries primeres que proporcionen a l'animal la quantitat que necessita de carbohidrats, proteïnes, greixos, vitamines, minerals, etc. A més, els pinsos també poden contenir additius i/o en el cas dels pinsos medicamentosos, medicaments veterinaris.

1.2.1.1. Matèries primeres

Les matèries primeres utilitzades en l'elaboració dels pinsos són molt variades. El Reglament (UE) 68/2013 [47], relatiu al catàleg de matèries primeres per a pinsos,

les classifica en diferents categories segons s'indica en la Taula 1.6. Fins la propera actualització del citat reglament, les noves matèries primeres autoritzades es publiquen periòdicament en el registre comunitari de matèries primeres per a l'alimentació animal [48].

En funció de les necessitats nutricionals de cada animal i de la disponibilitat, la qualitat i el preu de les matèries primeres en cada àrea geogràfica s'estableix la composició òptima dels pinsos en termes de valor nutritiu i cost. Com a conseqüència, existeixen al mercat una gran varietat de pinsos de composicions diferents en funció del país productor i de l'espècie animal a què va destinat, ja que cada una té necessitats diferents que a més, per a una mateixa espècie, varien en funció de diversos factors com ara l'edat (porcs/garrins), la fase o estat fisiològic (engreix, reproducció, gestació, lactació, etc.) o l'activitat (producció de carn, llet, ous, etc.), entre d'altres (Figura 1.27).

Taula 1.6. Matèries primeres emprades en la producció de pinsos [47].

Annex Reglament (UE) 68/2013 (part C)	
Categoria	Exemples
Cereals i productes derivats	Ordi Blat Blat de moro Civada Gluten de cereals Productes de destil·leria i cerveseria
Llavors i fruits oleaginoses i productes derivats	Llavors de colza Llavors de cotó Llavors de gira-sol Oli vegetal Farines d'extracció de soja Farines d'extracció de gira-sol
Llavors lleguminoses i productes derivats	Faves Garrofes Pèsols Tramussos

Tubercles, arrels i productes derivats	Polpa de remolatxa Mandioca Patates Pastanagues
Farratges i productes derivats	Farina d'alfals Palla de cereals
Productes làctics i derivats	Llet en pols Sèrum de llet
Productes d'animals terrestres i productes derivats	Farina de carn Farina de carn i ossos Farina de plasma Greix animal
Peixos, altres animals aquàtics i productes derivats	Farina de peix Oli de peix
Minerals i productes derivats	Carbonat de calci Òxid de magnesi Fosfats de calci Clorur de sodi Hidrogencarbonat de sodi
Productes diversos	Productes de panificació Àcids grassos

Pel que fa a les matèries primeres, l'elaboració de pinsos a Espanya s'ha basat històricament en una important introducció dels cereals, tal com succeeix també a la resta de països. En els pinsos produïts a Catalunya i a la resta de l'estat espanyol, el grup dels cereals presenta una mitjana d'incorporació superior al 65 % del total dels ingredients. Per sota, es posicionen les llavors oleaginoses i les farines d'extracció, tot i que en menor grau, ja que representen al voltant del 20 % del total de matèries primeres usades en la fabricació de pinsos. La resta de grups (lleguminoses, farratges, minerals, etc.) són minoritaris, ja que s'inclouen als pinsos en una proporció inferior al 3 % [43, 49].

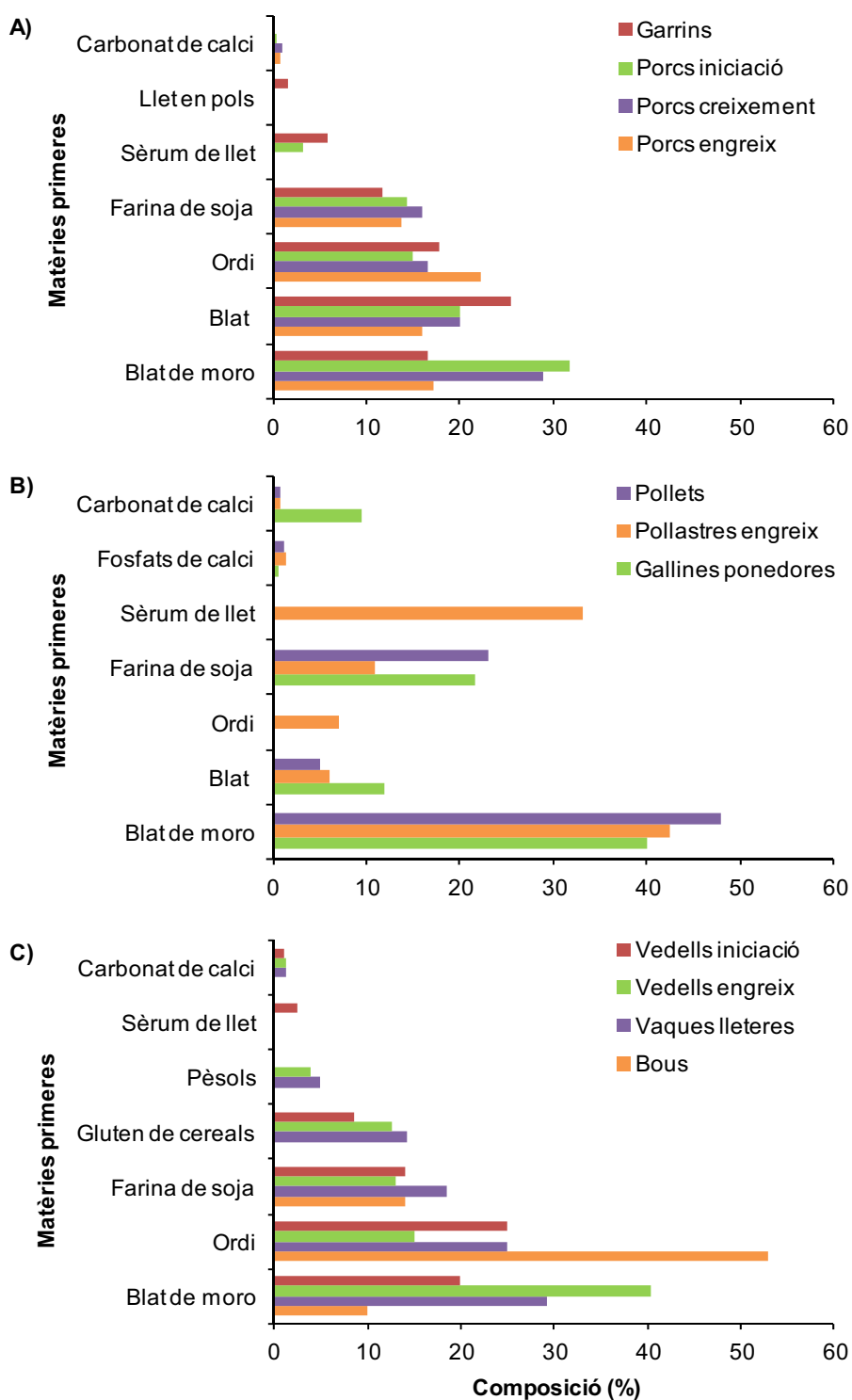


Figura 1.27. Exemple de la composició de pinsos destinats a l'alimentació de diferents espècies animals: (A) porcí, (B) aviram i (C) boví.

1.2.1.2. Additius

A banda de les matèries primeres, els pinsos compostos contenen també additius. D'acord amb el Reglament (CE) 1831/2003 [6], sobre additius en l'alimentació animal, aquests són les substàncies, els microorganismes i els preparats diferents de les matèries primeres i les premescles, que s'afegeixen intencionadament als pinsos amb la finalitat de realitzar una o més de les següents funcions:

- Influir positivament en les característiques del pinso o dels productes animals;
- Influir favorablement en el color dels ocells i peixos ornamentals;
- Influir positivament en les repercussions mediambientals de la producció animal;
- Influir positivament en la producció, l'activitat o el benestar dels animals, actuant especialment en la flora gastrointestinal o la digestibilitat dels pinsos;
- Satisfer les necessitats alimentàries dels animals;
- Tenir un efecte coccidiostàtic o histomonòstat.

Els additius es poden classificar en cinc categories depenent de les seves funcions i propietats, i dins de cada categoria també es poden assignar a un o més grups funcionals segons s'indica a la Taula 1.7. Al llarg del 2012, es van consumir a Espanya més de 400 000 tones d'additius per a la producció de pinsos, les quals van correspondre majoritàriament a additius nutricionals (81 %), principalment aminoàcids, i additius tecnològics (13 %), fonamentalment antiaglomerants i lligands [43].

En cap cas els additius destinats a l'alimentació animal poden tenir un efecte advers per a la salut humana, la salut animal o el medi ambient i abans de la seva comercialització i utilització han d'obtenir una autorització de l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA, de *European Food Safety Authority*). En les autoritzacions s'estableixen condicions específiques d'ús, així com les espècies o categories animals a les que estan destinats els additius. Pel que fa als agents antimicrobians, i per les raons ja comentades anteriorment (apartats 1.1.1 i 1.1.3.2), només estan permesos com a additius els coccidiostàtics i els histomonòstats. Al registre d'additius en pinsos de la UE [32] actualment hi consten 27 productes que inclouen un total de 11 coccidiostàtics diferents: 6 ionòfors i 5 no ionòfors

(Taula 1.8). Per contra, no hi ha cap histomonòstat registrat a dia d'avui. Tanmateix, els mecanismes de regulació es troben establerts per si fos necessari en el futur.

Taula 1.7. Classificació per categories dels additius emprats en alimentació animal [6].

Annex I Reglament (CE) 1831/2003	
Categoria	Grups funcionals
Additius tecnològics	Conservants
	Antioxidants
	Emulgents
	Estabilitzants
	Espessants
	Gelificants
	Lligands
	Substàncies per al control de la contaminació per radionúclids
	Antiaglomerants
	Reguladors de l'acidesa
	Additius per a l'ensitjament
	Desnaturalitzants
Additius organolèptics	Colorants
	Aromatitzants
Additius nutricionals	Vitamines, provitamines i substàncies d'efecte anàleg
	Oligoelements o compostos d'oligoelements
	Aminoàcids, les seves sals i anàlegs
	Urea i els seus derivats
Additius zootècnics	Digestius
	Estabilitzadors de la flora intestinal
	Substàncies que influeixen positivament en el medi ambient
Agents antimicrobians	Histomonòstats
	Coccidiostàtics

Taula 1.8. Productes autoritzats com a additius en pinsos que contenen coccidiostàtics [32].

Coccidiostàtic	Nombre de productes	Contingut (mg kg ⁻¹) *		Any d'expiració
		Mínim	Màxim	
Lasalocid de sodi	3	75	125	2021
Narasina	1	60	70	2014
Salinomicina de sodi	4	50	70	2018
Monensina sòdica	4	60	125	2022
Semduramicina sòdica	1	20	25	2016
Maduramicina d'amoni alfa	2	5	5	2021
Clorhidrat de robenidina	3	30	70	2021
Decoquinat	1	20	40	2014
Bromhidrat d'halofuginona	1	2	3	Pendent
Nicarbazina	1	125	125	2020
Diclazuril	5	1	1	2021
Narasina-Nicarbazina	1	40	50	2020

* Calculat sobre la base d'un pinso amb un contingut d'humitat del 12 %.

En nutrició animal però, existeixen altres additius de caràcter divers que es poden utilitzar com a promotors de creixement, com per exemple alguns enzims que milloren la digestió dels aliments, àcids orgànics, vitamines, prebiòtics i probiòtics (microorganismes que competeixen amb els patògens i mantenen l'equilibri de la flora intestinal), oligosacàrids, olis essencials i extractes vegetals [4, 50, 51]. Aquests promotors alternatius presenten una major seguretat, però en cap cas poden arribar a tenir els efectes que es deriven de l'ús d'agents antimicrobians en el creixement animal. Això no obstant, la UE també estableix fortes restriccions per a la seva comercialització així com prohibicions cautelars per a alguns d'ells.

1.2.1.3. Premescles medicamentoses

L'administració oral de medicaments veterinaris a través dels pinsos és, com ja s'ha comentat anteriorment, una de les vies més emprades [4]. Els pinsos medicamentosos són aquells que resulten de la incorporació d'una o diverses premescles medicamentoses a un pinso, prèviament a la seva comercialització, i

que estan destinats a ser administrats als animals sense transformació, per raó de les seves propietats curatives i/o preventives. Es calcula que l'any 2008 entre un 3-7 % dels pinsos fabricats a la UE van correspondre a pinsos medicamentosos [3]. No obstant, les xifres varien significativament entre els diferents estats membres de la UE. Així, mentre s'estima que a Espanya es van fabricar entre 2 i 3 milions de tones de pinsos medicamentosos, a Alemanya només se'n van produir 12 000 tones. Aquestes diferències poden atribuir-se a diversos factors com ara els alts requisits legislatius imposats en alguns països o el grau d'acceptació per part dels grangers d'altres vies d'administració oral com per exemple les pols orals.

La Directiva 90/167/CEE [52], per la qual s'estableixen les condicions de preparació, comercialització i ús dels pinsos medicamentosos a la Comunitat, entre d'altres coses, estableix que:

- El pinso utilitzat en la fabricació del pinso medicamentós ha de produir una mescla homogènia i estable amb el medicament veterinari, evitant interaccions no desitjades entre el medicament veterinari, els additius i el propi pinso;
- Els pinsos medicamentosos només es poden administrar mitjançant la prescripció d'un veterinari;
- Els pinsos medicamentosos han de conservar-se durant el temps prescrit i han d'estar sotmesos a un control regular, incloent proves de laboratori adequades per comprovar l'homogeneïtat i l'estabilitat del medicament veterinari que hauran d'efectuar els establiments de producció;
- Tots els pinsos medicamentosos han de ser elaborats únicament amb premescles medicamentoses autoritzades de conformitat amb la Directiva 2001/82/CE [2] o, en tot cas, amb pinsos intermedis medicamentosos preparats a partir d'una d'aquestes premescles.

De la mateixa manera, les premescles medicamentoses només es poden elaborar a partir de medicaments veterinaris autoritzats per l'Agencia Espanyola de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) o per la UE d'acord amb el Reglament (CE) 726/2004 [53]. Aquestes són fabricades industrialment, solen ser de naturalesa sòlida i poden contenir un o més medicaments veterinaris i un o diversos excipients. S'incorporen al pinso en proporcions no inferiors al 2 % durant

la seva elaboració per tal d'assegurar una distribució homogènia dels fàrmacs en el producte final.

En la Taula 1.9 s'ha fet un recull de les premescles medicamentoses actualment autoritzades a Espanya per als agents antimicrobians estudiats en aquesta tesi [54]. Pel que fa a Catalunya, el consum total de premescles es va estimar en 3600 tones l'any 2011 amb les quals es van fabricar de l'ordre de 1 060 000 tones de pinso medicamentós que es va destinar majoritàriament als porcs (85 %), seguit dels conills (8 %), els bovins (4 %) i les aus (1 %) [55]. El major consum a Catalunya va correspondre a premescles que contenen tetraciclina, lincomicina i tiamulina, i tot seguit tilosina i l'associació sulfadiazina/trimetoprim.

Taula 1.9. Premescles medicamentoses autoritzades per la AEMPS a Espanya l'any 2013 pels diferents agents antimicrobians d'interès en aquesta tesi [54].

Substància activa	Premescles autoritzades	Consum (tones) *	Espècies de destí
Oxitetraciclina	11	490	Porcí, boví, aviram, conills i cabrum
Lincomicina	4	301	Porcí
Doxiciclina	9	218	Porcí
Tiamulina	–	178	–
Clortetraciclina	5	92	Porcí, aviram, boví, oví i cabrum
Tilosina	8	80	Porcí, boví i aviram
Sulfadiazina	6	79	Porcí i oví
Trimetoprim	6	79	Porcí
Oxibendazole	10	66	Porcí i èquids
Bacitracina	1	33	Conills
Flubendazole	5	29	Porcí i aviram
Florfenicol	2	29	Porcí
Valnemulina	–	13	–
Decoquinat	1	4	Oví i boví
Espiramicina	1	3	Porcí
Sulfadimidina	3	1	Porcí, boví, aviram i conills
Fenbendazole	1	0.9	Porcí
Tetraciclina	1	–	Porcí, boví, aviram, oví i cabrum

* Consum a Catalunya l'any 2011 [55].

1.2.2. Producció higiènica de pinsos

La prioritat de la política alimentària de la UE és garantir la lliure circulació en el mercat interior d'aliments segurs i saludables amb l'objectiu d'assegurar un nivell elevat de protecció de la salut humana. Els principis sobre els quals es basa l'actual legislació es van establir en el Llibre Blanc sobre la seguretat alimentària elaborat per les autoritats sanitàries comunitàries l'any 2000 [56]. El principi bàsic instaura el plantejament global i integrat de tota la cadena alimentària, ja que considera que cada etapa, des de la producció primària fins al producte a disposició dels consumidors, inclosa la producció de pinsos per a animals, pot influir en la innocuïtat dels aliments (principi "de la granja a la taula", de l'anglès *from the farm to the fork*). En aquest sentit, el Reglament (CE) 178/2002 [57] constitueix la base de la legislació alimentària i estableix els principis generals aplicables als aliments i als pinsos, amb independència de que siguin produïts a la UE o s'importin de tercers països. Així mateix, es crea l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) com a font independent d'informació i d'assessorament científic sobre riscos associats a la cadena alimentària. Els eixos vertebradors de l'actual normativa són la traçabilitat i l'anàlisi de perills (físics, químics o biològics).

En l'àmbit de l'alimentació animal, el Reglament (CE) 1831/2003 [58], pel qual es fixen requisits en matèria d'higiene dels pinsos, conté d'una banda normes destinades a garantir la traçabilitat dels pinsos i dels seus ingredients. La traçabilitat es defineix com la possibilitat de trobar i seguir el rastre, a través de totes les etapes de producció, transformació i distribució, d'un pinso o d'una substància destinada a ser incorporada a pinsos o amb la probabilitat de ser-ho. Les empreses han de disposar d'un sistema de gestió documental que permeti identificar i realitzar un seguiment sobre la naturalesa i l'origen dels ingredients utilitzats per a l'elaboració d'un determinat lot de pinso. D'aquesta manera, en cas d'una incidència, es pot determinar quins lots poden presentar un risc i cal, per tant, que siguin retirats del mercat, així com corregir els possibles errors comesos o les fonts de contaminació. Tots els fabricants de pinsos de Catalunya tenen, ja des d'abans de l'entrada en vigor de les normatives europees, l'obligació de comunicar al Departament d'Agricultura la composició dels pinsos produïts.

D'altra banda, el mateix reglament estableix que les empreses de pinso han d'aplicar un o diversos procediments basats en el sistema d'anàlisi de perills i punts

crítics de control (HACCP, de *hazard analysis and critical control points*,) per tal de garantir l'aptitud d'un pinso per al consum. Aquest sistema determina quins són els perills possibles en cada punt del procés de producció, quin nivell de risc suposen i de quina manera s'estableixen el tipus i freqüència dels controls a realitzar per evitar que aquests es produeixin.

Segons l'Organització de les Nacions Unides per a l'Alimentació i l'Agricultura (FAO, de *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) i l'OMS, els medicaments veterinaris presents en els pinsos constitueixen un dels perills per a la seguretat dels aliments [59]. A la UE es prohibeix l'ús de productes destinats a l'alimentació animal amb un contingut de qualsevol de les substàncies indesitjables considerades en la Directiva 2002/32/CE [40] superior al límit màxim establert. Aquest llistat, actualitzat en el Reglament (UE) 574/2011 [60], inclou substàncies o productes, amb excepció dels agents patògens, que constitueixen un perill potencial per a la salut humana, la salut animal o el medi ambient, o són perjudicials per a la producció ramadera (Taula 1.10). Pel que fa als medicaments veterinaris, únicament s'inclouen com a substàncies indesitjables els coccidiostàtics (additius autoritzats) presents en pinsos com a resultat d'una contaminació creuada inevitable.

Taula 1.10. Substàncies indesitjables en productes destinats a l'alimentació animal a la UE [60].

Annex Reglament (UE) 574/2011	
Categoria	Exemple
I. Contaminants inorgànics i compostos nitrogenats	Plom
II. Micotoxines	Aflatoxina B ₁
III. Toxines vegetals inherents	Àcid cianhídric
IV. Compostos organoclorats (excepte dioxines i bifenils policlorats)	Hexaclorobenzè
V. Dioxines i bifenils policlorats	Policlorodibenzofurans
VI. Impureses botàniques perjudicials	Mostassa negra
VII. Additius autoritzats en pinsos als quals no estan destinats com a resultat d'una transferència inevitable	Narasina

1.2.3. Contaminació creuada

La principal causa de la presència de traces de medicaments veterinaris en els pinsos és la contaminació creuada. Les fàbriques de pinsos requereixen instal·lacions de grans dimensions i d'elevat cost de manera que l'establiment de dues línies de producció diferenciades, per a pinsos medicats i no medicats, sovint resulta inviable econòmicament. En una mateixa línia de producció, per tant, es fabriquen successivament una àmplia varietat de pinsos de composicions diferents. Això, fa que sigui possible que traces d'un medicament quedin retingudes en punts de la línia de producció i s'incorporin als pinsos fabricats immediatament després. Aquesta transmissió de petites quantitats d'una substància d'un lot de pinso a un altre s'anomena transferència o contaminació creuada. El resultat pot ser la contaminació de pinsos amb traces de medicaments als quals aquestes substàncies no estan destinades, és a dir, de pinsos per als quals el seu ús no està autoritzat. Aquesta contaminació pot donar-se en totes les etapes de producció i transformació dels pinsos, però també durant l'emmagatzematge i el transport, i fins i tot, a les mateixes explotacions ramaderes [61].

El grau de contaminació depèn de les instal·lacions i dels procediments tècnics, així com de les característiques dels additius i les premescles medicamentoses (força d'adhesió, mida i densitat de les partícules, propietats electrostàtiques, etc.). El Reglament (CE) 183/2005 [58] estableix normes específiques en matèria d'higiene per a les empreses d'alimentació animal. En particular, les fàbriques afectades han de prendre les mesures adequades relatives a les instal·lacions i als equips, la producció, l'emmagatzematge i el transport amb l'objectiu de minimitzar tota contaminació creuada. D'una banda, la disposició, el disseny, la construcció i les dimensions de l'equipament han de permetre una neteja i desinfecció adequades i ser de tal forma que es redueixin al mínim el risc d'error i la contaminació creuada. A les fàbriques s'apliquen diferents procediments de neteja per tal de minimitzar la contaminació creuada:

- Rentat o purga de la línia de producció entre seqüències amb producte blanc que no contingui medicaments;
- Seqüenciació de lots de fabricació de pinsos en ordre decreixent de nivells de medicament;
- Neteja física de la línia de producció.

D'altra banda, pel que fa al procés de fabricació, es recomana dosificar els medicaments en les últimes fases del procés per tal de no contaminar, en la mesura del possible, la resta de la línia de producció. A més, els pinsos s'han d'emmagatzemar de manera que siguin fàcilment identificables i separar-se de les matèries primeres no transformades i dels additius, a fi d'evitar confusions i qualsevol contaminació. En els vehicles de transport i en les granges, el buidatge i la neteja de les sitges i els contenidors, i l'estricta separació de pinsos medicats i no medicats constitueixen importants mesures de prevenció.

Tot i l'aplicació de bones pràctiques de fabricació, mitjançant la Directiva 2009/8/CE [62], la UE reconeix la contaminació creuada com una transferència tècnicament inevitable i estableix límits màxims de coccidiostàtics i histomonòstats presents en pinsos als quals aquests additius no estan autoritzats. Seguint el principi "tan baix com sigui raonablement possible" (ALARA, de *as low as reasonably achievable*) es consideren acceptables els índexs de transferència següents:

- 3 % del contingut màxim autoritzat per:
 - pinsos destinats a espècies animals poc sensibles.

- 1 % del contingut màxim autoritzat per:
 - pinsos destinats a espècies animals sensibles;
 - pinsos de retirada, és a dir, pinsos utilitzats en el període previ al sacrifici;
 - pinsos per a animals destinats a la producció continua d'aliments (vaques lleteres, gallines ponedores, etc.) en cas que es tinguin proves que demostrin la transferència des dels pinsos als aliments;
 - pinsos destinats a espècies animals a les quals no està previst subministrar coccidiostàtics ni histomonòstats.

En els cas dels coccidiostàtics, l'aplicació d'aquests índexs de transferència al contingut màxim autoritzat es tradueix ens els nivells de contaminació creuada permesos indicats en la Taula 1.11. Cal destacar, per tant, que la legislació europea estableix límits per als coccidiostàtics utilitzats com a additius però no per a la transferència, també inevitable, de la resta d'agents antimicrobians emprats en la fabricació de pinsos medicats i que s'incorporen a concentracions més elevades que no pas els additius.

Taula 1.11. Contingut màxim permès per als diferents coccidiostàtics autoritzats en pinsos als quals no estan destinats com a resultat d'una contaminació creuada [62].

Annex Directiva 2009/8/CE	Nivells de contaminació creuada ($\mu\text{g kg}^{-1}$) ^a	
Coccidiostàtic	1 % contingut màxim autoritzat	3 % contingut màxim autoritzat
Lasalocid de sodi	1250	3750
Narasina	700	2100
Salinomicina de sodi	700	2100
Monensina sòdica	1250	3750
Semduramicina sòdica	250	750
Maduramicina d'amoni alfa	50	150
Clorhidrat de robenidina	700	2100
Decoquinat	400	1200
Bromhidrat d'halofuginona	30	90
Nicarbazina ^b	1250	3750
Diclazuril	10	30

^a Calculat sobre la base d'un pinso amb un contingut d'humitat del 12 %.

^b Modificat en el Reglament (UE) 574/2011 [60].

El subministrament no intencionat de pinsos contaminats pot donar lloc a:

- Interaccions no desitjades amb d'altres medicaments;
- Reaccions adverses en espècies animals sensibles al medicament;
- Residus d'aquestes substàncies en aliments d'origen animal, els quals poden excedir els MRL establerts a causa del desconeixement de la necessitat de complir els temps d'espera fixats [63-66].

El Reglament (CE) 124/2009 [67], i la seva posterior modificació pel Reglament (UE) 610/2012 [68], estableixen els continguts màxims de coccidiostàtics i histomonòstats presents en els aliments com a resultat de la transferència inevitable d'aquestes substàncies en els pinsos als que no estan destinats aquests additius. A més, estableixen que en cas de detectar-se un residu important que no superi el contingut màxim, la autoritat competent haurà de dur a terme una

investigació per confirmar que la presència del residu es deu a una contaminació creuada i no a una administració il·lícita de l'additiu.

1.2.4. Plans de vigilància i controls

Per verificar el compliment de la legislació en matèria de pinsos i aliments i la normativa sobre salut i benestar dels animals, els diferents estats membres de la UE tenen l'obligació, segons el Reglament (CE) 882/2004 [69], de realitzar controls oficials basats en l'anàlisi i la prevenció dels riscos. Els estats membres són els encarregats de designar les autoritats competents per portar-los a terme, les quals han de complir una sèrie de criteris operatius que garanteixin la seva imparcialitat i eficàcia. Això implica disposar d'instal·lacions i d'equips adequats, i de personal suficient, degudament format i qualificat per dur a terme correctament les seves funcions. Les autoritats competents han de realitzar també auditories internes i externes per assegurar-se que assoleixen els objectius fixats pel reglament. Els controls han de ser efectuats amb regularitat i, en principi, sense previ avís, i han d'aplicar-se en totes les fases de la producció, la transformació i la distribució de pinsos i aliments.

Amb l'objectiu de garantir la qualitat i comparació dels resultats, l'anàlisi de les mostres preses en els controls oficials ha de ser efectuat exclusivament per laboratoris la competència tècnica dels quals hagi estat avaluada per un organisme independent. Amb aquesta finalitat, el Reglament (CE) 882/2004 [69] estableix que els laboratoris han d'estar acreditats conforme als requisits de la norma ISO/IEC 17025:2005 [70], la qual estableix dos tipus de requisits: els de gestió i els tècnics. Pel que fa als requisits de gestió, els laboratoris han de dissenyar, implementar i mantenir un sistema d'assegurament de la qualitat conforme als requeriments de la norma ISO 9001:2008 [71], mentre que entre els requisits tècnics destaquen els referents a la validació dels mètodes analítics, als mitjans per garantir la traçabilitat i el control de la qualitat dels resultats, i la participació regular en assajos d'aptitud. Les entitats d'acreditació reconegudes en cadascun dels estats membres són les encarregades de l'avaluació dels laboratoris. En el cas d'Espanya, l'organisme corresponent és la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) [72].

D'acord amb la Directiva 96/23/CE [73], tots els estats membres de la UE posen en pràctica un pla nacional d'investigació de residus per a dos grups de substàncies i els seus residus en els animals vius i els seus productes amb els següents objectius:

- Controlar l'ús il·legal de substàncies en la cria de bestiar;
- Controlar que els tractaments legals dels animals es duen a terme correctament, evitant així que els residus d'aquestes substàncies arribin als aliments destinats al consum humà.

Les substàncies objecte de control són les establertes en la mateixa directiva [73], entre les quals es troben els medicaments d'ús veterinari (Taula 1.12). Els resultats obtinguts de l'aplicació d'aquest pla es recullen en un informe anual que els diferents estats membres han de presentar a la Comissió Europea.

Taula 1.12. Grups de substàncies incloses en els plans nacionals d'investigació de residus [73].

Annex I Directiva 96/23/CE	
Grup A: Substàncies amb efecte anabolitzant i substàncies no autoritzades	
A1.	Estilbens, derivats dels estilbens, les seves sals i els seus èsters
A2.	Tirostàtics
A3.	Esteroides
A4.	Lactones de l'àcid resorcílic (inclòs el zeranol)
A5.	β -agonistes
A6.	Substàncies prohibides (annex del Reglament 37/2010)
Grup B: Medicaments veterinaris i contaminants	
B1.	Agents antibacterians (incloses les sulfamides i les quinolones)
B2.	Altres medicaments veterinaris:
a)	Antihelmíntics
b)	Anticoccidians (inclosos els nitroimidazoles)
c)	Carbamats i piretroides
d)	Tranquil·litzants
e)	Antiinflamatoris no esteroidals
f)	Altres substàncies amb acció farmacològica

B3. Altres substàncies i contaminants mediambientals

- a) Compostos organoclorats (inclosos els bifenils policlorats)
- b) Compostos organofosforats
- c) Elements químics
- d) Micotoxines
- e) Colorants
- f) Altres

A nivell de l'estat espanyol, aquestes competències estan transferides a les Comunitats autònomes (autoritats competents), les quals tenen les funcions legislatives d'aplicació, inspecció i control. Així doncs, a Catalunya s'elabora i s'implementa el Pla d'Investigació de Residus (PIR) dins del qual es desenvolupen i executen, entre d'altres, les accions següents:

- Investigació dels diferents tipus de substàncies i els seus residus en els animals vius per part del Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural (DAAM). Els veterinaris oficials del DAAM realitzen inspeccions a les explotacions ramaderes i als establiments productors de pinso on prenen mostres de pinso, palla, aigua de beguda i/o orina.
- Investigació dels diferents tipus de substàncies i els seus residus en aliments d'origen animal per part de l'Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT) i l'Agència de Salut Pública de Barcelona (ASPB) a la ciutat de Barcelona. Els veterinaris oficials de l'ASPCAT i l'ASPB realitzen inspeccions als escorxadors i a les indústries alimentàries on es prenen mostres de líquids biològics, teixits i òrgans dels animals destinats al consum humà, així com també d'altres productes que se'n deriven (carn, llet, ous, productes de l'aqüicultura i mel).

Amb aquests controls es pretén detectar els incompliments de la normativa vigent per actuar en conseqüència. En cas d'irregularitat, s'inicia l'expedient administratiu o penal corresponent. Arran de les actuacions realitzades pel DAAM al llarg del PIR, durant el període 2010-2012 es van prendre en explotacions ramaderes un total de 1537 mostres de pinsos de diferents espècies animals (porcí, boví, aviram, oví i conills). De les 2000 determinacions realitzades, un 75 % van correspondre a anàlisis per detectar substàncies del grup A, majoritàriament substàncies prohibides

com el cloramfenicol i els nitrofurans, i el 25 % restant per substàncies del grup B, únicament agents antibacterians. Del total de pinsos analitzats, 8 mostres (0.5 %) van resultar no conformes a la presència d'agents antibacterians: 3 mostres de pinso porcí no conformes (1 a tilosina i 2 a doxiciclina) i 5 mostres de pinso d'aviram no conformes (3 a oxitetraciclina i 2 a tilosina) [55, 74].

1.2.5. Sistema d'Alerta Ràpida per a Aliments i Pinsos (RASFF)

El Sistema d'Alerta Ràpida per a Aliments i Pinsos (RASFF, de *Rapid Alert System for Food and Feed*), creat l'any 1979, és un sistema d'intercanvi ràpid i eficient d'informació sobre riscos per a la salut humana relacionats amb els aliments i els pinsos, que constitueix una contribució important a la seguretat alimentària a la UE. El RASFF inclou una xarxa en la qual participen la Comissió, que és responsable de la gestió del sistema, la EFSA i les autoritats de control d'aliments i pinsos dels estats membres. A més, també hi poden participar països tercers o organitzacions internacionals. D'aquesta manera, en cas de detectar-se un risc per a la salut, els països poden comprovar en temps real si també estan afectats, i actuar amb rapidesa i coordinar-se amb l'objectiu d'anticipar-se als riscos en l'àmbit de la seguretat alimentària i evitar que perjudiquin els consumidors.

L'any 2012 es van trametre 3432 notificacions noves a través del RASFF relacionades amb incompliments de la legislació alimentària de la UE, de les quals 326 es referien a pinsos (10 %). Entre els problemes més notificats en els pinsos, hi figuren la presència de micotoxines i de microorganismes patògens com ara la salmonel·la [75]. En relació a la presència indeguda d'agents antimicrobians en pinsos, des de l'any 2000 s'han transmès 51 notificacions a través del RASFF, 10 de les quals es referien a riscos greus (Taula 1.13) [76].

Taula 1.13. Notificacions al RASFF sobre la presència indeguda d'agents antimicrobians en pinsos durant el període 2000-2013 [76].

Substàncies	Nombre de notificacions	Concentració (mg kg ⁻¹)
Salinomicina	12	1.0-1534
Narasina	10	0.07-3.6
Lasalocid	4	1.36-64.6

Amoxicil·lina	4	1.1-4.8
Clortetraciclina	2	0.08-10
Sulfadiazina	2	0.29-8.5
Monensina	1	3
Nifursol	1	5.47
Ampicil·lina	1	1.1
Colistina	1	21
Apramicina	1	122
Flavofosfolipol	1	n.e.
Tetraciclina	1	n.e.
Bacitracina	1	2.22
Cloramfenicol	1	0.0008
Tetraciclina + clortetraciclina	2	1.0-56.8
Salinomicina + narasina	2	0.15-16.1
Tetraciclina + colistina	1	n.e.
Tetraciclina + amoxicil·lina	1	3.1
Metilclorpindol + amprolium + etopabate	2	0.03-0.6
Total	51	

n.e.: no especificada.

1.3. Anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos

Els laboratoris de control oficial responsables de l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos poden trobar-se a la pràctica amb els següents reptes i/o dificultats:

- Concentració. Els agents antimicrobians poden trobar-se presents en els pinsos en un ampli interval de concentracions com a conseqüència de:
 - L'ús autoritzat amb finalitats terapèutiques o profilàctiques en pinsos medicamentosos o com a additiu;
 - L'ús no autoritzat de substàncies prohibides (cloramfenicol, nitrofurans, etc.) o com a promotors de creixement;
 - La contaminació creuada.

El primer dels casos, no sol representar un problema des d'un punt de vista analític ja que els compostos són incorporats a concentracions de l'ordre dels mg kg^{-1} . En canvi, en l'ús il·lícit o no intencionat com a resultat d'una transferència inevitable, els nivells solen ser baixos, de l'ordre dels pocs mg kg^{-1} o dels $\mu\text{g kg}^{-1}$.

- Absència de límits legals per a traces d'agents antimicrobians en pinsos. La legislació europea únicament estableix, mitjançant la Directiva 2009/8/CE [62], continguts màxims per als coccidiostàtics presents en pinsos als quals aquests additius no estan destinats, com a conseqüència d'una contaminació creuada. Per tant, per a la resta d'agents antimicrobians autoritzats i per a les substàncies prohibides s'aplica el principi de tolerància zero, no factible en la pràctica. D'altra banda, tampoc s'han establert MRPL per als mètodes analítics aplicables a aquests compostos.
- Complexitat i variabilitat de la matriu. Els pinsos són el resultat de la mescla de desenes d'ingredients (matèries primeres, additius, etc.) de naturaleses molts diferents, la composició dels quals varia segons l'espècie animal i dins d'una mateixa espècie també en funció de l'edat, l'estat fisiològic, etc. D'aquesta manera, cada pinso té pràcticament les seves pròpies característiques, fet que analíticament es tradueix en diferents substàncies interferents i diferent efecte matriu en cada mostra. Diversos treballs han evidenciat la major complexitat dels pinsos en comparació amb la d'altres matrius alimentàries (mel, llet, ous, múscul, etc.) [77, 78].
- Escassetat de mètodes establerts. Una avaluació de la bibliografia dels últims anys mostra que des de l'any 2000 fins a l'actualitat s'han publicat 61 mètodes per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos [78-138]. Aquest nombre és escàs en comparació amb l'extensa metodologia analítica establerta per a la seva determinació en una gran varietat de teixits animals (múscul, fetge, etc.) i productes d'origen animal destinats al consum humà (llet, ous, mel, etc.). A més, els laboratoris de control oficial requereixen l'anàlisi d'un nombre cada vegada més elevat de substàncies amb propietats fisicoquímiques molt diverses i en una àmplia varietat de matrius. En aquest context, a diferència del que succeeix en el camp dels aliments, són relativament pocs els mètodes desenvolupats per a la determinació en pinsos

de nombrosos agents antimicrobians pertanyents a una mateixa família (mètodes multiresidu) o a diverses famílies alhora (mètodes multiclasse) i, encara menys, vàlids també per a diferents tipus de matrius (mètodes multimatriu). Així, la majoria de mètodes inclouen entre un i pocs compostos de fins a un màxim de cinc famílies diferents (Figura 1.28). Fins al moment, únicament s'han descrit cinc mètodes multiclasse per a l'anàlisi d'un elevat nombre d'agents antimicrobians i famílies diferents [78, 118, 133, 134, 136]. Tres d'aquests mètodes inclouen a més altres classes de medicaments veterinaris i/o contaminants (pesticides, micotoxines i toxines vegetals) [78, 133, 136] i un d'ells és aplicable també a diverses matrius (pinso, blat de moro, ous, llet, mel i múscul) [78].

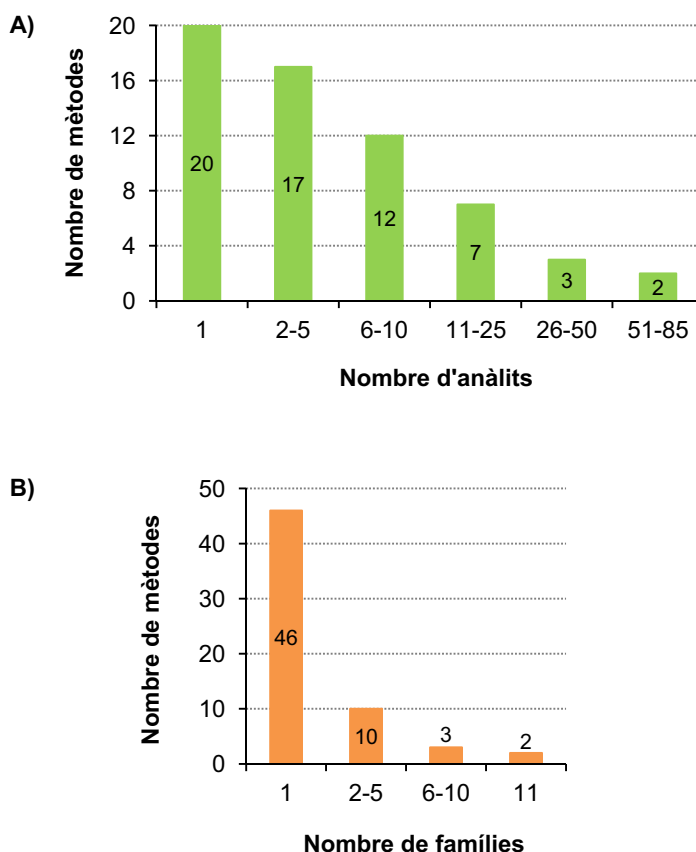


Figura 1.28. Distribució dels mètodes descrits per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos (període 2000-actualitat) en funció del nombre de: (A) anàlits inclosos i (B) famílies considerades.

En general, en qualsevol mètode analític cal considerar el tractament de la mostra i la determinació dels anàlits. D'altra banda, una vegada finalitzat el desenvolupament i abans de la seva utilització, cal validar el mètode per tal d'assegurar la seva adequació a la finalitat prevista. A continuació, es descriuran detalladament cada una d'aquestes etapes i el seu paper dins del procés analític global.

1.3.1. Tractament de mostra

El tractament o preparació de mostra comprèn totes les etapes prèvies a la determinació i consta bàsicament de l'extracció dels anàlits i la purificació o *clean-up* dels extractes obtinguts. És la part del procés analític que requereix més temps (aproximadament 2/3 parts del total de l'anàlisi) i més manipulació per part de l'operador. Es considera també la principal font d'error i discrepància entre laboratoris [139].

Diverses revisions publicades recentment han abordat les diferents tècniques emprades en el tractament de mostra per a l'anàlisi de residus de medicaments veterinaris en aliments, així com també les tendències i els avenços introduïts en els darrers anys [140-142]. Tanmateix, no s'han trobat publicacions equivalents en el camp dels pinsos. En general, l'establiment de mètodes multiclasse i multimatriu ha conduït a l'aplicació de mètodes d'extracció i *clean-up* genèrics, ràpids i senzills, vàlids per a un elevat nombre de compostos amb propietats fisicoquímiques molt diverses i que permetin processar un alt nombre de mostres en poc temps i amb la mínima manipulació possible. Com a conseqüència, aquests mètodes solen representar una solució de compromís tant pel que fa a la recuperació dels anàlits com a la complexitat dels extractes obtinguts. Tot seguit, es comenten els aspectes més rellevants referents a les etapes d'extracció i purificació dels extractes.

1.3.1.1. Mètodes d'extracció

La primera etapa del tractament de mostra és l'extracció dels anàlits de la matriu. L'elecció del solvent i de la tècnica depèn tant de la naturalesa i la complexitat de la mostra com de les propietats fisicoquímiques dels compostos (polaritat i propietats àcid-base). Per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos, aquesta consisteix en

una extracció sòlid-líquid (SLE, de *solid-liquid extraction*) partint d'una quantitat suficient de mostra finament molturada, homogènia i representativa. Generalment s'utilitzen dissolvents orgànics de polaritat adequada, principalment acetonitril (ACN) o metanol (MeOH), o bé mesclades d'aquests amb aigua o solucions tampó a valors de pH apropiats per a les propietats àcid-base dels anàlits. A més, algunes classes d'agents antimicrobians, com les tetraciclins i els macròlids, formen fàcilment complexos amb cations metàl·lics divalents presents a la mostra (Mg^{2+} , Ca^{2+} , etc). En aquests casos, l'addició d'un agent complexant esdevé imprescindible per tal d'assolir bones recuperacions. En la majoria de casos, l'agent escollit és l'àcid etilendiaminatetraacètic (EDTA) [118, 125, 129, 130].

Pel que fa a les tècniques d'extracció, les més emprades són l'agitació mecànica (rotatòria, vibratòria o oscil·latòria) i l'extracció assistida per ultrasons (UAE, de *ultrasound-assisted extraction*). Ambdues permeten una extracció quantitativa dels anàlits ràpida, simple i econòmica. Altres tècniques utilitzades que fan ús d'una energia auxiliar per tal d'augmentar l'eficiència del procés són l'extracció amb líquids pressuritzats (PLE, de *pressurised liquid extraction*) [112, 122, 123] i l'extracció assistida per microones (MAE, de *microwave assisted extraction*) [114, 129]. En la PLE, l'extracció es du a terme a una temperatura per sobre del punt d'ebullició del dissolvent, el qual es manté en estat líquid gràcies a l'aplicació d'elevades pressions, mentre que en la MAE el dissolvent en contacte amb la mostra és escalfat mitjançant la irradiació per microones. Un dels atractius que presenta la PLE és la possibilitat d'emprar l'aigua com a dissolvent extractant (PHWE, de *pressurized hot water extraction*) [122]. En les condicions d'elevada pressió i temperatura aplicades, l'aigua disminueix considerablement la seva polaritat i es pot emprar, en substitució d'un dissolvent orgànic, per a l'extracció de compostos de mitjana i baixa polaritat, amb la consegüent reducció del cost i de l'impacte mediambiental. Convé destacar que ambdues tècniques permeten un cert grau d'automatització i que, aquesta reducció en la manipulació de la mostra condueix generalment a una disminució de la incertesa associada al procés d'extracció. Per contra, cal considerar els possibles problemes d'instabilitat dels anàlits a les condicions de treball aplicades. A més, com més elevades són la pressió i la temperatura més eficient és l'extracció, però alhora augmenten les interferències de la matriu coextretes amb els anàlits.

1.3.1.2. Mètodes de purificació o *clean-up* dels extractes

La naturalesa no selectiva del procés d'extracció sovint fa imprescindible la posterior purificació dels extractes obtinguts. La finalitat de l'etapa de purificació o de *clean-up*, és eliminar de l'extracte la major quantitat possible de substàncies coextretes de la matriu que puguin interferir o produir algun altre efecte (efecte matriu) en la determinació dels anàlits. En alguns casos, també es pretén la preconcentració dels anàlits.

En l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos, més de la meitat dels mètodes es basen en l'extracció en fase sòlida (SPE, de *solid-phase extraction*). Aquesta sempre es du a terme en modalitat *off-line* mitjançant l'ús de cartutxos comercials o columnes preparades al mateix laboratori. La SPE *on-line*, en què l'extracte purificat es transferit de manera automàtica al sistema cromatogràfic, és rarament emprada per al *clean-up* d'extractes de pinsos [123]. La selecció de la naturalesa i la quantitat de fase sòlida, així com dels solvents emprats en les diferents etapes (condicionament, càrrega, neteja i elució), ve condicionada tant per la naturalesa i les propietats fisicoquímiques dels anàlits com per les interaccions de la matriu i els anàlits amb el sorbent. D'entre la gran quantitat de rebliments comercialment disponibles, les fases no polars de base polimèrica, seguides de les de base sílice funcionalitzades amb cadenes C₁₈, són les més emprades. Entre les polimèriques destaca especialment el sorbent Oasis[®] HLB (*hydrophilic-lipophilic balance*), desenvolupat per Waters. Aquest consisteix en un copolímer de dos monòmers amb propietats hidròfiles (N-vinilpirrolidona) i lipòfiles (divinilbencè), per la qual cosa presenta una elevada capacitat de retenció per a un ampli espectre de compostos. A més, a diferència dels de base sílice, l'assecat accidental del sorbent no provoca una disminució de les recuperacions. Menys freqüentment també s'utilitzen fases polars com la sílice [94, 110] o l'alúmina [79, 99], d'intercanvi catiònic [106, 128, 143] o, fins i tot, la combinació seqüencial de dos cartutxos amb mecanismes d'interacció diferents [84].

Probablement la novetat més important introduïda l'any 2003 en el tractament de mostra ha estat el mètode QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*). Aquest es basa en l'extracció en fase sòlida dispersiva (d-SPE, de *dispersive solid-phase extraction*) i consta de dues etapes. Breument, consisteix en una extracció de la mostra (sovint amb un alt contingut d'aigua) amb un solvent orgànic

(típicament ACN), en presència de salts inorgàniques (MgSO_4 anhidre, NaCl, etc.) per promoure la separació de les fases aquosa i orgànica. Els anàlits d'interès romanen en la fase orgànica mentre que els components polars coextrets de la matriu ho fan en la fase aquosa. Posteriorment, es du a terme una etapa de purificació amb un sorbent apropiat a la naturalesa de la mostra. Les interferències coextretes de la matriu són retingudes pel sorbent mentre que els compostos d'interès romanen en el solvent. Entre els sorbents més utilitzats es troben una mescla d'amines primàries i secundàries (PSA, de *primary secondary amine*) per a l'eliminació de compostos polars (àcids orgànics, àcids grassos, sucres, etc.), el C_{18} i el grafit per a l'eliminació de lípids i pigments, respectivament, o combinacions d'aquests. Aquest procediment, que va ser inicialment desenvolupat per a la determinació de pesticides en fruites i vegetals, ha estat ràpidament adoptat en altres camps per la seva eficiència i rapidesa. En el cas de mostres seques, com els pinsos, es requereix l'addició d'aigua prèviament a l'extracció. No obstant, fins al moment, només dos mètodes han reportat l'ús del mètode QuEChERS complet per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos [135, 138]. En d'altres casos, es proposa únicament la segona etapa basada en la d-SPE per tal d'accelerar i simplificar el procés [118].

De forma minoritària, altres procediments es basen en una extracció líquid-líquid (LLE, *liquid-liquid extraction*) [119], una LLE seguida d'una SPE [83, 88, 103] o bé en la dispersió de matriu en fase sòlida (MSDP, *de matrix solid-phase dispersion*), que combina extracció i purificació en una sola etapa, emprant C_{18} com a agent dispersant [108]. No obstant, si la posterior tècnica de separació i/o detecció és suficientment selectiva per a la determinació dels anàlits al nivell d'interès, nombrosos mètodes (de l'ordre del 40 %) opten per no dur a terme cap tipus de *clean-up*, o bé només una simple dilució de l'extracte (*dilute and shoot*). Aquesta pràctica és especialment habitual en el desenvolupament de mètodes multiclasse, en els quals la selectivitat de determinades tècniques de *clean-up*, com per exemple la SPE, pot suposar un desavantatge.

1.3.2. Determinació dels anàlits

Els mètodes analítics poden classificar-se en dos grans grups:

- Mètodes de cribratge o de *screening*: permeten detectar la presència d'una substància, o família de substàncies al nivell d'interès. Es caracteritzen per ser mètodes ràpids que permeten processar un elevat nombre de mostres en poc temps. A més, han de proporcionar un nombre baix de falsos negatius (conformes) però alhora també de falsos positius (no conformes), ja que les mostres sospitoses de ser positives han de ser analitzades posteriorment mitjançant un mètode de confirmació.
- Mètodes de confirmació: proporcionen informació per identificar i, si és necessari quantificar, la substància a la concentració d'interès amb un alt grau de certesa.

A continuació, es descriuen les tècniques analítiques emprades per a la determinació d'agents antimicrobians en pinsos. Actualment, algunes d'elles, especialment l'espectrometria de masses (MS, de *mass spectrometry*), poden aplicar-se amb finalitats de cribratge i/o confirmació, de manera que la distinció entre ambdós tipus de mètodes resulta cada vegada menys evident.

1.3.2.1. Mètodes d'immunoassaig

Una de les tècniques més emprades per al cribratge d'agents antimicrobians en pinsos és l'assaig d'immunoabsorció enzimàtica (ELISA, de *enzyme-linked immunosorbent assay*) [85, 102, 115, 121, 125]. Aquesta estratègia es basa en una interacció específica antígen-anticòs i acostuma a proporcionar resultats qualitius o semiquantitatius. És emprada per la seva sensibilitat, especificitat, baix cost, rapidesa i simplicitat en la preparació de la mostra. En ser aplicada en laboratoris de control redueix el nombre de mostres que cal confirmar, fet que a la pràctica es tradueix en una disminució del temps i cost d'anàlisi. No obstant, en alguns casos es requereix un tractament de mostra més laboriós [102, 115], per la qual cosa els avantatges que ofereix es veuen reduïts respecte l'aplicació directa d'un mètode de confirmació. Actualment, existeixen *kits* ELISA comercials, específics per a un compost o grup de compostos relacionats, en diversos formats (microplaques, biosensors, tires o *dipsticks*, etc.) (Taula 1.14).

Taula 1.14. Kits ELISA comercials per al cribatge d'agents antimicrobians en pinsos.

Proveïdor	Nom comercial	Agents antimicrobians	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matrius								Ref.		
				Pinso	Llet	Ous	Múscul	Teixits	Orina	Sèrum	Mel		Marisc	
R-Biopharm	Premi®Test	Aminoglicòsids	n.e.	x		x	x	x	x	x		x	[144]	
		β -lactames	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Cefalosporines	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Fenicols *	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Macròlids *	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Polipèptids *	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Quinolones *	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Sulfonamides *	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
		Tetraciclines *	n.e.	x		x	x	x	x	x		x		
ELISA Technologies	Chloramphenicol EIA Flumequine EIA Multi-AGP EIA	Cloramfenicol *	0.1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	[145]	
		Flumequina *	10	x	x	x	x		x	x		x		
		Bacitracina *	500	x										
		Espiramicina *	500	x										
		Virginiamicina	500	x										
		Tilosina *	1000	x										
		Olaquinox *	2000	x										

* Estudiats en aquesta tesi.

n.e.: no especificat.

Taula 1.14. Kits ELISA comercialment disponibles per la determinació d'agents antimicrobians en pinsos.

Proveïdor	Nom comercial	Agents antimicrobians	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Matrius								Ref.	
				Pinso	Llet	Ous	Múscul	Teixits	Orina	Sèrum	Mel		Marisc
Randox	Chloramphenicol ELISA	Cloramfenicol *	0.2	x	x	x	x	x	x	x	x		[146]
Bioo Scientific	MaxSignal® Ciprofloxacin ELISA Test Kit	Ciprofloxacina *	0.35	x	x		x	x	x	x			[147]
	MaxSignal® Enrofloxacin ELISA Test Kit	Enrofloxacina *	0.50	x	x		x	x	x		x		
	MaxSignal® Florfenicol ELISA Test Kit	Florfenicol *	n.e.	x	x	x	x		x	x	x	x	
	MaxSignal® Flumequine ELISA Test Kit	Flumequina *	n.e.	x			x	x	x	x	x		
	MaxSignal® Fluoroquinolone ELISA Test Kit	Fluoroquinolones *	n.e.	x	x		x	x	x	x			
	MaxSignal® Furaltadone ELISA Test Kit	Furaltadona *	n.e.	x	x	x	x		x	x	x	x	
	MaxSignal® Norfloxacin ELISA Test Kit	Norfloxacina *	10	x	x		x	x	x	x	x		
	MaxSignal® Sulfadiazine ELISA Test Kit	Sulfadiazina *	n.e.	x	x		x	x	x	x			
	MaxSignal® Sulfamethazine ELISA Test Kit	Sulfadimidina *	n.e.	x	x		x	x	x	x	x		
Tecna	Tylosin ELISA kit	Tilosina *	20	x	x			x	x	x	x		[148]
	I'Screen SULFA	Sulfamides *	66.6	x	x	x	x			x	x		

* Estudiats en aquesta tesi.

n.e.: no especificat.

1.3.2.2. Mètodes cromatogràfics

La majoria de mètodes establerts per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos es basen en la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC, de *high-performance liquid chromatography*) com a tècnica de separació (Figura 1.29). La separació cromatogràfica es du a terme generalment en fase invertida emprant columnes amb fases estacionàries del tipus C_8 o C_{18} i fases mòbils formades per mescles hidroorgàniques d'ACN o MeOH amb solucions reguladores del pH, tant en mode isocràtic com en gradient. Actualment, els progressos en aquest camp inclouen la introducció de la cromatografia de líquids d'ultra alta resolució (UHPLC, de *ultra-high-performance liquid chromatography*) [117]. Aquesta es basa en la utilització de columnes de partícules de mida petita ($<2 \mu\text{m}$) a pressions elevades (fins a 1300 bars), mitjançant les quals s'aconsegueix un augment de l'eficàcia i de la resolució, una major sensibilitat i una disminució del temps de retenció dels anàlits. Altres tècniques de separació com, per exemple, l'electroforesi capil·lar (CE, de *capillary electrophoresis*) són rarament proposades per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos [90, 116].

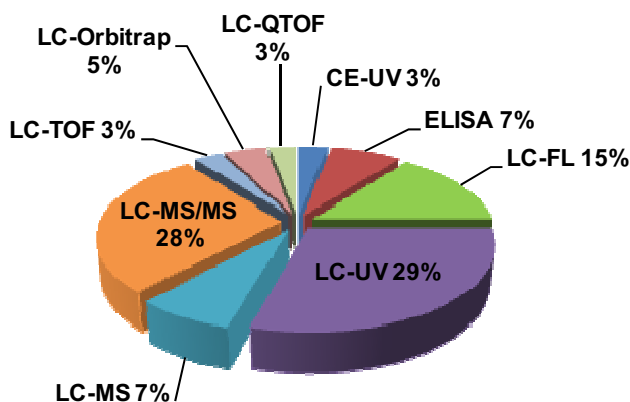


Figura 1.29. Distribució dels mètodes descrits per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos (període 2000-actualitat) en funció de la tècnica analítica emprada.

Pel que fa als sistemes de detecció, els detectors convencionals d'absorció a l'ultraviolat (UV) o de fluorescència (FL) són àmpliament utilitzats. Aquests permeten la quantificació dels anàlits, però no necessàriament la seva identificació inequívoca. La majoria d'agents antimicrobians presenten grups cromòfors en les seves estructures capaços d'absorbir radiació en la zona de l'espectre corresponent

a l'UV. No obstant, aquesta sovint no ofereixen prou selectivitat ja que substàncies coextretes de la matriu també absorbeixen a aquestes longituds d'ona. Una alternativa que ofereix una major sensibilitat i selectivitat és la detecció fluorimètrica (FL), però el seu camp d'aplicació es troba limitat ja que el nombre d'agents antimicrobians que presenten fluorescència intrínseca, com ara les quinolones [91, 113], és escàs. Tanmateix, en el cas d'alguns compostos (sulfamides, bacitracina, etc.) es recorre a la formació de derivats fluorescents mitjançant reaccions de derivatització, les quals es poden dur a terme tant en modalitat precolumna com postcolumna [88, 114].

1.3.2.3. Espectrometria de masses

En els darrers anys, la LC acoblada a l'espectrometria de masses (MS, de *mass spectrometry*) ha esdevingut la tècnica de referència per a la determinació d'agents antimicrobians en pinsos. Aquesta permet, a diferència de l'UV i la FL, la quantificació de pics no completament resolts i l'obtenció d'informació estructural per a la identificació i confirmació dels anàlits. En la detecció per MS però, la quantificació es pot veure afectada per l'efecte matriu (*matrix effect*). Aquest consisteix en un augment (*ion enhancement*) o disminució (*ion suppression*) de la resposta instrumental de l'anàlit degut a la influència de components coeluent de la matriu en el seu procés d'ionització a la font.

Entre les diferents tècniques d'ionització, la ionització per electroesprai (ESI, de *electrospray ionization*), adequada per a molècules de pes molecular baix o mitjà, tant polars com moderadament apolars, és clarament la més emprada per a l'anàlisi d'agents antimicrobians. La ionització química a pressió atmosfèrica (APCI, de *atmospheric pressure chemical ionization*), menys sensible a l'efecte matriu, és rarament utilitzada. D'altra banda, la ionització a pressió ambient mitjançant una font d'anàlisi directa en temps real (DART, de *direct analysis in real time*) també ha estat proposada [135]. Aquesta permet eludir la separació cromatogràfica i aconseguir així una reducció del temps d'anàlisi.

Pel que fa als analitzadors, els mètodes establerts es basen en quadrupols senzills (Q) [80, 89, 99, 104, 132] i majoritàriament, en l'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) emprant analitzadors de triple quadrupol (QqQ). Aquests últims

ofereixen, treballant en mode d'adquisició de monitoratge de reaccions múltiples (MRM, de *multiple reaction monitoring*), una elevada sensibilitat i selectivitat per a la detecció, identificació i quantificació d'un elevat nombre de compostos. No obstant, el nombre d'anàlits que es poden determinar és tècnicament limitat i únicament es poden detectar aquells compostos preestablerts (*targeted*) inclosos en el mètode d'adquisició. L'establiment del mètode requereix l'optimització dels paràmetres d'adquisició per a cada compost i, en funció del nombre de transicions específiques a monitorar, l'ajust de diferents finestres d'adquisició basades en el temps de retenció dels anàlits. En aquest escenari, els instruments d'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS, de *high-resolution mass spectrometry*) han obert noves possibilitats en el camp de la seguretat alimentària per a l'anàlisi de residus i contaminants. Aquests permeten, l'adquisició d'espectres de masses en mode d'escombratge complet (*full scan*), la determinació simultània d'un nombre teòricament il·limitat d'anàlits amb una elevada resolució i, en conseqüència, amb una elevada selectivitat i exactitud de massa. Així doncs, a diferència dels quadrupols de massa unitària, permeten l'elucidació de la composició elemental dels compostos. A més, els paràmetres d'adquisició són comuns per a tots els anàlits i l'anàlisi retrospectiva de les dades ofereix la possibilitat de detectar compostos desconeguts i/o prèviament no considerats (*non-targeted*) sense la necessitat de reinjectar la mostra. És per això, que en els darrers anys, l'HRMS ha esdevingut una tècnica emergent per al desenvolupament de mètodes multiclasse, especialment en el camp dels aliments [149].

Fins al moment però, són pocs els mètodes que han avaluat les prestacions de la LC acoblada a l'HRMS per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos. Aquests es basen en analitzadors de temps de vol (TOF, de *time-of-flight*) [78, 117] o Orbitrap de transformada de Fourier [134, 135]. En algun cas, també es proposen instruments híbrids en combinació amb una trampa iònica (LIT, *linear ion trap*) o quadrupol previs del tipus LIT-Orbitrap [117] o Q-TOF per a aplicacions MS/MS amb alta resolució [133, 136]. En la Taula 1.15 es recullen les prestacions que ofereixen els diferents tipus d'analitzadors emprats. El paràmetre bàsic per a la seva caracterització és l'anomenat poder de resolució (RP, de *resolving power*). Aquest es defineix com la capacitat de l'instrument de distingir entre dos ions que tenen relació massa/càrrega (m/z) que difereixen només en un increment petit. Per a un determinat ió de massa m , s'expressa com $RP = m/\Delta m$, on Δm és l'amplada del pic mesurada a una alçada convinguda, generalment a la meitat del seu màxim

(FWHM, de *full width at half maximum*). En matrius complexes, un elevat RP es tradueix, per tant, en una major capacitat de l'espectròmetre de resoldre físicament la massa de l'anàlit de la massa d'interferències isobàriques coeluent provinents de la matriu (compostos que presenten la mateixa massa nominal però difereixen en la seva composició elemental i, per tant, tenen diferent massa exacta). D'altra banda, l'exactitud de massa (MA, de *mass accuracy*) es defineix com la diferència relativa entre el valor de m/z mesurat experimentalment i el valor de m/z teòric o calculat. En parts per milió (ppm), s'expressa com $MA = ((m/z)_{\text{experimental}} - (m/z)_{\text{teòric}}) / (m/z)_{\text{teòric}} \times 10^6$. A RP baixos, el perfil de masses mesurat és la suma dels perfils de masses individuals de l'anàlit i de la interferència coeluent, de manera que l'assignació de la massa, basada en un algoritme centroeide, resulta en una assignació incorrecta de la massa de l'anàlit. Així doncs, a mesura que augmenta el RP, major és la selectivitat i menor l'error en l'assignació de la massa exacta dels anàlits. Com a conseqüència, un RP insuficient o la selecció d'una amplada de finestra massa estreta en relació al RP pot donar lloc a falsos positius o falsos negatius, és a dir, a la presència o a l'absència de pic a la massa exacta esperada, respectivament. Diversos treballs conclouen que, a baixa concentració i en una matriu complexa com els pinsos, es requereix un RP igual o superior a 50 000 FWHM per a una assignació acurada de la massa exacta dels anàlits (<2-5 ppm) [77, 117, 134].

Taula 1.15. Paràmetres operacionals dels diferents analitzadors de masses [150].

Típus d'analitzador	Q	TOF*	Orbitrap*
Exactitud de massa (ppm)	Baixa	1-5	1-3
Poder de resolució (FWHM) [$\times 10^3$]	3-5	10-60	100-240
Interval de m/z (límit superior) [$\times 10^3$]	2-3	10-20	4
Velocitat d'adquisició (Hz)	2-10	10-50	1-5
Interval de linealitat	10^5 - 10^6	10^4 - 10^5	5×10^3
Preu	Baix	Moderat	Elevat

* Inclouen configuracions híbrides amb Q o LIT com a primer analitzador.

1.3.3. Quantificació

El calibratge és l'eina bàsica per a la quantificació dels anàlits en una mostra i és, per tant, de gran importància per a l'obtenció de resultats fiables. D'una banda, cal tenir en compte la recuperació de l'anàlit al final del procediment analític, és a dir, les possibles pèrdues que es poden produir durant les diferents etapes del tractament de mostra. Les recuperacions poden ser baixes especialment en els mètodes multiclasse en què els diferents anàlits sovint presenten propietats fisicoquímiques molt variades. D'altra banda, la influència de l'efecte matriu en l'etapa de mesura, especialment en la detecció per MS, també pot comprometre la correcta quantificació dels compostos d'interès. Una quantificació més o menys acurada dependrà, per tant, de l'estratègia de calibratge aplicada. A continuació, es descriuen les més habituals:

- Calibratge amb patrons en solució: corba obtinguda a partir de patrons de l'anàlit preparats en un solvent, és a dir, en absència de matriu. Constitueix el mètode més ràpid i simple, però no permet compensar les recuperacions ni eliminar l'efecte matriu i, per tant, pot conduir a resultats poc fiables.
- Calibratge per addició estàndard: corba obtinguda a partir de patrons preparats per l'addició, a l'inici del procés analític, de quantitats conegudes i creixents de l'anàlit a la pròpia mostra problema. El principal inconvenient es que cal realitzar addicions a cada mostra individual i la seva aplicació és, per tant, laboriosa i poc pràctica per a l'anàlisi de rutina quan el nombre de mostres és elevat. No obstant, permet simultàniament eliminar l'efecte matriu i corregir les pèrdues d'anàlit durant el tractament de mostra.
- Calibratge amb patrons *matrix-fortified* o *matrix-extracted*: corba obtinguda a partir de patrons preparats per l'addició, a l'inici del procés analític, de quantitats conegudes d'anàlit a una matriu de la mateixa naturalesa que les mostres a analitzar però lliure de l'anàlit a determinar (blanc de mostra) i posteriorment processada de manera anàloga a aquestes. Constitueix una alternativa viable a l'addició estàndard per tal de corregir les recuperacions i compensar l'efecte matriu, però únicament quan aquest és uniforme entre mostres i, per tant, no varia significativament respecte el del blanc de mostra seleccionat. En cas contrari, l'error comès en la quantificació pot ser considerable.

- Calibratge amb patrons *matrix-matched*: corba obtinguda a partir de patrons preparats per l'addició de quantitats conegudes d'anàlit als extractes procedents d'un blanc de mostra. Representa també una alternativa factible a l'addició estàndard per a l'eliminació de l'efecte matriu quan aquest és equivalent entre mostres però, a diferència d'aquesta i del calibratge *matrix-fortified*, no permet corregir les recuperacions.

Cap d'aquests enfocaments però, permet compensar les variacions incontrolades de la resposta instrumental de l'anàlit que es poden donar entre mostres. Si aquestes fluctuacions són significatives, es recomana la seva correcció mitjançant l'ús de patrons interns (IS, de *internal standard*). El cas ideal, és la selecció d'un IS per cadascun dels anàlits d'interès ja que ambdós compostos han de tenir un comportament el més similar possible. En la detecció per MS s'acostuma a emprar un patró de l'anàlit marcat amb un isòtop estable (^2H , ^{13}C , etc.) de manera que aquest té exactament les mateixes propietats fisicoquímiques que l'anàlit, coelueix amb ell i, per tant, presenta el mateix efecte matriu, fet que permet eliminar-lo. D'altra banda, els IS es poden afegir a l'extracte just abans de la mesura instrumental o ser adicionats a la mostra abans de l'extracció i sotmesos a tot el procés analític. En aquest últim cas, permeten corregir també els factors de recuperació i sovint reben el nom de *surrogate standards*. No obstant, per a la majoria dels anàlits, l'ús de IS marcats isotòpicament és difícil o, fins i tot, impossible atès el seu elevat cost o la manca de disponibilitat comercial. En la pràctica, en els mètodes multiresidu i multiclasse sol emprar-se un IS per a cadascuna de les famílies considerades.

En l'anàlisi de pinsos l'estratègia aplicada varia en funció del sistema de detecció emprat. Així doncs, el calibratge amb patrons en solució és el mètode més utilitzat quan la determinació es du a terme per LC-UV o LC-FL. En canvi, per tal de compensar l'important efecte matriu, els procediments més habituals en la detecció per MS són el calibratge *matrix-fortified* i *matrix-matched*, de vegades combinats amb l'ús de IS. No obstant, atesa la variabilitat i complexitat dels pinsos, no sempre és possible disposar d'una matriu blanca i representativa de les mostres a analitzar, fet que representa una de les principals limitacions d'aquestes dues aproximacions. L'ús de l'addició estàndard, més acurada, és poc habitual ja que comporta un increment considerable en el volum de mostres a processar.

1.3.4. Validació

La validació d'un mètode analític és el procediment que té per objectiu confirmar, mitjançant l'examen i l'aportació d'evidències objectives, que aquest compleix els requisits particulars per a un ús específic previst [70]. Pel que fa al control oficial de residus en aliments, mitjançant la Decisió 2002/657/CE [151], la UE reconeix que l'avanç continu en les tècniques analítiques d'ençà de l'adopció de la Directiva 96/23/CE [73] ha provocat que el concepte de mètodes de rutina i de referència hagi quedat obsolet. La Decisió 2002/657/CE [151] estableix requisits de funcionament i procediments de validació dels mètodes analítics, i criteris comuns d'interpretació dels resultats obtinguts. D'aquesta manera, els diferents laboratoris gaudeixen de flexibilitat per tal d'introduir i aplicar les noves tècniques analítiques i desenvolupar els seus propis mètodes en funció de les seves possibilitats (disponibilitat d'instruments, experiència, etc.), sempre que compleixin les especificacions establertes.

No obstant, en el sector de l'alimentació animal a dia d'avui no s'ha implementat cap normativa específica equivalent [134]. Així doncs, els mètodes d'anàlisi destinats al control oficial dels pinsos es caracteritzen per seguir els criteris generals establerts en el Reglament (CE) 882/2004 [69]. D'altra banda, el Reglament (CE) 152/2009 [152] estableix mètodes d'anàlisi per al control en pinsos de determinades substàncies, entre les quals es troben diversos agents antimicrobians autoritzats i no autoritzats com a additius (Taula 1.16). Aquest reglament contrasta amb la tendència iniciada per la UE en el control de residus en aliments, d'ençà de la implementació de la Decisió 2002/657/CE [151], d'abandonar la descripció detallada dels mètodes d'anàlisi. Tanmateix, també estableix que poden aplicar-se altres mètodes si es demostra que aquests proporcionen resultats analítics equivalents als mètodes proposats.

Actualment, per tant, existeixen notables diferències entre els requisits establerts per als mètodes destinats al control oficial d'aliments i de pinsos, les quals han condicionat en gran mesura les tècniques i els protocols de validació aplicats en ambdós camps. Pel que fa a les tècniques analítiques, per a la confirmació de substàncies permeses (grup B) la Decisió 2002/657/CE [151] estableix com a adequats aquells mètodes basats en la LC o la GC acoblades a diferents sistemes de detecció (FL, UV, MS, espectroscòpia d'infraroig, immunograma, etc.), mentre

que en el cas de substàncies prohibides (grup A), únicament es consideren aptes la LC i la GC amb detecció per MS o espectroscòpia d'infraroig. En canvi, el Reglament (CE) 152/2009 [152] no adopta els mateixos criteris per a l'anàlisi de pinsos i proposa mètodes de confirmació basats en la LC-UV per a additius no autoritzats. En la Taula 1.16 es mostra però, com els límits de quantificació (LOQ, *limit of quantification*) dels mètodes establerts per als additius no autoritzats són relativament alts i que, en el cas dels additius autoritzats, els LOQ són superiors al nivell màxim permès com a resultat d'una contaminació creuada (1 % contingut màxim autoritzat) de manera que els mètodes proposats no són aplicables per al seu control.

Taula 1.16. Mètodes d'anàlisi oficials per al control d'additius autoritzats i no autoritzats en pinsos i nivells màxims de contaminació creuada establerts [62, 152].

Annex IV i VIII Reglament (CE) 152/2009			Annex Directiva 2009/8/CE
Additius	Tècnica analítica	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Nivell màxim permès de contaminació creuada ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Autoritzats			
Halofuginona	LC-UV	1000	300
Robenidina	LC-UV	5000	700
Diclazuril	LC-UV	500	10
Lasalocid	LC-FL	10000	1250
No autoritzats			
Benzoquat de metil	LC-UV	1000	–
Olaquinox	LC-UV	5000	–
Amprolium	LC-UV	500	–
Carbadox	LC-UV	10000	–

D'altra banda, en la Taula 1.17 es mostren els paràmetres de validació que han de seguir els mètodes analítics emprats en el control oficial de pinsos i aliments d'acord amb la legislació aplicable en cada camp. El canvi més important introduït per la Decisió 2002/657/CE [151], és el reemplaçament dels paràmetres clàssics de límit de detecció (LOD, *limit of detection*) i límit de quantificació (LOQ) pel límit de decisió ($CC\alpha$, *decision limit*) i la capacitat de detecció ($CC\beta$, *detection capability*), respectivament. Fins al moment, la determinació del LOD i del LOQ continua sent la pràctica més estesa en els mètodes reportats per a l'anàlisi de pinsos. No obstant,

en alguns casos s'estableixen únicament el CC α i la CC β , mentre que en altres s'opta per determinar els quatre paràmetres per tal de permetre la comparació entre mètodes.

Taula 1.17. Criteris de validació dels mètodes analítics [69, 151].

PINSOS Annex III Reglament (CE) 882/2004	ALIMENTS Decisió 2002/657/CE
a) Veracitat/recuperació	a) Veracitat/recuperació
b) Precisió (repetibilitat i reproductibilitat)	b) Precisió (repetibilitat, reproductibilitat i reproductibilitat intralaboratori)
c) Aplicabilitat	c) Robustesa
d) Selectivitat	d) Especificitat
e) Linealitat	e) Corbes de calibratge
f) Mesura de la incertesa	f) Estabilitat
g) Límit de detecció (LOD)	g) Límit de decisió (CC α)
h) Límit de quantificació (LOQ)	h) Capacitat de detecció (CC β)

A continuació, es defineixen els diferents paràmetres i els requisits a seguir per a la seva determinació:

- **Exactitud (*accuracy*):** grau de concordança entre el resultat de l'assaig i un valor de referència acceptat. S'obté determinant la veracitat i la precisió.
- **Veracitat (*trueness*):** grau de concordança entre la mitjana d'un nombre elevat de resultats i un valor de referència acceptat. S'expressa normalment com a biaix, és a dir, com la diferència entre aquest valor mitjà i el de referència. Aquest últim s'estableix a partir de l'anàlisi d'un material de referència certificat (CRM, de *certified reference material*). Un CRM és un material al qual se li ha assignat un contingut d'anàlit especificat, acompanyat de la incertesa associada amb un determinat nivell de confiança. Actualment però, a la base de dades internacional de CRM (COMAR, de *Code d'indexation des matériaux de référence*) [153], no es troba disponible cap CRM representatiu per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos. En el cas de no disposar de CRM, en comptes de la veracitat es pot avaluar la recuperació (*recovery*), és a dir, el percentatge de la quantitat d'una substància recuperat durant el procediment analític. Aquesta es determina a partir de mostres dopades o fortificades (*spiked*

or *fortified samples*), és a dir, de l'addició de quantitats conegudes d'anàlit a mostres de matriu blanques.

- Precisió (*precision*): grau de concordança entre resultats d'assajos independents obtinguts en condicions predeterminades. S'expressa com a imprecisió mitjançant el càlcul de la desviació estàndard dels resultats dels assajos. Es pot avaluar en condicions de repetibilitat, reproductibilitat intermèdia o intralaboratori i/o reproductibilitat interlaboratori (Taula 1.18). Aquesta última es determina mitjançant la participació en assajos d'aptitud (PT, de *proficiency test*). Actualment, a la base de dades de PT (EPTIS, de *European proficiency testing information system*) [154], hi consten quatre assajos d'aptitud organitzats per tal d'avaluar la competència dels laboratoris participants en l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos (Taula 1.19).

Taula 1.18. Condicions d'avaluació de la precisió.

Repetibilitat	Reproductibilitat intralaboratori	Reproductibilitat interlaboratori
Igual: <ul style="list-style-type: none"> • Laboratori • Mètode • Operador • Mostres d'anàlisi • Equip • Dia 	Igual: <ul style="list-style-type: none"> • Laboratori • Mètode • Mostres d'anàlisi Diferent: <ul style="list-style-type: none"> • Dia Igual/diferent: <ul style="list-style-type: none"> • Operador • Equip 	Igual: <ul style="list-style-type: none"> • Mostres d'anàlisi Diferent: <ul style="list-style-type: none"> • Laboratori • Operador • Mètode • Equip Igual/diferent: <ul style="list-style-type: none"> • Dia

- Aplicabilitat/robustesa: mesura de la susceptibilitat d'un mètode analític a petits canvis de les condicions experimentals. S'avaluen canvis tant en la preparació de la mostra com en la mesura analítica (pH, temperatura, temps d'extracció, etc.).
- Especificitat/selectivitat: capacitat d'un mètode analític de distingir entre l'anàlit i altres substàncies (components de la matriu, metabòlits, etc.) en les condicions experimentals.
- Linealitat/corbes de calibratge: capacitat d'un mètode analític de produir, directament o mitjançant una transformació matemàtica definida, resultats

proporcionals a la concentració d'anàlit en la mostra. L'interval de linealitat acostuma a ser relativament ampli de manera que, a la pràctica, es delimita un interval de treball que inclou les concentracions d'interès i el límit inferior del qual correspon generalment al LOQ del mètode.

- Incertesa de la mesura: paràmetre no negatiu que caracteritza la dispersió dels valors de quantificació que s'atribueixen a un mesurant.
- Estabilitat: s'estudia l'estabilitat dels anàlits tant en solució com en la matriu, ja que la inestabilitat dels anàlits o dels components de la matriu durant l'emmagatzematge o l'anàlisi de les mostres pot donar lloc a desviacions significatives dels resultats.
- Límit de detecció (LOD, de *limit of detection*): menor concentració d'anàlit en una mostra que pot ser confiadament distingida del blanc.
- Límit de quantificació (LOQ, de *limit of quantification*): menor concentració d'anàlit en una mostra que pot ser determinada amb un nivell d'incertesa acceptable.
- Límit de decisió ($CC\alpha$, *decision limit*): límit en el qual i a partir del qual es pot concloure amb una probabilitat d'error α que una mostra es no conforme. L'error α és la probabilitat de que la mostra analitzada sigui realment conforme, encara que s'hagi obtingut una mesura no conforme (decisió de fals no conforme).
- Capacitat de detecció ($CC\beta$, *detection capability*): contingut mínim d'una substància que pot ser detectat, identificat o quantificat en una mostra, amb una probabilitat d'error β . L'error β és la probabilitat de que la mostra analitzada sigui realment no conforme, encara que s'hagi obtingut una mesura conforme (decisió de fals conforme).

D'altra banda, en el cas de criteris encara no contemplats en la normativa específica per a pinsos, com ara els de confirmació per MS, es recorre a aquells establerts en la Decisió 2002/657/CE [151]. Aquesta implementa un sistema de punts d'identificació (IP, de *identification point*), els quals s'atribueixen en funció de les tècniques analítiques emprades. Així per exemple, a la LC-UV i la LC-FL se'ls atribueix 1 IP i a la LC acoblada a un detector de MS de baixa resolució se li assigna 1 IP per cada ió precursor i 1.5 IP per cada ió producte. Per a confirmar la presència de substàncies permeses s'han d'assolir un mínim de 3 IP, mentre que si es tracta de substàncies prohibides són necessaris 4 IP com a mínim. A més, també

cal determinar la intensitat relativa dels ions detectats, i aquesta no pot superar les toleràncies màximes permeses. En el cas de la HRMS, s'adquireixen 2 IP per cada ió precursor i 2.5 IP per cada ió producte amb un poder de resolució superior a 20 000 FWHM, però no s'estableixen criteris pel que fa a l'exactitud massa. També es du a terme la comparació de l'espectre experimental obtingut amb un espectre teòric o de referència de la substància. Diversos treballs proposen que tant el poder de resolució com l'exactitud de massa, paràmetres que afecten la identificació dels compostos, siguin implementats en la revisió de la Decisió 2002/657/CE [155].

Taula 1.19. Assajos d'aptitud organitzats per a la determinació d'agents antimicrobians en pinsos.

Proveïdor	País	Nom	Agents antimicrobians		Freqüència	Ref.
AAFCO	EUA	AAFCO feed check sample program	Amprolium*	Narasina*	1 mostra/mes	[156]
			Apramicina	Neomicina		
			Bacitracina*	Nicarbazina*		
			Carbadox*	Nitrofurazona		
			Clopidol*	Oxitetraciclina*		
			Clortetraciclina*	Penicil·lina		
			Decoquinat*	Salinomicina*		
			Eritromicina*	Sulfadimetoxina*		
			Estreptomicina	Sulfadimidina*		
			Etopabat	Sulfaquinoxalina*		
			Fenbendazole*	Sulfatiazole*		
			Furazolidona*	Tiabendazole		
			Ipronidazole	Tiamulina*		
			Lasalocid*	Tilosina*		
			Lincomicina*	Virginiamicina		
Monensina*						
Ducares	Països Baixos	Veterinary drugs – chemical methods	Monensina*	Nicarbazina*	4 mostres/any	[157]
			Salinomicina*	Robenidina		

* Estudiats en aquesta tesi.

n.e.: no especificada.

Taula 1.19. Assajos d'aptitud organitzats per a la determinació d'agents antimicrobians en pinsos.

Proveïdor	País	Nom	Agents antimicrobians		Freqüència	Ref.
RIKILT	Països Baixos	Antibiotics at carry-over level in feed	β -lactames	Quinolones*	n.e.	[158]
			Aminoglicòsids	Sulfonamides*		
			Macròlids*	Tetraciclins*		
Test Veritas	Itàlia	Progetto Trieste	Sulfadiazina*	Sulfaquinoxalina*	1-2 mostres/any	[159]
			Sulfametoxipiridazina*	Sulfatiazole*		
			Sulfadimetoxina*	Clortetraciclina*		
			Sulfadimidina*	Doxiciclina*		
			Sulfamerazina*	Oxitetraciclina*		
			Sulfamonometoxina	Tetraciclina*		

* Estudiats en aquesta tesi.

n.e.: no especificada.

OBJECTIUS

Capítol 2

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat el desenvolupament i la validació de metodologies per a l'anàlisi de baixes concentracions d'agents antimicrobians en pinsos destinats a l'alimentació animal. Els anàlisis estudiats pertanyen a les principals famílies emprades en medicina veterinària (tetraciclines, sulfamides, macròlids, etc.).

Els objectius concrets han estat:

- Revisar les metodologies analítiques establertes en els últims anys (període 2000-actualitat) per a la determinació d'agents antimicrobians en pinsos i del marc legislatiu vigent en el camp;
- Desenvolupar mètodes analítics per a la determinació de sulfamides i fluoroquinolones basats en la cromatografia de líquids amb detecció fluorimètrica;
- Establir un mètode multiclasse basat en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem per a l'anàlisi d'un elevat nombre d'agents antimicrobians que permeti englobar i simplificar els mètodes emprats en un laboratori de control oficial;
- Estudiar l'efecte matriu en la detecció per espectrometria de masses i avaluar l'extracció en fase sòlida i l'extracció en fase sòlida dispersiva com a tècniques de *clean-up* per a la seva minimització;
- Avaluar i comparar l'eficàcia en la separació cromatogràfica amb columnes de partícules de nucli sòlid enfront de columnes convencionals de partícules totalment poroses;
- Validar els mètodes en una àmplia varietat de pinsos destinats a l'alimentació de diferents espècies animals i aplicació a l'anàlisi de mostres reals;
- Dissenyar i desenvolupar un algoritme automatitzat (macro) per a la correlació d'ions en espectrometria de masses d'alta resolució.

The general objective of this thesis was the development and validation of analytical methodologies for the determination of low concentrations of antimicrobial agents in animal feeds. The analytes studied belong to families widely used in veterinary medicine (tetracyclines, sulfonamides, macrolides, etc.).

The specific aims for the work developed were the following:

- To review the analytical methodologies published in the last few years (from 2000 to the present date) for the analysis of antimicrobial agents in animal feedingstuffs, and the current legislative framework in this field;
- To develop analytical methods for the determination of sulfonamides and fluoroquinolones by liquid chromatography with fluorescence detection;
- To implement a multiclass method based on liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of a large number of antimicrobial agents in order to encompass and simplify the methods used in an official control laboratory;
- To study the matrix effects on mass spectrometry detection and to evaluate the solid-phase extraction and dispersive solid-phase extraction clean-up techniques, for its minimization;
- To assess and compare the efficiency in the chromatographic separation using core-shell particle columns *versus* conventional fully porous particle columns;
- To validate the methods for a wide variety of feeds intended for different animal species and application to the analysis of real samples;
- To design and develop an automated algorithm (macro) for the correlation of ions in high-resolution mass spectrometry.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Capítol 3

3.1. Anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos (revisió)

En els darrers anys, nombroses revisions han abordat l'anàlisi de residus d'agents antimicrobians, o de medicaments veterinaris en general, en el camp de la seguretat alimentària. No obstant, la majoria de treballs s'han centrat únicament en aliments d'origen animal [18, 155, 160-165], i pocs inclouen els pinsos com a matriu d'interès [155, 163, 164]. A més, fins al moment, només un article de revisió ha estat dedicat en exclusiva als pinsos. Aquest però, tan sols fa referència a l'anàlisi d'agents antimicrobians no autoritzats com a promotors de creixement [166].

És per això que, en el marc d'aquesta tesi, s'ha dut a terme una revisió per tal de conèixer l'estat actual i les tendències emergents en l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos. Aquesta s'ha realitzat juntament amb el Laboratori Agroalimentari de Cabriels (LAC) [167] i el centre Mas de Bover de l'Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA) [168], ambdós adscrits al Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya (DAAM). D'una banda, el LAC constitueix el servei oficial i la base tècnica de l'administració catalana pel que fa a l'anàlisi de les mostres de pinso preses en els controls oficials. De l'altra, el centre Mas de Bover de l'IRTA té entre d'altres objectius, el d'impulsar la recerca i el desenvolupament tecnològic en matèria de nutrició, salut i benestar animal i producció de pinsos. Aquesta col·laboració ha permès, doncs, abordar l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos des de diferents perspectives i en la seva globalitat, és a dir, des de la fabricació de pinsos fins a la seva anàlisi pròpiament dita. Així, en primer lloc, s'han revisat els aspectes més rellevants relacionats amb els pinsos (producció, composició, problemàtica de la contaminació creuada, etc.), així com també el marc legislatiu vigent en el camp. En segon lloc, s'han revisat de manera exhaustiva els mètodes analítics establerts en els últims anys (període 2000-2010) per a les principals famílies d'agents antimicrobians, amb especial atenció en les tècniques analítiques i els criteris de validació emprats.

Aquest treball ha donat lloc a la publicació del següent article: *Analysis of antimicrobial agents in animal feed*. Trends in Analytical Chemistry 2011, 30(7), 1042-1064. Amb aquesta revisió, s'ha aconseguit, per tant, cobrir el buit detectat en l'àmbit que ens ocupa.

Les diferents parts de què consta ja han estat tractades àmpliament al llarg de la introducció de la present tesi. Els nous mètodes desenvolupats d'ençà de la seva publicació (període 2010-actualitat) s'han recollit en la Taula 3.1. Aquests mostren, sens dubte, una major acceptació de la MS en el camp i un augment de la tendència cap al desenvolupament de mètodes multiclasse amb tractaments de mostra genèrics.

3.1.1. Publicació I. *Analysis of antimicrobial agents in animal feed (review)*

Trends

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 7, 2011

Analysis of antimicrobial agents in animal feed

S. Borràs, R. Companyó, M. Granados, J. Guiteras, A.M. Pérez-Vendrell, J. Brufau, M. Medina, J. Bosch

We review current trends in the analysis of antimicrobial agents in animal feeds. After a brief introduction to feed-industry figures and the unavoidable problem of cross-contamination, we provide an overview of the European Union legislative framework for feedingstuffs. We devote the core of the article to analytical methodology developed over the past 10 years for monitoring residues of antibiotics and coccidiostats in feedingstuffs in order to ensure that feeds comply with current legislation and are of high quality and safety for both livestock and consumers. We consider the potential and the limitations of analytical methods and devote special attention to their validation and performance characteristics.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Analytical methodology; Animal feed; Antibiotic; Antimicrobial agent; Coccidiostat; Cross-contamination; European Union legislation; Feedingstuff; Medicated feed; Method validation

1. Introduction

S. Borràs, R. Companyó*,
M. Granados, J. Guiteras
Departament de Química
Analítica,
Universitat de Barcelona (UB),
Martí i Franquès 1-11,
08028 Barcelona,
Spain

A.M. Pérez-Vendrell, J. Brufau
Institut de Recerca i Tecnologia
Agroalimentàries (IRTA),
Generalitat de Catalunya,
43120 Constantí,
Spain

M. Medina, J. Bosch
Laboratori Agroalimentari de
Catalunya (LAC),
Generalitat de Catalunya,
08348 Cabrils, Spain

Livestock production is an important economic sector all over the world. In the European Union (EU), its value amounted to €152bn in 2008. Fig. 1 shows the economic data for the period 2004–2008 [1].

Adequate animal feedingstuffs, which are the main input into livestock production, should be used to ensure that the final product reaching the market has the required quality and poses no risk to the consumer. It is estimated that about 70% of animal-production costs are attributable to the cost of feed. Fig. 2 shows the feed-production figures in the EU in the period 1989–2009 [1].

Animal feeds must have the required quality and be appropriate from a nutritional viewpoint. Also, they must be safe (i.e. they must be free from contaminants and residues in general, and from residues of veterinary drugs in particular). This is very important in the case of antimicrobials, which might provoke allergies and contribute to the development of resistant bacterial strains if they reach the food chain. Some substances are banned, while others are authorized as long as their concentrations in food of animal origin remain below certain established limits. Regulation (EC) 1831/2003 [2], which

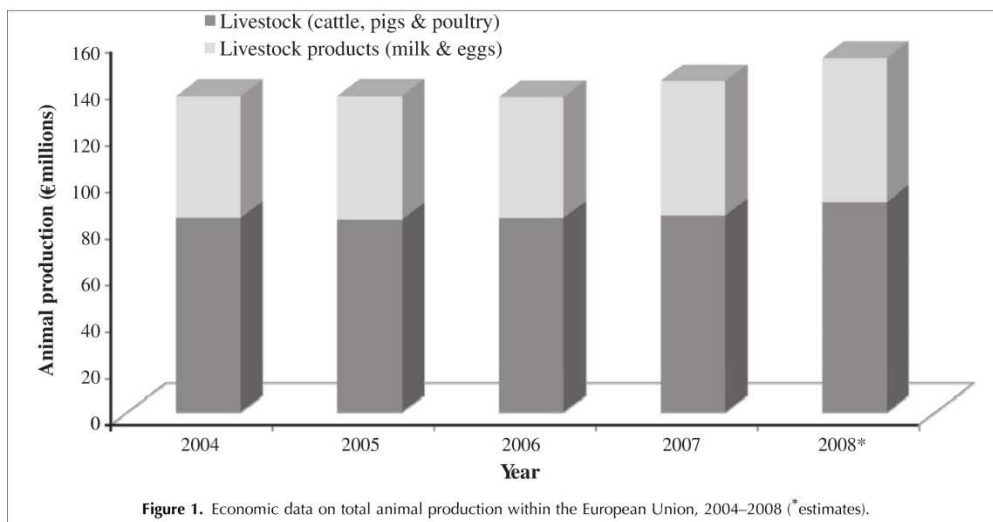
banned the use of all antibiotics other than coccidiostats and histomonostats, as feed additives from 1 January 2006, represented a significant turning point in this field. The moratorium on the use of coccidiostats and histomonostats will expire on 1 January 2012. Antimicrobial drugs can reach feeds in three different ways:

- authorized (for therapeutic and prophylactic purposes);
- unauthorized (as growth promoters to increase yield); and
- unintentional (as a result of the so-called cross-contamination).

Use of authorized drugs is easy to control. Their use has to be registered, and their concentrations in feeds are relatively high, so they are easily detected and determined. Unauthorized use is another matter, because many different substances can be used at relatively low concentrations and there is no hint about which feeds can be affected. Cross-contamination is easier to detect, as it can be expected to happen just after preparation of a medicated feed, and the drugs belong to the authorized group; the main difficulty comes because concentrations can be quite low.

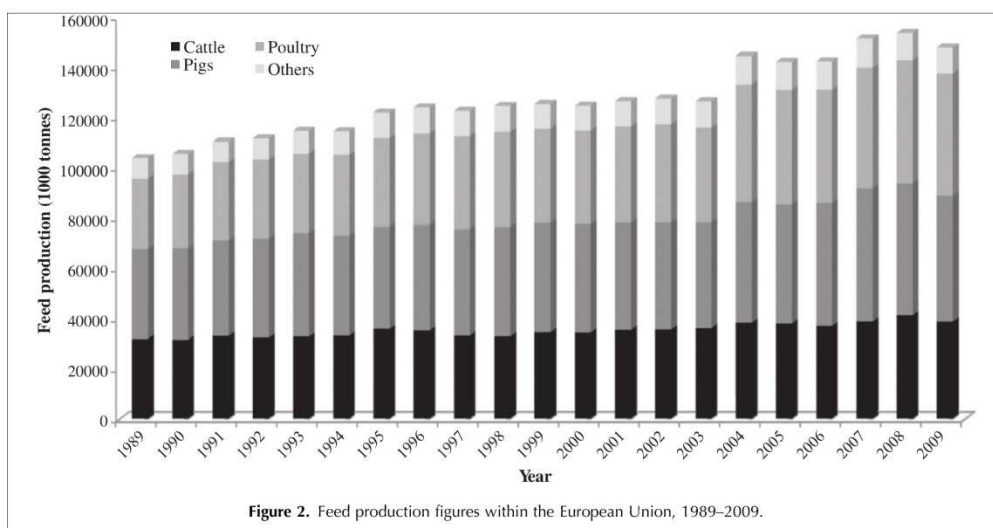
Laboratories performing official feed analyses must be accredited according to the ISO/IEC 17025:2005 standard [3], and the analytical methods used must be validated.

*Corresponding author.
Tel.: +34 934039119;
Fax: +34 934021233;
E-mail: compano@ub.edu



As may be expected with so complex a matrix, virtually all methods reported in the past 10 years make use of an extraction step, and, often, also a clean-up step, although sometimes this is replaced by simple dilution of the extract. In most cases, existing methods are intended for the analysis of substances belonging to the same family; multi-residue methods are still rare.

This article begins with some considerations about feed composition and complexity, and the problems derived from cross-contamination during feed production, followed by a description of European legislation on feeds and feed analysis, some comments on sampling, a review of relevant analytical methods published in the past 10 years (starting in 2000) and a discussion on method validation.



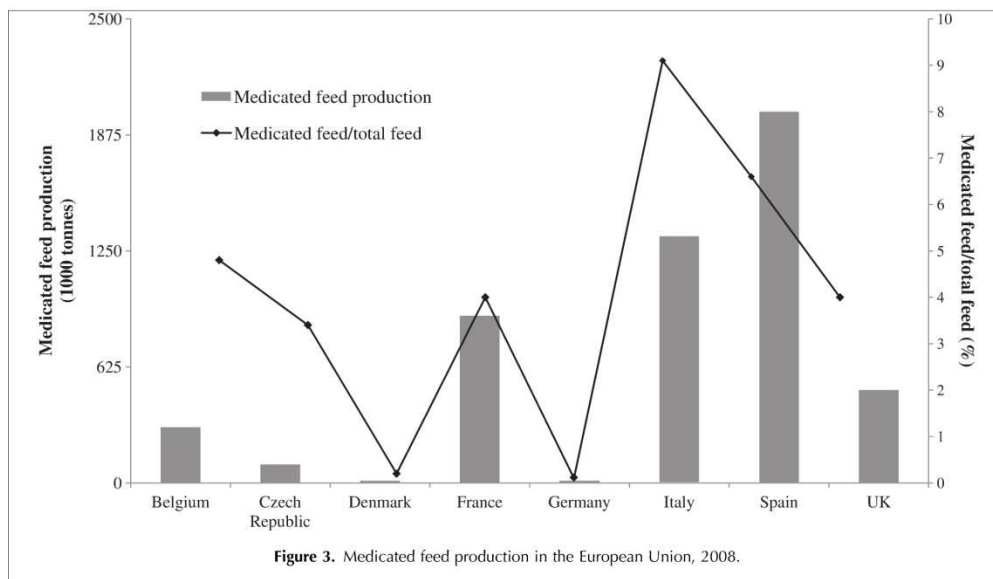


Figure 3. Medicated feed production in the European Union, 2008.

2. Feed types and composition

The legal definition of feed or feedingstuff states that it is any substance or product, including additives, whether processed, partially processed or unprocessed, intended to be used for oral feeding to animals [4].

Different animal species require different nutritive doses to get an equilibrated diet and be able to develop their specific productive functions. Nutritive fractions perform different functions, depending on the species, age, sex, vital stage, productive purpose and health state. The different ingredients must be combined in the amounts required to obtain rations able to fulfill the daily requirements of nutritive principles. Also, an equilibrated ration should have good structure and presentation, be easily digested, cheap and improve the quality of the final product. Rations should be periodically changed, depending on animal requirements (weight development and productivity) as well as the cost of the ingredient compounds.

Feedingstuffs used for this purpose can be classified into three categories: concentrated, fiber-containing and supplements. Feed components may include cereals, sugars or fruits, fats, roots or tubers, leguminous or oleaginous plants, amino acids, and minerals. The main analytes to be monitored are carbohydrates (as non-nitrogenous extract and crude fiber), simple or compound lipids, protein or non-protein nitrogen, liposoluble and water-soluble vitamins, inorganic matter, additives, contaminants and residues.

Original feed components usually have different densities and particle sizes, which makes it difficult to mix them. In order to obtain a homogeneous feed, the different components are ground until all particles have roughly the same size. In most cases, the resulting homogeneous flour is pelleted to enhance the nutritional quality and to reduce the danger of segregation during transport or handling.

Feed additives [2] are substances, micro-organisms or preparations, other than feed material and premixtures, which are intentionally added to feed or water in order to perform, in particular, one or more of the following functions:

- (1) satisfy the nutritional needs of animals;
- (2) have a coccidiostatic or histomonostatic effect;
- (3) favorably affect the characteristics of feed and animal products; or,
- (4) favorably affect animal production, performance or welfare, particularly by affecting the gastro-intestinal flora or digestibility of feedingstuffs and the environmental consequences of animal production.

Medicated feeds are a particular kind of feed, differing from regular feeds as they contain relatively high concentrations of pharmacologically-active substances, added by veterinary prescription for therapeutic purposes. According to Directive 2001/82/EC [5], a medicated feedingstuff is any mixture of a veterinary medicinal product or products and feed or feeds that is ready prepared for marketing and intended to be fed to animals without further processing, because of its curative,

preventive or other properties. The volume of medicated feed in the EU was recently reported [6], and Fig. 3 shows that its significance in terms of production varies dramatically among EU Member States. In 2008, the highest production of medicated feeds was in Spain (about 2 million tonnes).

2.1. Cross-contamination

Different compound feeds have to be manufactured in the same production line, one after the other. At the switch-over from one product to the next, traces of the first product may remain in the production line and get mixed with the first batches of the next product. The transfer from one production batch to the following batch is called "carry-over", which may result in cross-contamination if some undesirable materials are transferred.

Cross-contamination, then, occurs when trace amounts of drugs or chemicals are incorporated into feeds that should not contain them. Usually affected are batches obtained just after production of a medicated feed that legally contains the drug in question. Feeding these contaminated feeds may lead to the presence of residues in the animals consuming them [7].

Drug carry-over during feed processing may occur for many reasons. For example, some properties of the pharmaceutical products (e.g., adhesive strength, particle size, and electrostatic properties) affect how cross-contamination occurs. The technological equipment in the feed mill can also influence the level of cross-contamination; it may occur in a single piece of equipment or it may be a combination of residues throughout the entire system. Finally, transport and storage facilities and conditions are also important factors.

Several studies have shown that production of pre-mixes and compound feeds that are free of contamination is, in practice, very difficult in existing multi-product plants [8], although, with an appropriate Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system, set out in Regulation (EC) 183/2005 [9], cross transference of antibiotics or coccidiostats could be reduced to a great extent.

Recent legislation [10] recognized the unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in non-target feed in spite of the application of good manufacturing practices and established maximum levels of these drugs in the cross-contaminated feeds, according to the sensitivity of the non-target species fed with these feeds. However, this legislation does not give legal cover to the carry-over of other substances that is also unavoidable (e.g., veterinary drugs contained in prescribed medicated feeds). Three clean-out methods are commonly used to minimize cross-contamination of feeds:

- sequential batching (manufacturing the feeds with higher drug levels first and ending with those containing lower levels);

- flushing (use of an ingredient containing no additives to clean out the mixing and conveying systems); and,
- least used, equipment clean-out.

3. Legislation

Animal feeding is an important economic activity and has a clear impact on food safety; for this reason, everything related to ingredients, commercialization and effect on the food-chain safety is strictly regulated and controlled. Present legislation regulates three broad aspects of animal feeding:

- policies and controls to be applied;
- ingredients and commercialization; and, finally,
- sampling procedures and analytical methods to be used.

The most significant aspects of the current legislation, summarized chronologically in Table 1, are described in the following paragraphs.

Regulation (EC) 178/2002 [4] establishes the principles and the general requirements of alimentary legislation, creates the European Food Safety Authority (EFSA) and sets out the procedures related to alimentary safety. It confirms the principle that all food and feed, whether produced within the European Community (EC) or imported from abroad, must fulfill the applicable requirements of the EC legislation before being approved for commercialization. It also confirms the so-called "from farm to fork" principle, by which feeds are considered to be a sensitive stage at the beginning of the food chain. Pursuant to Article 50 of Regulation (EC) 178/2002 [4], a Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) was put in place as a network involving the Member States, the Commission and the EFSA. In the past 10 years, RASFF [11] reported 43 notifications concerning residues of veterinary medicinal products in animal feeds, against 1560 notifications regarding food matrices. Most of these 43 notifications referred to the presence of chloramphenicol in feeds and, to a lesser extent, tetracyclines, sulfadiazine, colistin or tylosin.

Following these principles, Regulation (EC) 882/2004 [12] reorganizes and harmonizes official controls on food and feed so that they must be present at all stages and sectors of the production process. In order to improve the control services from the Member States, it introduces working criteria for the competent authorities, a better definition of the tasks, harmonization of control services and their integration within the food chain and reinforcement of the role of the Community Reference Laboratories (CRL) network. After this definition of the functions and the tasks of the competent authorities, the subsequent Regulation (EC) 183/2005 [9] declares feed and food companies to hold main responsibility for feed safety, and compels them to use procedures based on the

Table 1. Main legislative documents of the European Union (in chronological order)

Document	Title	Scope	Ref.
Directive 90/167/EC	Laying down the conditions governing the preparation, placing on the market and use of medicated feedingstuffs in the Community	Medicated feedingstuffs	[16]
Directive 96/25/EC	On the circulation of feed materials	Additives Feed Raw materials	[13]
Directive 2001/82/EC	On the Community code relating to veterinary medicinal products	Veterinary drugs	[5]
Directive 2004/28/EC			[17]
Directive 2009/9/EC			[19]
Regulation (EC) 178/2002	Laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Authority Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety	Controls	[4]
Directive 2002/32/EC	On undesirable substances in animal feed	Undesirable substances	[15]
Decision 2002/657/EC	Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results	Analysis for the official control of feedingstuffs Methods of sampling	[25]
Regulation (EC) 1831/2003	On additives for use in animal nutrition	Additives Feed Raw materials	[2]
Regulation (EC) 882/2004	On official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules	Controls	[12]
ISO/IEC 17025:2005	General requirements for the competence of testing and calibration laboratories	Controls	[3]
Regulation (EC) 183/2005	Laying down requirements for feed hygiene	Additives Feed Raw materials	[9]
Directive 2006/130/EC	Regarding the establishment of criteria for exempting certain veterinary medicinal products for food-producing animals from the requirement of a veterinary prescription	Medicated Feedingstuffs	[18]
Regulation (EC) 152/2009	Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed	Analysis for the official control of feedingstuffs Methods of sampling	[24]
Directive 2009/8/EC	Regarding maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in non-target feed	Additives Carry-over Feed	[10]
Regulation (EC) 767/2009	On the placing on the market and use of feed	Additives Feed	[14]
Regulation (EU) 454/2010		Raw materials	[21]
Regulation (EU) 242/2010	Creating the Catalogue of feed materials	Additives Feed Raw materials	[20]

principles of the HACCP and to apply good hygiene practices.

A key point to guarantee feed safety is the nature and the traceability of the ingredients. The first norm for harmonization of the national rules applicable to use and circulation of raw materials for animal feeding, and to guarantee that they would mean no hazard for animal or human health, or the environment, was Directive 96/25/EC [13], now repealed by Regulation (EC) 767/2009 [14]. Directive 96/25/EC set up a non-exhaustive list of the main raw materials for animal feeding. Along this line of regulating the ingredients for animal feeding, Directive 2002/32/EC [15] limits the presence of some undesirable substances (e.g., heavy metals, dioxins, aflatoxins, certain pesticides and botanical impurities) in feeds and reinforces guarantees about the use of ade-

quate feeds of good quality. The recently issued Regulation (EC) 767/2009 [14] is a main revision of the EU norm on commercialization of raw materials for feeds and compound feeds, with the objective of ensuring a high level of feed safety and, consequently, of public-health protection, and consolidating efficient operation of the internal market. This Regulation has a fundamental impact on veterinary drugs as, together with additives, they are no longer considered to be raw materials for feeds, and their use must be justified by a scientific assessment. Regulation (EC) 1831/2003 [2] establishes that, before being commercialized, used or transformed, the safety of all additives for animal feeding must be assessed by a community procedure that must include studies of their residues in food. The EFSA is responsible for conducting the scientific evaluation of

Table 2. Analytical methods to control the levels of authorized and non-authorized additives in feed according to Regulation (EC) 152/2009

Compound	Sample treatment		Analytical technique		Method performance	
	Extraction procedure	Clean up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)
<i>AUTHORISED ADDITIVES (Annex IV)</i>						
Halofuginone	Technique: sonication + shaking Time: 10 min Solvent: EtOAc + 0.1 M HCl	Technique: cation exchange column Elution solvent: MeOH	LC-UV	Column: C ₁₈ (300 × 4 mm, 10 μm) Mobile phase: pH 4.3 buffer:ACN:H ₂ O Elution: isocratic (15:25:60)	≥ 80	LOQ: 1000
Robenidine	Technique: mechanical shaking Time: 1 h Solvent: 0.8% HCl in MeOH	Technique: aluminum oxide column Elution solvent: MeOH	LC-UV	Column: C ₁₈ (300 × 4 mm, 10 μm) Mobile phase: 0.025 M phosphate solution:H ₂ O:ACN Elution: isocratic (10:25:65)	≥ 85	LOQ: 5000
Diclazuril	Technique: mechanical shaking Time: overnight Solvent: 0.5% HCl in MeOH	Technique: SPE (C ₁₈ cartridges) Elution solvent: 0.5% HCl in MeOH:H ₂ O (80:20)	LC-UV	Column: C ₁₈ (100 × 4.6 mm, 3 μm) Mobile phase A: 0.06 M ammonium acetate + 0.01 M TBHS Mobile phase B: ACN Mobile phase C: MeOH Elution: gradient Internal standard	≥ 80	LOD: 100 LOQ: 500
Lasalocid	Technique: sonication in a water bath (40°C) Time: 1 h 20 min Solvent: 0.5% HCl in MeOH	None	LC-FL	Column: C ₁₈ (125 × 4 mm, 5 μm) Mobile phase: pH 4 buffer:MeOH Elution: isocratic (5:95)	≥ 80	LOD: 5000 LOQ: 10000
<i>NON AUTHORISED ADDITIVES (Annex VIII)</i>						
Methyl benzoate	Technique: mechanical shaking Time: 30 min Solvent: 2% methanesulfonic acid	Technique: LLE + cation exchange column + LLE Elution solvent: DCM + 2% methanesulfonic acid + DCM Dilution	LC-UV	Column: C ₁₈ (300 × 4 mm, 10 μm) Mobile phase: MeOH:H ₂ O Elution: isocratic (75:25)	≥ 90	LOQ: 1000
Olaquinox	Technique: sonication + mechanical shaking Time: 50 min Solvent: MeOH + H ₂ O	Dilution	LC-UV	Column: C ₁₈ (250 × 4 mm, 10 μm) Mobile phase: H ₂ O:MeOH Elution: isocratic (90:10)	≥ 90	LOQ: 5000
Amprolium	Technique: sonication + mechanical shaking Time: 1 h 15 min Solvent: MeOH:H ₂ O (67:33)	Dilution	LC-UV	Column: cation exchange (125 × 4 mm, 10 μm) Mobile phase: 0.1 M phosphate solution: 1.6 M perchlorate solution: ACN Elution: isocratic (45:10:45)	≥ 90	LOD: 1000 LOQ: 5000
Carbadox	Technique: mechanical shaking Time: 35 min Solvent: H ₂ O + MeOH:ACN (50:50)	Technique: aluminum oxide column Elution solvent: none	LC-UV	Column: C ₁₈ (300 × 4 mm, 10 μm) Mobile phase: pH 6 buffer:ACN Elution: isocratic (82.5:17.5)	≥ 90	LOD: 1000 LOQ: 5000

additives prior to authorization. In this task, EFSA is assisted by the Joint Research Centre nominated by Regulation (EC) 1831/2003 [2] as a CRL for authorization of feed additives. Directive 90/167/EC [16] establishes conditions for the preparation, commercialization and use of medicated feeds to guarantee public-health protection against potential hazards derived from the administration of medicated feeds to animals des-

igned for the production of food intended for human consumption. As shown in Table 1, other EU regulations [5,10,17–21] deal with more specific aspects of feed ingredients and commercialization.

In the USA, the use of food products is governed by the provisions of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FFDCA), and the regulations issued under its authority. These regulations are published in the Code of Federal

Regulations (CFR). The FFDCA defines food as “articles used for food or drink for man or other animals...” Therefore, any article that is intended to be used as an animal-feed ingredient, to become part of an ingredient or feed, or added to an animal’s drinking water is considered a “food” and thus subject to regulation. The US Food and Drug Administration (FDA) [22] carries out its responsibility for the regulation of animal feed in cooperation with State and local partners. The FDA also cooperates with the Association of American Feed Control Officials (AAFCO) [23] and the States for the implementation of uniform policies for regulating the use of animal-feed products. This includes the establishment of uniform feed-ingredient definitions and proper labeling to assure the safe use of feeds. FDA considers safe animal-feed supply helps ensure healthy animals and people. To that end, the Center for Veterinary Medicine (CVM) monitors and establishes standards for feed contaminants, approves safe food additives, and manages the FDA’s medicated feed and pet-food programs.

Regarding official feed analysis, EU Regulation (EC) 882/2004 [12] simply establishes that laboratories must be accredited according to the ISO/IEC 17025:2005 standard [3], and Annex III lists the working parameters that must be validated. However, the recently issued Regulation (EC) 152/2009 [24] describes in Annex II the general rules to be followed by the analytical laboratories, and, in the following annexes, it describes in detail the analytical methods to be used. More specifically, annexes IV and VIII refer, respectively, to authorized and non-authorized additives, including some antimicrobials (halofuginone, robenidine, diclazuril, lasalocid, methyl benzoquate, olaquinox, amprolium and carbadox). In this article, Table 2 summarizes these methods, which are all based on liquid chromatography (LC) with ultraviolet (UV) or fluorescence (FL) detection. Surprisingly, no method based on LC with mass spectrometry (LC-MS) is included in the annexes. This regulation represents a significant change in the trend of European legislation issued in recent years regarding methods of analysis. It requires specification of the quality parameters that must be fulfilled by the analytical methods instead of setting out in detail the analytical procedures. Moreover, the number of antimicrobials included is low compared with the number of veterinary drugs controlled in animal feed.

Until the issue of Regulation (EC) 152/2009 [24], there was widespread agreement that Decision 2002/657/EC [25] should be applied to feed analysis. This Decision introduced the concepts of identification points, decision limit (CC α) and detection capability (CC β) that are no longer considered in Regulation (EC) 152/2009 [24]. Moreover, in the case of banned substances, the application of MS detection is mandatory for confirmatory methods. To some extent, it can be argued that the approach of Regulation (EC) 152/2009 [24] represents a

backward step, as it fails to exploit the potential of MS as a detection technique for LC and GC.

In the USA, AOAC “Official Methods of Analysis” were defined as “official” by regulations promulgated for enforcement of the FFDCA (21 CFR 2.19), recognized in Title 9 of the USDA-FSIS Code of Federal Regulations, and in some cases by the US Environmental Protection Agency.

4. Sampling

The objective of sampling is to obtain a small portion that is representative of the whole material. A sampling procedure is a multistage process and involves sampling and sample preparation.

Sampling procedures represent the foremost critical point to obtain reliable analytical results. Although they are usually underestimated in feed analysis, they are accountable for the largest source of variation associated with the final analytical result [26]. The appropriate sampling procedure in feed processing depends on the feed ingredients and the dimensions of shipment containers, conveying equipment and sampling equipment. Some aspects of the sampling step are critical for reducing uncertainty:

- number and size of incremental samples selected from the commodity bulk lot;
- choice of the sampling points; and,
- techniques applied for sample collection.

Good sampling requires taking sufficient samples of adequate size, and failing to comply with either of these requirements is the most common error [27]. It is generally agreed that sampling from a moving stream of material (dynamic sampling) is better than sampling from the final bulk by means of probes (static sampling). Incremental sample aggregates in dynamic sampling are more representative than in static sampling. The number of samples to be taken depends on the accuracy desired. At an industrial level, Herrman and Behnke [28] suggested that 8–10 samples per batch would yield a satisfactory enough coefficient of variance. The suggested size of incremental samples is 100–200 g.

The second step of a sampling process is the sample-preparation phase: this requires a careful mix of incremental samples to obtain a homogeneous “aggregate” sample. A representative reduced part of the aggregate sample is obtained as a “laboratory” sample. Complete feed-sample reduction may be performed by partitioning into uniform sub-samples using a riffler.

Regulation (EC) 882/2004 [12] establishes that sampling must conform to the applicable community norm, or, if it does not exist, to internationally-recognized rules or national legislation. Annex I of Regulation (EC) 152/2009 [24] sets out the sampling system for official feed controls to guarantee that the sample is representative of

Table 3. Summary of analytical methods for monitoring of anti-infectious drugs in animal feeds in the past 10 years

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Detection system	Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean up		Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)		
AMINOGLYCOSIDES Kanamycin A	Pig Poultry	Technique: mechanical shaking Time: 1 h 15 min Solvent: 0.1 M HCl	Technique: SPE (cation exchange cartridges) Elution solvent: ammonia:MeOH (5:95)	LC-EL	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.01 M ammonium acetate Mobile phase B: ACN Elution: isocratic (50:50) Pre-column derivatization with α -phthalaldehyde (10 min)	98–160	LOD: 5 LOQ: 10	[29]	
AMPHENICOLS Florfenicol	Fish	Technique: sonication in a water bath (45–50°C) + mechanical shaking Time: 30 min Solvent: ACN:H ₂ O (50:50)	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: ACN:H ₂ O (50:50)	LC-UV	Column: C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 3.5 μm) at 30°C Mobile phase A: pH 4.4 buffer Mobile phase B: ACN Elution: isocratic (82:18)	100	LOD: 200 LOQ: 1000	[30]	
Chloramphenicol	Bull Calf Cow	Technique: vortex Time: 20 min Solvent: H ₂ O	Technique: LLE + SPE (C ₁₈ cartridges) Elution solvent: EtOAc + EtOAc:MeOH (80:20) None	LC-UV	Column: C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: pH 5 buffer Elution: isocratic (20:80)	92–98	LOD: 0.7	[31]	
Chloramphenicol (plus oxytetracycline and tetracycline)	Not specified	Technique: subcritical water extraction (100°C) Time: 5 min Solvent: H ₂ O (pH 2)	None	LC-UV	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: pH 2.5 buffer with 0.001 M Na ₂ EDTA Elution: isocratic (25:75)	82–90	Not reported	[32]	
AVERMECTINS Emamectin Benzoate	Fish	Technique: mechanical shaking + sonication Time: 2 h 30 min Solvent: MeOH	Technique: SPE (C ₁₈ cartridges) Elution solvent: ammonium hydroxide:EtOH (2:98)	LC-UV	Column: C ₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) at 50°C Mobile phase A: 0.085% phosphoric acid:ACN (60:40) Mobile phase B: 0.085% phosphoric acid:ACN (90:10) Mobile phase C: THF:ACN (50:50) Elution: gradient	89–97	LOQ: 500	[33]	
β -LACTAMS Penicillin G	Not specified	Technique: mechanical shaking Time: 30 min Solvent: MeOH	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: MeOH	LC-UV	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) at 25°C Mobile phase A: H ₂ O Mobile phase B: 0.1% TFA in ACN with 0.05% triethylamine Elution: gradient	89–96	LOD: 3.89 LOQ: 13.0	[34]	

(continued on next page)

Table 3. (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Detection system	Analytical technique		Ref.	
		Extraction procedure	Clean up		Separative conditions	Recovery (%)		Limits (ng/g)
Amoxicillin	Pig	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 30 min <i>Solvent:</i> pH 4.5 buffer	Dilution	LC-MS/MS	<i>Column:</i> PLRP-S polymeric (150 × 2.1 mm, 3 μm) <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid <i>Mobile phase B:</i> ACN <i>Elution:</i> gradient Matrix-matched calibration <i>Internal standard:</i> ampicillin <i>Column:</i> C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm) at 35°C <i>Mobile phase A:</i> 0.01% TFA <i>Mobile phase B:</i> 0.01% TFA in ACN <i>Elution:</i> gradient Matrix-matched calibration	90	<i>LOD:</i> 1030 <i>LOQ:</i> 3400	[35]
Amoxicillin Penicillin V	Swine	<i>Technique:</i> PLE (50°C, 1500 psi) <i>Time:</i> 13 min <i>Solvent:</i> ACN:H ₂ O (25:75) <i>Solvent:</i> ACN:H ₂ O (50:50)	None	LC-UV	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm) at 40°C <i>Mobile phase A:</i> 0.2% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.2% formic acid in ACN:H ₂ O (9:1) <i>Elution:</i> gradient Derivatization to piperidine derivatives (penicillin-4 α -piperidine derivatives) Multi-level standard addition/isotope dilution <i>Internal standards:</i> penicillin-d ₁₀ -piperidine derivatives <i>Column:</i> C ₁₂ <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid in MeOH <i>Elution:</i> gradient <i>Internal standard:</i> penicillin V-d ₅ <i>Surrogate standards:</i> amoxicillin-d ₄ and penicillin G-d ₇	80–86 93–95	<i>LOD:</i> 7300 <i>LOD:</i> 3400	[36]
Amoxicillin Ampicillin Cloxacillin Dicloxacillin Nafticillin Oxacillin Penicillin G Penicillin V	Bovine Ovine Porcine Poultry	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 15 min <i>Solvent:</i> pH 8 buffer	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges) <i>Elution solvent:</i> MeOH:H ₂ O (80:20)	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 × 3 mm, 5 μm) at 40°C <i>Mobile phase A:</i> 0.2% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.2% formic acid in ACN:H ₂ O (9:1) <i>Elution:</i> gradient Derivatization to piperidine derivatives (penicillin-4 α -piperidine derivatives) Multi-level standard addition/isotope dilution <i>Internal standards:</i> penicillin-d ₁₀ -piperidine derivatives <i>Column:</i> C ₁₂ <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid in MeOH <i>Elution:</i> gradient <i>Internal standard:</i> penicillin V-d ₅ <i>Surrogate standards:</i> amoxicillin-d ₄ and penicillin G-d ₇	88–116	<i>CCα:</i> 120–970 <i>CCβ:</i> 130–1430	[37]
Amoxicillin Ampicillin Cefalexin Cefazolin Cefoperazone Ceftriaxone Cloxacillin Dicloxacillin Oxacillin Penicillin G Penicillin V (plus sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfadimidine, sulfamethoxypyridazine, sulfapyridine, sultaquinoxaline and sulfathiazole)	Bovine	<i>Technique:</i> PLE (55°C, 1500 psi) <i>Time:</i> 30 min <i>Solvent:</i> H ₂ O	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges) <i>Elution solvent:</i> MeOH	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₂ <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid in MeOH <i>Elution:</i> gradient <i>Internal standard:</i> penicillin V-d ₅ <i>Surrogate standards:</i> amoxicillin-d ₄ and penicillin G-d ₇	71–115	<i>LOD:</i> 0.12–3.94 <i>LOQ:</i> 0.25–10.51	[38]

Amoxicillin Ampicillin Cefalexin Cefazolin Cefoperazone Ceftiofur Cloxacillin Dicloxacillin Oxacillin Penicillin G Penicillin V (plus sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfadimidine, sulfamethoxypryridazine, sulfapyridine, sulfaquinosaline and sulfathiazole)	Bovine	Technique: PLE (55°C, 1500 psi) Time: 20 min Solvent: H ₂ O:MeOH (95:5)	Technique: online SPE (C ₁₈ cartridges) Elution solvent: mobile phase	LC-MS/MS	Column: C ₁₂ (50 mm × 2 mm, 4 μm) Mobile phase A: 0.1% formic acid Mobile phase B: 0.1% formic acid in MeOH Elution: gradient Internal standard: penicillin V-d5 Surrogate standards: amoxicillin-d4 and penicillin G-d7	93–134	LOD: 0.09–2.12 LOQ: 0.25–5.64 CCx: 10–171 CCβ: 22–184	[39]
IONOPHORES Lasalocid Monensin Narasin Salinomycin (plus amprolium and ethopabate)	Cattle Chicken Swine Turkey	Technique: sonication + shaking Time: 5 min Solvent: MeOH:acetone:THF (50:30:20) + MeOH:H ₂ O (97:3)	Dilution	LC-MS	Column: C ₁₈ (55 × 4 mm, 3 μm) Mobile phase A: MeOH Mobile phase B: 0.1% formic acid Elution: isocratic (88:12)	91–99	LOD: 2000–2500 LOQ: 4000–5000	[40]
Lasalocid	Calif Cattle Horse Lamb Turkey	Technique: sonication (40°C) + mechanical shaking Time: 1 h 30 min Solvent: 0.5% HCl in MeOH	Dilution	LC-FL	Column: C ₁₈ (250 mm, 5 μm) Mobile phase A: pH 4.75 buffer Mobile phase B: ACN Elution: isocratic (15:85)	83–118	LOQ < 1000	[41]
Lasalocid Maduramicin Monensin Narasin Salinomycin Semduramicin	Cattle Poultry	Technique: mechanical shaking Time: 1 h Solvent: MeOH:H ₂ O (90:10)	Technique: SPE (silica cartridges) Elution solvent: MeOH	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.1% formic acid in MeOH Mobile phase B: 0.1% formic acid Elution: isocratic (94:6) Matrix-matched calibration Internal standard: nigericin	86–130	LOD: 1–14 LOQ: 4–46	[42]

Trends

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 7, 2011

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Detection system	Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean up		Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)		
<i>OTHER COCCIDIOSTATS</i>									
Meticlorpindol	Broiler Fowl	Technique: mechanical shaking Time: 1 h Solvent: H ₂ O:DMF (5:95)	Technique: SPE (basic alumina column) Elution solvent: not reported Dilution	LC-LUV	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: pH 4.6 buffer Elution: gradient	91–102	LOD: 1000–2500 LOQ: 2000–5000	[43]	
Nicarbazin	Laying hen Turkey								
Amprolium	Cattle Chicken Swine Turkey	Technique: sonication + shaking Time: 5 min Solvent: MeOH:acetone:THF (50:30:20) + MeOH:H ₂ O (97:3)		LC-MS	Column: cyanopropyl phase (150 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.01 M ammonium acetate Mobile phase B: ACN Elution: isocratic (50:50) Column: alkylamide phase (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.01 M ammonium acetate Mobile phase B: ACN Elution: isocratic (65:35)	96–98	LOD: 2000 LOQ: 4000	[40]	
Ethopabate (plus lasalocid, monensin, narasin and salinomycin)				LC-MS	Mobile phase A: 0.01 M ammonium acetate Mobile phase B: ACN Elution: isocratic (50:50)	87–92	LOD: 1500 LOQ: 3000		
Olquinox (plus spiramycin, tylosin, virginiamycin and zinc bacitracin)	Pig Cattle	Technique: mechanical shaking Time: 30 min Solvent: 2% formic acid in MeOH:H ₂ O (70:30)	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: ACN:H ₂ O (50:50)	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (150 × 3.2 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.3% formic acid in ACN Mobile phase B: 0.3% formic acid Elution: gradient	54–94	CCz: 210–310 CCf: 330–620	[44]	
Robemidone	Chicken Chinchilla Rabbit	Technique: PLE Time: 3 min Solvent: 1% acetic acid in MeOH	Technique: alumina column Elution solvent: MeOH	LC-LUV LC-MS	Column: C ₁₈ (125 × 3.0 mm, 3 μm) at 10°C Mobile phase A: MeOH Mobile phase B: 0.1% trifluoroacetic acid Elution: isocratic (70:30) Column: C ₁₈ (150 × 3.9 mm, 4 μm) Mobile phase A: MeOH Mobile phase B: ACN Mobile phase C: 0.2% phosphoric acid Elution: isocratic (34:35:40)	85–91	LOQ: 100 LOQ: 20	[45]	
Methyl benzoate	Not specified	Technique: water bath at 45°C Time: not reported Solvent: DCM	Technique: SPE (silica cartridges) Elution solvent: MeOH:H ₂ O (70:30)	LC-FL		105	LOQ: 48	[46]	

1052

<http://www.elsevier.com/locate/trac>

Carbadox Olaquinox	Pig	Technique: mechanical shaking Time: 1 h Solvent: ACN:chloroform (50:50)	None	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: 0.1% formic acid Elution: isocratic (17.5:82.5) Matrix-matched calibration	70–99	LOD: 0.5 CCz: 200–300 CCfj: 300–500	[47]
Olaquinox (plus spiramycin, tylosin, virginiamycin and zinc bacitracin)	Calf Cattle Laying hen Pig Piglet Poultry Sheep Poultry	Technique: sonication + mechanical shaking Time: 30 min Solvent: MeOH:H ₂ O (70:30)	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: MeOH	ELISA		91–102	LOD: 102 CCfj: 150	[48]
Diclozauril Dimetridazole Halofuginone Nicarbazin Robenidme	Poultry	Technique: mechanical shaking Time: 30 min Solvent: MeOH	None	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (150 × 2.1 mm, 5 μm) at 35°C Mobile phase A: 0.1% formic acid in H ₂ O:ACN (95:5) Mobile phase B: ACN Elution: gradient Internal standard: dimetridazole-d ₃ and diclazauril-bis	95–105	CCz: 1600–10700 CCfj: 2200–14500	[49]
Dimetridazole Secnidazole Iprnidazole Metronidazole Ronidazole Timidazole Decoquinat	Poultry	Technique: mechanical shaking + vortex Time: 20 min Solvent: pH 2 buffer	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: ACN	LC-MS	Column: C ₁₈ (150 × 2.1 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: pH 4.3 buffer Elution: gradient	72–87	Not reported	[50]
Carbadox Olaquinox	Calf Chicken Lamb Swine	Technique: mechanical shaking Time: 90 min Solvent: 1% calcium chloride in MeOH	Dilution	LC-FL	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.05 M calcium chloride in MeOH Mobile phase B: H ₂ O Elution: isocratic (82.5:17.5)	98–103	LOQ: 500	[51]
Carbadox Olaquinox	Broiler Pig	Technique: MSPD (C ₁₈ sorbent) Solvent: ACN:MeOH (80:20)		UPLC-LUV	Column: HILIC (100 × 2.1 mm, 1.7 μm) at 30°C Mobile phase A: 0.01 M ammonium acetate in ACN Mobile phase B: 0.01 M ammonium acetate Elution: isocratic (95:5)	83–98	LOD: 20–30 LOQ: 70–100	[52]
Amprolium Carbadox Dimetridazole Ethopabate Furazolidone Mefticlorpindol Olaquinox Robenidme Ronidazole	Not specified	Technique: sonication Time: 5 min Solvent: 0.02 M NaOH in MeOH:ACN (50:50)	Dilution	UPLC-TOF-MS UPLC- Orbitrap-MS	Column: C ₁₈ (100 × 2.1 mm, 1.7 μm) Mobile phase A: 0.01 M ammonium formate Mobile phase B: 0.01 M ammonium formate:MeOH (10:90) Elution: gradient	Not reported	Not reported	[53]

Trends

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 7, 2011

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment			Detection system	Analytical technique		Ref.
		Extraction procedure	Clean up	Separative conditions		Recovery (%)	Limits (ng/g)	
MACROLIDES								
Spiramycin	Pig	Technique: mechanical shaking Time: 30 min	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: ACN:H ₂ O (50:50)	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (150 × 3.2 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.3% formic acid in ACN Elution: gradient	62–98	CCx: 180–420 CCj: 300–780	[44]
Tylosin (plus olaquinoxid, virginiamycin and zinc bacitracin)	Cattle	Solvent: 2% formic acid in MeOH:H ₂ O (70:30)						
Spiramycin	Cattle	Technique: mechanical shaking Time: 1 h	Technique: SPE (cyano propyl cartridges) + alumina column Elution solvent: MeOH:diethylamide (99:1)	LC-UV	Column: C ₁₈ (250 × 4 mm) Mobile phase A: pH 2.5 buffer:ACN (80:20) Mobile phase B: ACN Elution: gradient	59–99	CCx: 118–176 CCj: 352–395	[54]
Tylosin	Poultry	Solvent: MeOH						
Spiramycin	Calf	Technique: sonication + mechanical shaking Time: 30 min	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: MeOH	ELISA		95–115	LOD: 280 CCj: 600	[48]
Tylosin (plus olaquinoxid, virginiamycin and zinc bacitracin)	Laying hen							
Piglet	Pig	Solvent: MeOH:H ₂ O (70:30)						
Poultry	Poultry							
Sheep	Sheep							
Tilmicosin	Cattle	Technique: vortex + mechanical shaking Time: 12 min	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: acetone:DCM (60:40)	CE	Capillary: fused silica (64.5 cm × 75 μm; 30 kV) Electrolyte: 0.02 M citric acid + pH 2.65 buffer Internal standard: thiabendazole	70–99	LOD: 500–1000 LOQ: 1000–2000	[55]
Tylosin (plus doxycycline, oxytetracycline and tetracycline)	Fowl	Solvent: pH 4 McIlvaine buffer + 5% MeOH:pH 4 McIlvaine buffer (40:60)						
Swine	Swine							
POLYMYXINS								
Colistin	Not specified	Technique: sonication + mechanical shaking Time: 2 h 15 min Solvent: 0.1 M HCl	Technique: dilution + SPE (C ₁₈ cartridges) Elution solvent: MeOH	LC-FL	Column: C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: H ₂ O Elution: isocratic (75:25) Matrix-matched calibration Pre-column derivatization with ortho-phthalaldehyde and 2-mercaptoethanol (3 min)	94	LOD: 5000 LOQ: 10000	[56]

Table 3. (continued)

Colistin	Not specified	Technique: dynamic ultrasound-assisted extraction Time: 7 min Solvent: H ₂ O	None	LC-FL	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: H ₂ O Elution: isocratic (75:25) On-line pre-column derivatization with ortho-phthalaldehyde and 2-mercaptoethanol	93–98	LOD: 2460 LOQ: 2520	[57]
POLYPEPTIDES Zinc bacitracin	Chicken	Technique: shaking Time: 5 min Solvent: 0.3% HCl in MeOH	Technique: SPE (polymERIC cartridges) Elution solvent: MeOH	LC-MS	Column: alkylamide phase (50 × 4.6 mm, 5 μm) Mobile phase A: MeOH Mobile phase B: 0.01 M ammonium acetate Elution: gradient	71–72	LOQ: 4000	[58]
Virginiamycin	Calif Cattle Laying hen Piglet Poultry	Technique: sonication Time: 30 min Solvent: H ₂ O:EtOAc(20:80)	Technique: tandem SPE (silica gel + polymeric cartridges) Elution solvent: pH 4 buffer:MeOH (75:25) + EtOAc	LC-UV	Column: C ₁₈ (200 × 3.0 mm, 5 μm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: 0.3% formic acid Elution: isocratic (35:65)	31–71	LOQ: 1420	[59]
Zinc bacitracin	Cattle Poultry Sheep	Technique: mechanical shaking Time: 20 min Solvent: pH 2 buffer	Technique: LLE + SPE (C ₁₈ cartridges) Extraction solvent: EtOAc Elution solvent: MeOH	LC-UV	Column: C ₁₈ (200 × 2.1 mm, 5 μm) Mobile phase A: pH 3 buffer with 0.02 M sodium dodecyl sulfate Mobile phase B: ACN:MeOH (95:5) Elution: isocratic (50:50)	66–85	Not reported	[60]
Zinc bacitracin	Cattle Poultry Sheep	Technique: mechanical shaking Time: 20 min Solvent: pH 2 buffer:ACN (75:25)	Technique: LLE + SPE (C ₁₈ cartridges) Extraction solvent: EtOAc Elution solvent: MeOH	LC-FL	Column: C ₁₈ (200 × 2.1 mm, 5 μm) at 45°C Mobile phase A: pH 3 buffer with 0.02 M sodium dodecyl sulfate Mobile phase B: ACN:MeOH (95:5) Elution: isocratic (50:50) Post-column derivatization with o-phthalaldehyde	43–56	LOQ < 5000	[61]
Virginiamycin Zinc bacitracin (plus spiramycin, tylosin, and olaquindox)	Pig Cattle	Technique: mechanical shaking Time: 30 min Solvent: 2% formic acid in MeOH:H ₂ O (70:30)	Technique: SPE (polymERIC cartridges) Elution solvent: ACN:H ₂ O (50:50)	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (150 × 3.2 mm, 5 μm) Mobile phase A: 0.3% formic acid in ACN Mobile phase B: 0.3% formic acid Elution: gradient	59–109	CCx: 180–450 CCj: 450–930	[44]
Virginiamycin Zinc bacitracin (plus spiramycin, tylosin, and olaquindox)	Calif Cattle Laying hen Piglet Poultry Sheep	Technique: sonication + mechanical shaking Time: 30 min Solvent: MeOH:H ₂ O (70:30)	Technique: SPE (polymERIC cartridges) Elution solvent: MeOH	ELISA		84–145	LOD: 90–280 CCj: 200–300	[48]

(continued on next page)

Table 3. (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Detection system	Analytical technique		Ref.
		Extraction procedure	Clean up		Separative conditions	Method performance	
QUINOLONES							
Flumequine Oxolinic acid	Fish	<i>Technique:</i> homogenization <i>Time:</i> not specified <i>Solvent:</i> pH 3 buffer	<i>Technique:</i> SPE (C ₁₈ cartridges) <i>Elution solvent:</i> pH 3 buffer:MeOH (10:90)	LC-UV	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 × 4.6 mm, 5 μm) <i>Mobile phase A:</i> MeOH <i>Mobile phase B:</i> pH 3 buffer <i>Elution:</i> isocratic (45:55) <i>Capillary:</i> fused silica (60 cm, 75 μm; 20 kV) at 25°C <i>Electrolyte:</i> pH 9 buffer:MeOH (9:1) <i>Internal standard:</i> nalidixic acid	92–111 LOD: 12–37 LOQ: 200–300	[62]
Oxolinic acid	Fish	<i>Technique:</i> sonication <i>Time:</i> 10 min <i>Solvent:</i> pH 7 buffer	<i>Technique:</i> SPE (C ₁₈ cartridges) <i>Elution solvent:</i> pH 9 buffer: MeOH (90:10)	CE-UV	<i>Column:</i> C ₅ (150 × 4.6 mm, 5 μm) at 30°C <i>Mobile phase A:</i> pH 2.6 buffer:THF: ACN (49:1:50) <i>Mobile phase B:</i> pH 2.6 buffer:THF: ACN (89:1:10) <i>Elution:</i> gradient	78–88 Not reported	[63]
Cinoxacin Ciprofloxacin Danofloxacin Difloxacin Enoxacin Enrofloxacin Flumequine Nalidixic acid Norfloxacin Ofloxacin Oxolinic acid Pipemidic acid Rufloxacin	Calf Fish Pig Swine	<i>Technique:</i> PLE <i>Time:</i> not specified <i>Solvent:</i> pH 2.6 buffer:ACN (70:30)	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges) <i>Elution solvent:</i> MeOH	LC-UV LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (250 × 3 mm, 5 μm) at 30°C <i>Mobile phase A:</i> ACN <i>Mobile phase B:</i> pH 3 buffer <i>Elution:</i> gradient <i>Internal standard:</i> lomefloxacin	31–103 LOD: 400–1500 LOQ: 5000	[64]
Cinoxacin Ciprofloxacin Danofloxacin Difloxacin Enrofloxacin Flumequine Marbofloxacin Nalidixic acid Norfloxacin Saraloxacin	Cattle Fish Pig Poultry Rabbit	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 30 min <i>Solvent:</i> 0.2% phosphoric acid: ACN (70:30)	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges) <i>Elution solvent:</i> MeOH:ammonia (95:5)	LC-UV LC-FL		69–98 LOD: 40–800 LOQ: 100–2400	[65]

Difloxacin Flumequine Marbofloxacin Oxolinic acid	Not specified	Technique: mechanical shaking Time: 20 min Solvent: 0.6% phosphoric acid:MeOH (60:40)	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: MeOH:ammonia (95:5)	ELISA	Not reported	CC _β < 1000	[66]
SULFONAMIDES Sulfadimidine	Cattle Swine	Technique: mechanical shaking Time: 1 h Solvent: 0.2 M HCl; 1.5% diethylamine in MeOH (75:25)	Dilution	LC-UV	100	Not reported	[67]
Sulfachloropyridazine	Pig	Technique: heating (70°C) + mechanical shaking Time: 30 min Solvent: 2% acetic acid in MeOH:H ₂ O (75:25)	Dilution	ELISA	Not reported	Not reported	[68]
Sulfadiazine Sulfadimidine	Pig	Technique: MAE (110°C) Time: 20 min Solvent: ACN	Dilution	LC-UV	89–104	LOD: 350–730 LOQ: 1350–3160	[69]
Sulfadiazine Sulfadimethoxine Sulfadimidine Sulfamethoxy-pyridazine Sulfapyridine Sulfamethoxazole (plus amoxicillin, ampicillin, cefalexin, cefazolin, cefoperazone, ceftiofur, cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, penicillin G and penicillin V)	Bovine	Technique: PLE (55°C, 1500 psi) Time: 30 min Solvent: H ₂ O	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: MeOH	LC-MS/MS	90–113	LOD: 0.11–1.09 LOQ: 0.31–2.92	[38]

(continued on next page)

Trends

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 7, 2011

Table 3. (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Detection system	Analytical technique	Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean up			Recovery (%)	Limits (ng/g)	
Sulfadiazine Sulfadimethoxine Sulfadimidine Sulfamethoxypyridazine Sulfapyridine Sulfaminoxaline Sulfathiazole (plus amoxicillin, ampicillin, cefalexin, cefazolin, cefoperazone, ceftriaxol, cloxacillin, dicloxacillin, oxacillin, penicillin G and penicillin V)	Bovine	Technique: PLE (55°C, 1500 psi) Time: 20 min Solvent: H ₂ O:MeOH (95:5)	Technique: online SPE (C ₁₈ cartridges) Elution solvent: mobile phase	LC-MS/MS	Column: C ₁₂ (50 mm × 2 mm, 4 µm) Mobile phase A: 0.1% formic acid Mobile phase B: 0.1% formic acid in MeOH Elution: gradient Internal standard: sulfathiazole-d4	93–134	LOD: 0.10–2.17 LOQ: 0.26–5.79 CC _α : 12–174 CC _β : 16–185	[39]
Sulfachloropyridazine Sulfadiazine Sulfadimidine Sulfamerazine Sulfamethoxypyridazine Sulfapyridine Sulfathiazole TETRACYCLINES Chlortetracycline Doxycycline Minocycline Oxytetracycline	Calf Chicken Hen Pig Piglet Rabbit Sheep Cattle Pigs	Technique: shaking Time: 1 min Solvent: ACN:H ₂ O (95:5)	Dilution	ELISA		80–100	LOD: 40–200 CC _β : 100–800	[70]
Oxytetracycline Tetracycline (plus chloramphenicol)	Not specified	Technique: sonication Time: 10 min Solvent: pH 3 buffer: ACN (50:50)	None	LC-UV	Column: C ₁₈ (100 × 4.6 mm, 5 µm) at 22°C Mobile phase: pH 3 buffer with 0.05 M sodium dodecyl sulfate and 5% 1-butanol Elution: isocratic	79–95	Not reported	[71]
Doxycycline Oxytetracycline Tetracycline (plus tilimicosin and tylosin)	Cattle Fowl Swine	Technique: subcritical water extraction (100°C) Time: 5 min Solvent: H ₂ O (pH 2)	None	LC-UV	Column: C ₁₈ (250 × 4.6 mm, 5 µm) Mobile phase A: ACN Mobile phase B: pH 2.5 buffer with 0.001 M Na-EDTA Elution: isocratic (25:75) Capillary: fused silica (64.5 cm × 75 µm; 30 kV) Electrolyte: 0.02 M citric acid + pH 2.65 buffer Internal standard: thiabendazole	83–89	Not reported	[32]
		Technique: vortex + mechanical shaking Time: 12 min Solvent: pH 4 McIlvaine buffer + 5% MeOH:pH 4 McIlvaine buffer (40:60)	Technique: SPE (polymeric cartridges) Elution solvent: acetone:DCM (60:40)	CE		81–99	LOD: 1000 LOQ: 2000	[55]

1058

http://www.elsevier.com/locate/trac

MULTI-CLASS Carbadox Chloramphenicol Clopidol Dimetridazole Dinitolimide Ethopabate Iprondazole Metronidazole Ronidazole Sulfadimidine	Pig Poultry	Technique: vortex + mechanical shaking Time: 30 min Solvent: ACN + anhydrous sodium sulfate	Technique: LLE Extraction solvent: hexane	LC-MS/MS	Column: C ₁₈ (100 × 2 mm, 3 μm) at 40°C Mobile phase A: 0.2% acetic acid Mobile phase B: 0.2% acetic acid in ACN Elution: gradient Matrix-matched calibration Internal standards: sulfaphenazole, ipronidazole- <i>d3</i> , dimetridazole- <i>d3</i> , ronidazole- <i>d3</i> and chloramphenicol- <i>d5</i>	89–103	Not reported	[72]
Flavophospholipol Lasalocid Maduramycin Monensin Narasin Robenidine Salinomycin Spiramycin Tilmococin Tylosin Amoxicillin Penicillin G Penicillin V Chloramphenicol Florfenicol Bacitracin Nalidixic acid Oxolinic acid Ciprofloxacin Danofloxacin Enrofloxacin Flumequine Marbofloxacin Carbadox Olaquinox Virginiamycin Sulfadiazine Doxycycline Oxytetracycline Tetracycline	Bovine Lamb Piglet	Technique: shaking + sonication Time: 15 min Solvent: MeOH:ACN:pH 4.6 McIlvaine buffer (37.5:37.5:25) with 0.3% of 0.5 M Na ₂ EDTA	Technique: dispersive SPE (PSA sorbent)	LC-MS/MS ESI (+) ESI (-)	Column: C ₁₈ (150 × 2.1 mm, 3.5 μm) at 40°C Elution: gradient Mobile phase A: 0.1% formic acid ACN:MeOH (70:30) Mobile phase B: 0.005 M ammonium acetate Mobile phase B: ACN:MeOH (70:30) Standard addition calibration Internal standards: sulfadiazine- <i>d4</i> , ¹³ C ₃ -flumequine and chloramphenicol- <i>d5</i>	51–116	LOQ: 3.8–65.0	[73]

MAE, Microwave-assisted extraction; MSPD, Matrix solid-phase dispersion; SPE, Solid-phase extraction; LLE, Liquid-liquid extraction; PLE, Pressurized liquid extraction; EC, Electrochemical

the whole material; it requires a minimum of three initial samples to be taken and stored in properly identified, sealed containers, and one of these samples has to be sent to the authorized laboratory. Quantitative requirements for incremental and aggregate samples are also established, depending on whether or not the distribution of the substances to be determined in the feed is uniform. Specifically, the minimum number of incremental samples in relation to the feed state (loose, packaged or liquid/semi-liquid) is given and a total amount of incremental samples making up the aggregate not less than 4 kg is recommended. Eventually, according to this regulation, the final sample weight, after aggregate sample reduction, should be not less than 500 g.

5. Analysis

Two scenarios must be considered for controlling antimicrobial agents in feedingstuffs:

- the analysis of authorized medicated feeds, containing concentrations of the active components in the range of mg/kg; and,
- either illegal use of antimicrobials or unintentional contamination, where concentrations are at the low mg/kg or $\mu\text{g}/\text{kg}$ level. Sensitivity is not a problem for the analysis of antimicrobials in an authorized medicated feed, but the detection of unauthorized use of pharmaceuticals requires highly sensitive, selective methods.

Table 3 [29–73] presents a selection of analytical methods reported over the past 10 years for the analysis of antimicrobials in feed. The compounds have been classified according to their chemical families, when possible (e.g., tetracyclines and ionophores), but, in some cases, the therapeutic application has been the criterion (e.g., other coccidiostats). Most methods are designed to analyze several pharmaceuticals belonging to the same family of compounds, and methods covering several families of antimicrobials are still rare [72,73].

Simple screening methods are highly advantageous for laboratories managing a large number of samples. In this sense, immunochemical methods are a possible approach, and ELISA tests [48,66,68,70], which can provide semi-quantitative data, are particularly attractive. However, their application to feed analysis is still rather limited.

For the quantitative analysis of antimicrobials in feed, LC with UV, FL or MS detection is the preferred option. Confirmation methods are exclusively based on LC-MS, which allows more definitive identification of the compounds, in addition to quantitative analysis, even at very low concentration levels. The analysis of antimicrobials in feed samples involves three main steps:

- extraction of the analyte(s) from the feed sample;
- clean up of the extract (not always required); and,
- determination.

Extraction is usually performed with hydroorganic mixtures, mostly based on methanol or acetonitrile. Solvents immiscible with water are rarely proposed. Mechanical shaking, sometimes combined with sonication, is a quite common extraction technique [30,33,41,48,56]. Reported recoveries are satisfactory, usually above 80%, but the procedures may require a lot of sample handling, because several extraction steps are generally involved. More exhaustive techniques [e.g., pressurized liquid extraction (PLE)] are seldom used in this field [36,38,39,45,64], but seem a good approach to increase extraction recoveries and reduce extraction time and solvent consumption.

Feed matrices are very complex and highly variable, which makes cleaning up the extracts almost mandatory to obtain reliable results, except in cases where the method sensitivity is high enough to offer the option of simply diluting the extracts. The most common approach for clean up is based on solid-phase extraction (SPE); C_{18} [31,33,39,56,62,63] and polymeric [30,34,37,38,44,48,50,55,58,64–66] cartridges are used in most cases, but silica [42,46] or alumina [43,45] sorbents are also proposed. Mixed-mode cation exchange cartridges may be a good approach for highly polar analytes (e.g., aminoglycosides) [29]. Sometimes, a multi-step clean up scheme is applied by combining either two SPE with different interaction mechanisms [54,59] or SPE with liquid-liquid extraction [60,61].

As shown in Table 3, LC and, more recently, ultra-performance LC (UPLC) are the techniques of choice for the determination of antimicrobials in the extracts. There are only very few exceptions, and those based on ELISA look promising for semi-quantitative purposes. Both UV and MS are widely applied as detection systems coupled to LC, and fluorimetry can also be advantageous for fluorescent compounds. UV and fluorimetric detectors are quite simple, robust and well suited for routine control of medicated feeds. Such techniques are not very sensitive to matrix effects, but dilution or clean up of the extracts is still necessary to avoid damage to the chromatographic column and to obtain good chromatograms. Fluorimetry provides better sensitivity and selectivity than UV, but it can only be applied to analytes that are fluorescent (e.g., quinolones or lasalocid [41,64,65]) or become so after derivatization, either pre-column [29,56,57,69] or post-column [61,67].

MS detection provides higher sensitivity and selectivity, and is especially well suited for confirmation methods, in particular in tandem MS (MS^2) modes. However, matrix effects can be a major problem in MS detection when complex extracts (e.g., of feed samples) are analyzed, especially for quantitative analysis, as ion suppression or enhancement can take place. Furthermore, because of the high variability in matrix composition between different feed samples, the behavior of a

Table 4. Performance parameters to be determined under existing legislation

Performance parameters	Regulation (EC) 882/2004 (Annex III)	Decision 2002/657/EC (Tables 9 and 10)			
		Qualitative methods		Quantitative methods	
		S	C	S	C
Accuracy	×				
Applicability/ruggedness/stability	×	×	×	×	×
Limit of detection	×				
Limit of determination	×				
Decision limit ($CC\alpha$)			×		×
Detection capability ($CC\beta$)		×	×	×	×
Precision	×			×	×
Repeatability	×			×	×
Reproducibility	×			×	×
Recovery/trueness	×				×
Selectivity/specificity	×	×	×	×	×
Sensitivity	×				
Linearity/calibration curves	×			×	×
Measurement uncertainty	×				

S, Screening methods; C, Confirmatory methods.

particular analyte may change from sample to sample. Dilution of the extracts, if sensitivity is not endangered, is the simplest option to overcome this problem. If dilution is not a good solution, the use of isotopically-labeled standards seems an excellent alternative to avoid any quantification bias due to matrix effects, but their commercial availability, as well as their price, can be a serious drawback. Other possible strategies are a really effective clean up or a standard-addition method of calibration.

The complex nature of animal-feed matrices and their possible influence on the analytical results make the use of matrix-matched standards highly desirable. However, obtaining blank feeds having the same composition as the samples is difficult at best, if not impossible. For this reason, many published methods summarized in Table 3 use calibration curves obtained from standards prepared in pure or mixed solvents (usually reported as external calibration); this approach is far from ideal. Internal standard calibration or, more rarely, standard addition is also performed to correct for matrix effects.

Finally, new analytical strategies emerge because of advances in MS instrumentation. The new generation of high-resolution MS equipment permits detection and identification of a priori non-target analytes [53]; this method is highly advantageous for controlling the illegal use of antimicrobials.

6. Method validation

For the small number of substances considered in Regulation (EC) 152/2009 [24], the analytical methods are fully described and their validation is to verify that the

laboratory can apply them correctly and obtain stipulated accuracy and recovery.

For substances not considered in Regulation (EC) 152/2009 [24], Commission Decision 2002/657/EC [25] determines the requirements for separation and detection techniques and validation of the analytical methods used for the analysis of food, and often these are also applied to the analysis of feeds. These requirements are well established among the laboratories that analyze residues and contaminants in food and, in our opinion, the methods applied to the analysis of contaminants in feed should operate under the same requirements.

According to Commission Decision 2002/657/EC, the analytical parameters to be evaluated, shown in Table 4, depend on the purpose of the method. Validation of a qualitative screening method requires assessment of just detection capability ($CC\beta$), selectivity and applicability, whereas validation of a quantitative confirmatory method also requires assessment of decision limit ($CC\alpha$), recovery and precision.

$CC\alpha$ is the limit at and above which a sample is considered to be non-compliant, with an error probability of α (5%), and is a crucial limit for confirmatory methods. $CC\beta$ is the smallest amount of the substance that can be detected and/or quantified in a sample with an error probability of β (1% for banned substances, 5% for veterinary drugs and contaminants). For authorized substances, $CC\alpha$ is calculated from data obtained from the analysis of blank samples spiked at the MRL (concentration and standard deviation).

$CC\beta$ is then calculated from $CC\alpha$ and the standard deviation at this concentration level. For substances with no established MRL, the so-called zero-tolerance levels should be applied, which leads to some ambiguity from a

practical viewpoint. The use of different methodological approaches to obtain $CC\alpha$ and $CC\beta$ may result in different values.

Recovery is the mass of analyte in the sample that is present in the final extract. Recoveries are measures of the efficiency of sample treatment. In quantitative residue analysis, they must be used to correct the results, except in cases where the calibration method provides recovery-corrected data. The best approach to determine recoveries is the analysis of a Certified Reference Material (CRM), but the lack of a suitable CRM makes the use of spiked samples necessary; in these cases, the assumption is made that added and incurred analytes behave in the same way. It must be mentioned that "recovery" is often improperly or wrongly used with a different meaning, and, to avoid possible confusions, some authors use the terms "absolute recovery" or "extraction recovery" instead of "recovery".

Trueness and precision, the two components of accuracy, are important parameters for quantitative methods. Decision 2002/657/EC [25] sets requirements about the minimum precision and trueness to be fulfilled by quantitative methods. However, the criterion for precision based on the Horwitz equation is rather permissive. Trueness should be established by means of a CRM, but, if no CRMs are available (as is the case for animal feeds), it can be assessed from the recovery of spiked blank matrices. In both cases, data corrected with the mean recovery must fall within the established ranges. Trueness is often used in the literature to indicate the agreement between the true value and the mean result, but some authors use recovery or corrected recovery instead of trueness. Specificity is an important parameter for confirmatory methods. Two different approaches are necessary to check for specificity:

- representative blank samples are analyzed to detect any signal from endogenous substances and matrix constituents; and,
- the effect of other constituents likely to be present in the matrices of interest is checked.

Since the number of substances that can be tested is quite limited, usually only those closely related to the analytes (e.g., metabolites) are checked. Specificity is highly dependent on the measuring technique: the risk of interferences in methods based on LC-MS² is rather low, but other measuring techniques (e.g., immunoassays) require detailed study.

More recently, Regulation (EC) 882/2004 [12] stated in its Annex III the parameters necessary for method characterization. The most important differences, as shown in Table 4, are the omission of $CC\alpha$ and $CC\beta$. However, there is no contradiction with Decision 2002/657/EC [25], because the possibility of using other criteria, as required, is offered, and the term "characterization" is used instead of "validation".

Proficiency tests (PTs), which allow external control of the results reported by analytical laboratories, are hardly available in the field of feed analysis. As far as we know, only the AAFCO [23] regularly provides PTs for some veterinary drugs (e.g., erythromycin, chlortetracycline, sulfadimidine, monensin, carbadox, and decoquinatone) in many kinds of feed matrix. More recently, Progetto Trieste [74] and Ducares [75] included feed samples containing some sulfonamides, quinolones, tylosin and coccidiostats in their annual programs of PTs.

7. Conclusions

Current feed-production practices lead inevitably to carry over between consecutive production batches, so cross-contamination of the batch following the production of a medicated feed is practically unavoidable. Recent Directive 2009/8/EC [10] reflects this situation to some extent and adopts a pragmatic solution [i.e. a certain level of contamination is allowed for some compounds considered to be additives at present (e.g. coccidiostats), provided that their concentrations remain below a established limit, but other veterinary drugs (e.g., antibiotics) are not contemplated]. The zero-tolerance principle should therefore be applied to these compounds in non-medicated feeds, and this causes major difficulties to the feed industry.

In this complex scenario, analytical methods play a crucial role, both for the analysis of medicated feeds and the effective control of non-medicated feeds. Most existing methods are based on LC, mostly with UV detection. MS, which is recognized as an essential technique in food analysis, is currently rarely applied as a detection system in feed analysis. This will probably change in the near future, as the trends in other fields of analysis show.

Legislation reveals that the approach to feed analysis is more classical than to food analysis, with noticeable differences in analytical methods and validation. For example, recent Regulation (EC) 152/2009 [24] lists official methods for the analysis of some coccidiostats, but none makes use of MS detection. In this regard, the older Decision 2002/657/EC [25] is broader and establishes that any method fulfilling the required performance characteristics can be used for the analysis of veterinary drug residues in food.

In some cases, different approaches are recommended. For example, according to Decision 2002/657/EC [25], the confirmatory analysis of banned compounds requires the use of MS detection, but Regulation (EC) 152/2009 [24] provides methods for compounds corresponding to this category that use UV detection.

It is rather surprising that, in spite of its crucial importance, the determination of antimicrobials in animal feed does not attract the attention it deserves. The number of papers published on this subject over the past

10 years is low in absolute terms and extremely low compared with the number of papers devoted to food analysis.

Finally, we should mention that laboratories currently involved in the analysis of veterinary antimicrobials in feed have few external tools for quality assessment. There are no CRMs available, and only a few interlaboratory tests are organized.

Acknowledgements

The authors from the *Universitat de Barcelona* acknowledge the Spanish *Ministerio de Ciencia e Innovación* for financial support (Project Number AGL2008-05578-CO5-03). S. Borràs also thanks the *Generalitat de Catalunya* for an FI grant (Grant Number 2010FI_B00714).

References

- [1] European Feed Manufacturers' Federation (<http://www.fefac.org>).
- [2] European Commission, Regulation (EC) No 1831/2003 on additives for use in animal nutrition, Off. J. Eur. Union L 268 (2003) 29.
- [3] International Organization for Standardization (ISO), ISO/IEC 17025:2005 standard. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, ISO, Geneva, Switzerland, 2005.
- [4] European Commission, Regulation (EC) No 178/2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety, Off. J. Eur. Union L 31 (2002) 1.
- [5] European Commission, Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products, Off. J. Eur. Union L 311 (2001) 1.
- [6] European Commission (EC), Directorate General for Health and Consumers, Evaluation of the EU legislative framework in the field of medicated feed: Final report, EC, Brussels, Belgium, 2010.
- [7] J.D.G. McEvoy, Anal. Chim. Acta 473 (2002) 3.
- [8] W. Strauch, Kraftfutter 85 (2002) 239.
- [9] European Commission, Regulation (EC) No 183/2005 laying down requirements for feed hygiene, Off. J. Eur. Union L 35 (2005) 1.
- [10] European Commission, Commission Directive 2009/8/EC amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in non-target feed, Off. J. Eur. Union L 40 (2009) 19.
- [11] European Commission, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) portal database (<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal>).
- [12] European Commission, Regulation (EC) No 882/2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules, Off. J. Eur. Union L 191 (2004) 1.
- [13] European Commission, Council Directive 96/25/EC on the circulation of feed materials, amending Directives 70/524/EEC, 74/63/EEC, 82/471/EEC and 93/74/EEC and repealing Directive 77/101/EEC, Off. J. Eur. Union L 125 (1996) 35.
- [14] European Commission, Regulation (EC) No 767/2009 on the placing on the market and use of feed, amending European Parliament and Council Regulation (EC) No 1831/2003 and repealing Council Directive 79/373/EEC, Commission Directive 80/511/EEC, Council Directives 82/471/EEC, 83/228/EEC, 93/74/EEC, 93/113/EC and 96/25/EC and Commission Decision 2004/217/EC, Off. J. Eur. Union L 229 (2009) 1.
- [15] European Commission, Directive 2002/32/EC on undesirable substances in animal feed, Off. J. Eur. Union L 140 (2002) 10.
- [16] European Commission, Council Directive 90/167/EC laying down the conditions governing the preparation, placing on the market and use of medicated feedingstuffs in the Community, Off. J. Eur. Union L 92 (1990) 42.
- [17] European Commission, Directive 2004/28/EC amending Directive 2001/82/EC on the Community code relating to veterinary medicinal products, Off. J. Eur. Union L 136 (2004) 58.
- [18] European Commission, Commission Directive 2006/130/EC implementing Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of criteria for exempting certain veterinary medicinal products for food-producing animals from the requirement of a veterinary prescription, Off. J. Eur. Union L 349 (2006) 15.
- [19] European Commission, Commission Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council on the Community code relating to medicinal products for veterinary use, Off. J. Eur. Union L 44 (2009) 10.
- [20] European Commission, Commission Regulation (EC) No 242/2010 creating the Catalogue of feed materials, Off. J. Eur. Union L 77 (2010) 17.
- [21] European Commission, Regulation (EU) No 454/2010 on transitional measures under Regulation (EC) No 767/2009 of the European Parliament and of the Council as regards the labelling provisions for feed, Off. J. Eur. Union L 128 (2010) 1.
- [22] US Food and Drug Administration (<http://www.fda.gov>).
- [23] Association of American Feed Control Officials (<http://www.aafco.org>).
- [24] European Commission, Commission Regulation (EC) No 152/2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed, Off. J. Eur. Union L 54 (2009) 1.
- [25] European Commission, Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Union L 221 (2002) 8.
- [26] T.B. Whitaker, Food Control 14 (2003) 233.
- [27] F. Cheli, A. Campagnoli, L. Pinotti, E. Fusi, V. Dell'Orto, Ital. J. Animal Sci. 8 (2009) 5.
- [28] T. Herrman, K. Behnke, Testing mixer performance. Feed Manufacturing, Bulletin MF-1172, Department of Grain Science and Industry, Kansas State University, USA, 1994.
- [29] Y.X. Zhou, W.J. Yang, L.Y. Zhang, Z.Y. Wang, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 30 (2007) 1603.
- [30] J.M. Hayes, J. AOAC Int. 88 (2005) 1777.
- [31] P. Viñas, N. Balsalobre, M. Hernández-Córdoba, Anal. Chim. Acta 558 (2006) 11.
- [32] L. Wang, H. Yang, C. Zhang, Y. Mo, X. Lu, Anal. Chim. Acta 619 (2008) 54.
- [33] L.J. Farer, J. AOAC Int. 88 (2005) 462.
- [34] M.J. Gramse, P.E. Jacobson, J. AOAC Int. 88 (2005) 679.
- [35] S. De Baere, P. De Backer, Anal. Chim. Acta 586 (2007) 319.
- [36] E. Benito-Peña, J.L. Urraca, M.C. Moreno-Bondí, J. Pharm. Biomed. Anal. 49 (2009) 289.
- [37] F. Van Holthoorn, P. Mulder, E. van Bennekom, H. Heskamp, T. Zuidema, H. van Rhijn, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 3027.
- [38] L. Kantiani, M. Farré, J.M. Grases i Freixiedas, D. Barceló, J. Chromatogr., A 1217 (2010) 4247.
- [39] L. Kantiani, M. Farré, J.M. Grases i Freixiedas, D. Barceló, Anal. Bioanal. Chem. 398 (2010) 1195.
- [40] V. Hormazabal, M. Yndestad, O. Ostensvik, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 25 (2002) 2655.

Trends

Trends in Analytical Chemistry, Vol. 30, No. 7, 2011

- [41] C. Focht, J. AOAC Int. 91 (2008) 479.
- [42] U. Vincent, M. Chedin, S. Yasar, C. von Holst, J. Pharm. Biomed. Anal. 47 (2008) 750.
- [43] G. Dusi, E. Faggionato, V. Gamba, A. Baiguera, J. Chromatogr., A 882 (2000) 79.
- [44] C. Van Poucke, K. De Keyser, A. Baltusnikiene, J.D.G. McEvoy, C. Van Peteghem, Anal. Chim. Acta 483 (2003) 99.
- [45] A. Kot-Wasik, A. Wasik, Anal. Chim. Acta 543 (2005) 46.
- [46] M. Dousa, K. Lemr, Z. Stransky, J. AOAC Int. 88 (2005) 673.
- [47] M.J. Hutchinson, P.B. Young, D.G. Kennedy, Food Addit. Contam. 22 (2005) 113.
- [48] C. Situ, C.T. Elliott, Anal. Chim. Acta 529 (2005) 89.
- [49] L. Mortier, E. Daeseleire, C. Van Peteghem, J. Chromatogr., B 820 (2005) 261.
- [50] L. Capitán-Vallvey, A. Ariza, R. Checa, N. Navas, Chromatographia 65 (2007) 283.
- [51] A.A. Sanchez, H.M. Campbell, J. AOAC Int. 91 (2008) 685.
- [52] G. Kesiuaitė, E. Naujalis, A. Padarauskas, J. Chromatogr., A 1209 (2008) 83.
- [53] E. van der Heeft, Y.J.C. Bolck, B. Beumer, A.W.J.M. Nijrolder, A.A.M. Stolker, M.W.F. Nielen, J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 20 (2009) 451.
- [54] C. Civitareale, M. Fiori, A. Ballerini, G. Brambilla, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 317.
- [55] J. Tong, Q. Rao, K. Zhu, Z. Jiang, S. Ding, J. Sep. Sci. 32 (2009) 4254.
- [56] B. Cancho-Grande, M. Rodríguez-Comesaña, J. Simal-Gándara, Chromatographia 54 (2001) 481.
- [57] S. Morales-Muñoz, M.D.L. de Castro, J. Chromatogr., A 1066 (2005) 1.
- [58] V. Hormazábal, M. Yndestad, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 23 (2000) 1083.
- [59] C.A.J. Hajee, H.A. van Rhijn, J.J.P. Lasaroms, H.J. Keukens, J. de Jong, Analyst (Cambridge, UK) 126 (2001) 1332.
- [60] L. Capitán-Vallvey, N. Navas, A. Titos, R. Checa, Chromatographia 54 (2001) 15.
- [61] L.F. Capitán-Vallvey, A. Titos, R. Checa, N. Navas, J. Chromatogr., A 943 (2002) 227.
- [62] M. Touraki, M. Ladoukakis, C. Prokopiou, J. Chromatogr., B 751 (2001) 247.
- [63] B. Saad, R. Mohamad, N. Mohamed, G.D. Lawrence, M.S. Jab, M.I. Saleh, Food Chem 78 (2002) 383.
- [64] I. Pecorelli, R. Galarini, R. Bibi, A. Floridi, E. Casciarri, A. Floridi, Anal. Chim. Acta 483 (2003) 81.
- [65] R. Galarini, L. Fioroni, F. Angelucci, G.R. Tovo, E. Cristofani, J. Chromatogr., A 1216 (2009) 8158.
- [66] G. Scortichini, L. Annunziata, V. Di Girolamo, R. Buratti, R. Galarini, Anal. Chim. Acta 637 (2009) 273.
- [67] R.L. Smallidge, K. Albert, N.L. Britton, H.M. Campbell, C.-S. Jeon, S. Costello, K. Elson, K. Flood, J.-K. Lee, D.M. Lowie, J.W. Moran, M. Mustafa, B. Poe, P. Proksa, J.M. Turner, J.L. Weigand, L.M. Wetzler, J. AOAC Int. 83 (2000) 260.
- [68] C.A. Spinks, C.G. Schut, G.M. Wyatt, C.M.R.A. Morgan, Food Addit. Contam. 18 (2001) 11.
- [69] V. Jiménez, R. Companyó, J. Guiteras, Food Addit. Contam., Part A 26 (2009) 969.
- [70] V. Jiménez, J. Adrian, J. Guiteras, M.-P. Marco, R. Companyó, J. Agric. Food. Chem. 58 (2010) 7526.
- [71] R.D. Caballero, J.R. Torres-Lapasió, M.C. García-Alvarez-Coque, G. Ramis-Ramos, Anal. Lett. 35 (2002) 687.
- [72] M. Cronly, P. Behan, B. Foley, E. Malone, S. Earley, M. Gallagher, P. Shearan, L. Regan, J. Pharm. Biomed. Anal. 53 (2010) 929.
- [73] A. Boscher, C. Guignard, T. Pellet, L. Hoffmann, T. Bohn, J. Chromatogr., A 1217 (2010) 6394.
- [74] Progetto Trieste, Laboratory Proficiency Testing for Food Safety Analysis (<http://www.progettotrieste.com>).
- [75] Ducares company (<http://www.ducares.nl>).

Taula 3.1. Mètodes establerts per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos durant el període 2010-actualitat.

Table 3. (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
<i>COCCIDIOSTATS</i>								
Decoquinat	Cattle	<i>Technique:</i> mechanical shaking	None	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (125 x 3 mm, 5 µm) at 40°C	94-110	<i>LOD:</i> 0.1-10 <i>LOQ:</i> 0.33-15	[120]
Diclazuril	Pig							
Halofuginone	Poultry	<i>Time:</i> 60 min			<i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid			
Lasalocid		<i>Solvent:</i> 10% Na ₂ CO ₃ in H ₂ O + ACN			<i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid in ACN			
Maduramicin					<i>Elution:</i> gradient			
Monensin								
Narasin								
Nicarbazin								
Robenidina								
Salinomycin								
Semduramicin								
Decoquinat	Pig	<i>Technique:</i> mechanical shaking	Freezing (- 80°C) + dilution	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₈ (100 x 3 mm, 3.5 µm) at 40°C	89-105	<i>CCα:</i> 11-35 <i>CCβ:</i> 1570-4524	[126]
Diclazuril	Poultry							
Halofuginone		<i>Time:</i> 45 min			<i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid			
Lasalocid		<i>Solvent:</i> H ₂ O + ACN + anhydrous magnesium sulfate and sodium chloride			<i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid in ACN			
Maduramicin					<i>Elution:</i> gradient			
Monensin								
Narasin								
Nicarbazin								
Robenidina								
Salinomycin								
Semduramicin								
Monensin	Chicken	<i>Technique:</i> QuEChERS	<i>Technique:</i> QuEChERS (PSA + C ₁₈)	DART-Orbitrap-MS	None	72-84	<i>LOQ:</i> 250-500	[135]
Narasin		<i>Time:</i> 1 min						
Robenidina		<i>Solvent:</i> H ₂ O + ACN						
Salinomycin		<i>Salts:</i> MgSO ₄ :NaCl (4:1)	<i>Salts:</i> MgSO ₄					

Taula 3.1. Mètodes establerts per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos durant el període 2010-actualitat.**Table 3.** (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
Lasalocid Maduramicin Monensin Narasin Salinomycin Semduramycin	Not specified	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 2 h <i>Solvent:</i> ACN:H ₂ O (84:16)	None	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 3 mm, 5 µm) <i>Mobile phase A:</i> 2 mM ammonium acetate with 2% acetic acid <i>Mobile phase B:</i> ACN <i>Elution:</i> isocratic (5:95)	74-112	<i>LOD:</i> 1.1-4.7 <i>LOQ:</i> 2.9-12 <i>CCα:</i> 25-370 <i>CCβ:</i> 29-500	[137]
Laidlomycin Lasalocid Maduramicin Monensin Narasin Salinomycin	Horse Pig Poultry	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 60 min <i>Solvent:</i> MeOH:H ₂ O (90:10)	Dilution	LC-MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 µm) at 45°C <i>Mobile phase A:</i> 0.05 M ammonium acetate <i>Mobile phase B:</i> ACN:MeOH (70:30) <i>Elution:</i> gradient	79-133	Not reported	[132]
Lasalocid Monensin Narasin Salinomycin	Horse	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 1 h <i>Solvent:</i> MeOH:H ₂ O (90:10)	None	LC-MS/MS	<i>Column:</i> Not reported (50 x 2.1 mm, 5 µm) <i>Mobile phase A:</i> 20 mM heptafluorobutyric acid <i>Mobile phase B:</i> 20 mM heptafluorobutyric acid in ACN <i>Elution:</i> gradient	Not reported	<i>LOD:</i> 200	[127]
QUINOLONES								
Ciprofloxacin Enrofloxacin Fleroxacin Levofloxacin Sparfloxacin	Cattle Chicken Pig	<i>Technique:</i> MAE (80°C) <i>Time:</i> 15 min <i>Solvent:</i> 0.1 M pH 4 McIlvaine buffer with Na ₂ EDTA	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges) <i>Elution solvent:</i> MeOH:H ₂ O:HAc (60:40:0.04)	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₈ (150 x 4.6 mm, 5 µm) at 30°C <i>Mobile phase A:</i> 0.01 M ammonium acetate with 0.25% formic acid <i>Mobile phase B:</i> MeOH <i>Elution:</i> gradient	62-98	<i>LOD:</i> 5-9.1 <i>LOQ:</i> 16.5-30	[129]

SULFONAMIDES

Sulfachloropyridazine	Chicken	<i>Technique:</i> manual shaking	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges)	LC-UV	<i>Column:</i> C ₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm) <i>Mobile phase A:</i> pH 4.7 buffer <i>Mobile phase B:</i> ACN <i>Elution:</i> gradient	47-66	<i>LOD:</i> 74-265 <i>LOQ:</i> 265-868	[131]
Sulfadiazine	Cow	<i>Time:</i> 1 min	<i>Elution solvent:</i> 0.5% ammonia: MeOH (50:50)					
Sulfadimethoxine	Hen							
Sulfadimidine	Pig	<i>Solvent:</i> ACN:H ₂ O (95:5)						
Sulfadoxine	Piglet							
Sulfamethoxazole	Rabbit							
Sulfamethoxypyridazine								
Sulfaquinoxaline								
Sulfadiazine	Fish	<i>Technique:</i> vortex	Dilution	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 2.1 mm, 5 µm) at 25°C <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid <i>Mobile phase B:</i> ACN <i>Elution:</i> gradient	78-108	Not reported	[125]
Sulfadimethoxine		<i>Time:</i> 9 min						
Sulfamerazine (plus tetracycline, chlortetracycline, oxytetracycline)		<i>Solvent:</i> MeOH:H ₂ O (70:30) with 0.1 M Na ₂ EDTA		ELISA		76-110	Not reported	
Sulfachloropyridazine	Pig	<i>Technique:</i> QuEChERS	<i>Technique:</i>	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 5 µm) at 30°C <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid:ACN (95:5) <i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid:ACN (5:95) <i>Elution:</i> gradient <i>Internal standard:</i> sulfapyridine	86-107	<i>LOD:</i> 0.5-4.2 <i>LOQ:</i> 0.9-7.1 <i>CCα:</i> 50.4-52.9 <i>CCβ:</i> 50.7-55.8	[138]
Sulfadiazine	Poultry	<i>Time:</i> 50 min (mechanical shaking)	QuEChERS (PSA) <i>Salts:</i> None					
Sulfadimethoxine		<i>Solvent:</i> H ₂ O + 0.1% acetic acid in ACN:MeOH (75:25)						
Sulfadoxine		<i>Salts:</i> MgSO ₄ :sodium acetate (4:0.5)						
Sulfaguanidine								
Sulfadimidine								
Sulfamerazine								
Sulfamethoxazole								
Sulfamethoxypyridazine								
Sulfanilamide								
Sulfaquinoxaline								
Sulfathiazole								
Sulfisoxazole								

Taula 3.1. Mètodes establerts per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos durant el període 2010-actualitat.**Table 3.** (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
Sulfachloropyridazine	Chicken	<i>Technique:</i> vortex	<i>Technique:</i> SPE	LC-UV	<i>Column:</i> C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm) at 30°C	85-101	<i>LOD:</i> 390-640 <i>LOQ:</i> 1290-2130	[128]
Sulfadiazine	Cow	<i>Time:</i> not reported	(cation exchange cartridges)		<i>Mobile phase A:</i> pH 4.5 buffer			
Sulfadimethoxine	Fish	<i>Solvent:</i> chloroform:acetone (50:50)	<i>Elution solvent:</i> ammonium:MeOH (2.5:97.5)		<i>Mobile phase B:</i> MeOH:ACN (50:50)			
Sulfamerazine	Rabbit				<i>Elution:</i> gradient			
Sulfamethoxazole								
Sulfamethoxypyridazine								
Sulfamonomethoxine								
Sulfaquinoxaline								
Sulfathiazole								
<i>TETRACYCLINES</i>								
Chlortetracycline	Fish	<i>Technique:</i> vortex	Dilution	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 2.1 mm, 5 µm) at 25°C	78-108	Not reported	[125]
Oxytetracycline		<i>Time:</i> 9 min			<i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid			
Tetracycline (plus sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamerazine)		<i>Solvent:</i> MeOH:H ₂ O (70:30) with 0.1 M Na ₂ EDTA			<i>Mobile phase B:</i> ACN			
				ELISA		76-110	Not reported	
Chlortetracycline	Pig	<i>Technique:</i> vortex + sonication	<i>Technique:</i> SPE (polymeric cartridges)	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 2.1 mm, 5 µm)	76-120	<i>LOD:</i> 3-20 <i>LOQ:</i> 10-50	[130]
Doxycycline	Poultry	<i>Time:</i> 60 min	<i>Elution solvent:</i> MeOH:ethyl acetate (10:90)		<i>Mobile phase A:</i> 0.3% formic acid			
Oxytetracycline		<i>Solvent:</i> pH 4 McIlvaine buffer with Na ₂ EDTA			<i>Mobile phase B:</i> 0.3% formic acid in ACN			
Tetracycline					<i>Elution:</i> gradient			

Chlortetracycline Doxycycline Oxytetracycline Tetracycline	Pig	<i>Technique:</i> mechanical shaking <i>Time:</i> 20 min <i>Solvent:</i> McIlvaine buffer with 0.1 M Na ₂ EDTA	<i>Technique:</i> SPE (mixed-mode cation exchange cartridges) + dilution <i>Elution solvent:</i> MeOH:ammonia (95:5)	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 3 mm, 5 µm) at 10°C <i>Mobile phase A:</i> 0.001 M ammonium acetate <i>Mobile phase B:</i> 0.01 M ammonium acetate:ACN (10:90) <i>Elution:</i> gradient <i>Internal standard:</i> demeclocycline	74-100	Not reported	[143]
<i>MULTICLASS</i>								
27 antimicrobials (plus 27 pesticides and 9 mycotoxins)	Fish	<i>Technique:</i> mechanical shaking + sonication <i>Time:</i> 1.25 h <i>Solvent:</i> 0.1% formic acid in ACN:H ₂ O (80:20)	None	UPLC-QTOF-MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) at 60°C <i>Mobile phase A:</i> 0.1 mM ammonium acetate and 0.01% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.1 mM ammonium acetate and 0.01% formic acid in MeOH <i>Elution:</i> gradient	Not reported	LOD: 20-100	[136]
48 antimicrobials	Pig	<i>Technique:</i> sonication + mechanical shaking <i>Time:</i> 30 min + 1 h <i>Solvent:</i> 1% formic acid in ACN:MeOH:H ₂ O (65:25:10)	None	LC-Orbitrap-MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 3.2 mm, 5 µm) at 35°C <i>Mobile phase A:</i> 0.5% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 0.5% formic acid in MeOH <i>Elution:</i> gradient	61-124	LOD: 10 LOQ: 25-100	[134]
81 antimicrobials (plus 48 other veterinary drugs and 235 pesticides)	Chicken Hen Horse Rabbit	<i>Technique:</i> vortex + mechanical shaking <i>Time:</i> 1 h <i>Solvent:</i> H ₂ O + ACN:formic acid (99:1)	<i>Technique:</i> SPE (florisil cartridges) <i>Elution solvent:</i> not reported	UPLC-QTOF-MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) at 30°C <i>Mobile phase A:</i> 0.1% formic acid with 4 mM ammonium formate <i>Mobile phase B:</i> 0.1% formic acid in MeOH with 4 mM ammonium formate <i>Elution:</i> gradient	60-120	LOQ: 4-200	[133]

Taula 3.1. Mètodes establerts per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos durant el període 2010-actualitat.**Table 3.** (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
62 antimicrobials (plus 24 other veterinary drugs, 136 pesticides and 36 plant toxins)	Horse (plus egg, honey, maize, meat, milk)	<i>Technique:</i> vortex + mechanical shaking <i>Time:</i> 1 h <i>Solvent:</i> H ₂ O + ACN:formic acid (99:1)	None	UPLC-MS/MS ESI (+)	<i>Column:</i> C ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) at 40°C <i>Mobile phase A:</i> 1 mM ammonium formate and 0.002% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 1 mM ammonium formate and 0.002% formic acid in MeOH:H ₂ O (95:5) <i>Elution:</i> gradient	36-139	LOD: 10-50	[78]
				LC-MS/MS ESI (-)	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 3 mm, 5 µm) <i>Mobile phase A:</i> 1 mM ammonium formate and 0.002% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 1 mM ammonium formate and 0.002% formic acid in MeOH:H ₂ O (95:5) <i>Elution:</i> gradient			
				UPLC-TOF-MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) at 40°C <i>Mobile phase A:</i> 1 mM ammonium formate and 0.002% formic acid <i>Mobile phase B:</i> 1 mM ammonium formate and 0.002% formic acid in MeOH:H ₂ O (95:5) <i>Elution:</i> gradient			

MAE, Microwave-assisted extraction; MSPD, Matrix solid-phase dispersion; SPE, Solid-phase extraction; LLE, Liquid-liquid extraction; PLE, Pressurized liquid extraction; EC, Electrochemical

3.2. Mètodes multiresidu per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos

En aquest capítol es presenta el desenvolupament i la validació de dos mètodes multiresidu basats en la LC-FL per a l'anàlisi en pinsos de 8 sulfamides (SDZ, SDD, SMP, SCP, SDX, SMX i SQX) i 6 fluoroquinolones (MAR, CIP, DAN, ENR, SAR i DIF), respectivament. Concretament, s'han estudiat les condicions òptimes per a l'extracció i la determinació cromatogràfica de cadascuna d'aquestes dues famílies d'agents antimicrobians. La fluorescència natural de les fluoroquinolones fa de la detecció fluorimètrica una tècnica apropiada per a la seva determinació. En canvi, en el cas de les sulfamides, les quals no presenten fluorescència intrínseca, la determinació es basa en la detecció de derivats fluorescents i requereix, per tant, una reacció de derivatització. L'ús d'un detector convencional permetrà l'aplicació d'ambdós mètodes en qualsevol laboratori de rutina ja que evita els costos d'adquisició i manteniment d'instruments de MS, els quals sovint no estan disponibles a les fàbriques de pinsos. D'altra banda, per a la separació cromatogràfica s'ha avaluat l'eficàcia de columnes de partícules de nucli sòlid. Aquestes es presenten com una alternativa per a l'obtenció d'eficàcies comparables a les que ofereixen les columnes amb partícules de grandària inferior a 2 µm emprades en UHPLC, però dins del límits de pressió dels sistemes convencionals d'HPLC i, per tant, sense la necessitat d'invertir tampoc en nova instrumentació [169-172]. Pel que fa a la validació, s'han investigat pinsos destinats a diferents espècies animals per tal de comprovar que la variabilitat i complexitat de la matriu no afecta la fiabilitat dels resultats obtinguts. Ambdós mètodes analítics han estat finalment aplicats a l'anàlisi de mostres reals.

Els resultats d'aquest treball s'han recollit en els següents articles:

- *Analysis of sulfonamides in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 2011, 59(10), 5240-5247.
- *Analysis of fluoroquinolones in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection.* Journal of Separation Science 2012, 35(16), 2048-2053.

El mètode desenvolupat per a les fluoroquinolones ha estat implementat al Laboratori Agroalimentari de Cabrils (LAC) de la Generalitat de Catalunya per a la determinació d'enrofloxacina en pinsos.

3.2.1. Publicació II. *Analysis of sulfonamides in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection*

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

ARTICLE

pubs.acs.org/JAFC

Analysis of Sulfonamides in Animal Feeds by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

Sílvia Borràs, Ramon Companyó,* and Jacinto Guiteras

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

ABSTRACT: Two analytical methodologies for the simultaneous analysis of eight sulfonamide antibiotics in animal feeds were developed. Analytes were extracted in a simple and rapid procedure by manual shaking with an ethyl acetate/ultrapure water mixture (99:1, v/v) without further sample cleanup. Mean recoveries ranging from 72.7% to 99.4% with relative standard deviations below 9% were achieved from spiked animal feed samples. Determination was carried out by high-performance liquid chromatography using fluorometric detection with precolumn derivatization. The separation of the derivatized compounds was performed using two different chromatographic columns: a conventional C₁₈ column and a recently available core-shell particle Kinetex C₁₈ column. Both methods were validated in-house in six different feed matrices, and the two approaches were compared. The experiments showed that the method using the Kinetex column was superior with regard to speed of analysis and precision, both under repeatability and intermediate reproducibility conditions. The limits of detection and quantification were also greatly improved, below 0.10 and 0.34 μg/g, respectively. Finally, this novel approach was successfully applied to the analysis of real feed samples.

KEYWORDS: sulfonamides, feed analysis, liquid chromatography, fluorescence detection, Kinetex

■ INTRODUCTION

The widespread usage of antibiotics in veterinary practices can lead to the presence of residues in foodstuffs of animal origin.¹ Residues of these compounds can have a harmful effect on human health, such as allergic reactions in some hypersensitive individuals as well as generation of drug resistant bacterial strains in humans,^{2–4} and for these reasons their use in animal husbandry must be subjected to strict control.⁵ Consequently, authorities around the world have laid down a large number of regulations to ensure food safety and reduce human exposure. In the European Union, maximum residue limits (MRLs) have been established for antibacterials in animal-derived foods, and in the case of feeds no antibiotics other than coccidiostats and histomonostats can be marketed and used as feed additives.⁶ Moreover, medicated feeds, which contain active principles at therapeutic levels, must be prepared from authorized medical premixes and used under veterinary prescription.⁷ However, the fraudulent use of medicated feeds to illegally promote animal growth must be considered.

Cross-contamination from one medicated feed batch to the next nonmedicated one, usually in the 2–10 μg/g concentration range,⁸ can occur either during manufacturing or transport or even at the farm. The critical control points for this chain of events, in which adequate precautions must be taken, are both in the feed mill and on the farm.⁹ Thus, the development of sensitive and reliable analytical methodology is required to ensure the compliance of animal feeds with the current legislation.

Sulfonamides (SAs) are among the most widely administered groups of antimicrobials in animal husbandry within the European countries,¹⁰ and, as a consequence, they have been commonly identified as contaminants in animal feeds.¹¹

Several methods have been developed for the analysis of SAs in different matrices, especially in edible animal tissues^{12–16} and other

food products such as milk,^{3,17–20} eggs^{21,22} or honey.^{23,24} However, methods concerning animal feeds are still scarce.^{11,25–32}

Analytes are usually extracted with polar solvents or hydro-organic mixtures, mainly based on acetonitrile or methanol, using techniques such as mechanical and manual shaking, sometimes combined with sonication, as well as microwave assisted extraction (MAE) or pressurized liquid extraction (PLE). Some of the current methods also involve a cleanup of the extracts to remove matrix interferences. Methods like liquid-liquid extraction (LLE) or solid-phase extraction (SPE), frequently with C₁₈ or polymeric cartridges, are the most common approaches. In some cases, however, a dilution of the extract is enough to avoid matrix interferences. Finally, separation and determination of SAs is normally performed by liquid chromatography with ultraviolet (LC–UV), fluorescence (LC–FL) or mass spectrometry detection (LC–MS). In recent years, some multiresidue methods using LC–MS/MS^{31,32} have been published, but they often deal with a few analytes from the same group of antibacterials. Alternative assays based on immunochemical techniques, such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),^{26,28} have also been reported for rapid screening of SA residues, but, in spite of their low cost and simplicity of analysis, these methods only provide semiquantitative measurements.

In this paper, two methods for the simultaneous determination of eight sulfonamides at low carry-over levels in animal feeds are described. Both methods involve a simple extraction, without further cleanup, followed by a precolumn derivatization with fluorescamine prior to the analytical determination by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using a conventional C₁₈ column and a core-shell particle

Received: February 9, 2011

Accepted: April 14, 2011

Revised: April 14, 2011

Published: April 14, 2011

Kinetex C₁₈ column. The efficiency of the recently available Kinetex columns^{33,34} for conventional LC instruments was investigated in order to reduce time of analysis and increase productivity, which is of great interest for laboratories today, especially for those performing routine analysis. The two methods developed were validated and compared. Due to the variety and complexity of the feed matrices, the validation included assays with six different kinds of feeds, to ensure that the proposed methods were reliable with a wide variety of matrices. The concentration level of the target analytes in the feeds used for the validation experiments was set at 2 µg/g, which roughly corresponds to a drug-free feed cross-contaminated during the production process. Finally, the applicability of the Kinetex method, which improved the speed and efficiency of the analysis, was also assessed by analyzing real feed samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. Sulfadiazine (SDZ), sulfadimidine (SDD), sulfamethoxy-pyridazine (SMP), sulfachloropyridazine (SCP), sulfadoxine (SDX), sulfamethoxazole (SMX), sulfadimethoxine (SDM), sulfaquinolaxine (SQX) and the internal standard (IS) sulfamethoxy-diazine (SME), Vetranal grade, were purchased from Riedel-de Haën (Buchs, Switzerland). Fluorescamine (≥99.0%) was supplied by Fluka (Buchs, Switzerland).

HPLC grade ethyl acetate (AcEt), acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), and doubly deionized water (Milli-Q, Millipore, Molsheim, France) of 18.2 mΩ/cm resistivity was used. All other chemicals were of analytical reagent grade.

A mixed stock standard solution containing 50 mg/L of each sulfonamide and another containing the same concentration of the internal standard (SME) were prepared monthly in methanol from the solid compounds and stored in dark glass bottles at 4 °C. Working standard solutions (from 40 to 800 µg/L) were freshly prepared by dilution of the stock solution with acetonitrile. Internal standard (200 µg/L) and fluorescamine solutions (0.2%, w/v) in acetonitrile were prepared daily.

Mobile phases of several compositions were prepared by mixing ACN with the appropriate volume of aqueous formic acid/sodium formate buffer solutions, previously filtered through a 0.22 µm nylon filter.

Feed Samples. Samples of six different feeds for pigs, piglets, cows, chickens, laying hens and rabbits were provided by the Associació Catalana de Fabricants de Pinsos (ASFAC). On arrival, they were stored at 4 °C in poly(vinyl chloride) (PVC) flasks, and pelleted samples were ground with a domestic chopper (Moulinex, France) before being used. Blank samples were tested to be free of sulfonamides by LC-MS/MS.¹⁴

For the validation studies, samples spiked at 2 µg/g were prepared "in-house" by mixing blank feed with the corresponding amount of a quality control material consisting of a pig feed spiked at 50 µg/g with the eight sulfonamides, which was prepared as described elsewhere.³⁵ The mixtures were placed in PVC flasks containing ceramic balls and rolled on a rolling table for at least 90 h. After homogenization, spiked feeds were stored at 4 °C. Prior to analysis, the samples were allowed to reach room temperature.

Real feed samples were obtained from production lines, where medicated feeds containing SDZ had been recently prepared.

Apparatus. Chromatographic analysis was performed with a Shimadzu system (Kyoto, Japan), consisting of a LC-10AD VP quaternary pump, a SIL-10AD VP automatic injector and a RF-10A XL fluorescence detector with a 150 W xenon lamp. LC Solution for Shimadzu LC-Workstations was used for instrument control and data processing. Two analytical columns were used, a LiChrospher 100 RP-18 (Merck, 250 × 4 mm, 5 µm), equipped with a LiChrospher 100 RP-18 (Merck, 4 × 4 mm,

5 µm) guard column, and a Kinetex C₁₈ (150 × 4.6 mm, 2.6 µm), equipped with a Guard Cartridge System KJ0-4282 (4 × 2 mm), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). Both columns were thermostated at 25 °C.

A Milestone ETHOS E system (Sorisole, Italy), designed for extraction using organic solvents and able to hold twelve 100 mL extraction vessels with magnetic stirring, was used for microwave assisted extraction (MAE).

Mechanical shaking was carried out with a Rotary Mixer 34526 (Breda Scientific, Breda, Netherlands). The pH was measured using a Crison GLP21 pH-meter (Alella, Spain), equipped with a Crison 52-02 Ag/AgCl combined glass electrode.

Other instruments used in sample preparation were a Heraeus Christ Labofuge 400 centrifuge (Osterode am Harz, Germany), a TurboVap LV Caliper evaporator (Hopkinton, USA), a Stuart vortex mixer SA8 (Staffordshire, U.K.) and a RollerMix D RM120-DE Ovan (Badalona, Spain) for the homogenization of spiked feed.

Feed Extraction Procedure. Feed samples (1 g) were placed in 25 mL centrifuge tubes and extracted by hand-shaking for one minute with 10 mL of a mixture of ethyl acetate and deionized water (99:1, v/v). The resulting extracts were centrifuged at 1370g for ten minutes.

Precolumn Derivatization. Either 1 mL of feed extract or 1 mL of a standard solution in acetonitrile was transferred to a glass vial, evaporated to dryness under a nitrogen stream (about 5 min, 50 °C, 10 psi) and reconstituted with 1 mL of the internal standard solution (200 µg/L). Subsequently, 2 mL of aqueous formic acid/sodium formate buffer solution at pH 3.4 and 1 mL of 0.2% fluorescamine solution were added. The mixture was left to stand in the dark for at least 2 h at room temperature and filtered through a 0.45 µm nylon membrane before injection (50 µL) into the chromatographic system. Fluorescence of the derivatized sulfonamides remained constant for about 8 h.

LC-FL Analysis. The chromatographic separation was carried out at 25 °C using a binary mobile phase in gradient mode. Mobile phase A consisted of a 0.01 M formic acid/sodium formate buffer at pH 3.4, and mobile phase B was acetonitrile. The following gradient program, at a flow rate of 1.5 mL/min, was applied for the LiChrospher column: 0–15 min, 33% B; 15–25 min, linear increase to 40% B; 25–28 min, decrease to 33% B; and finally 28–35 min, 33% B. The gradient program for the Kinetex column, at a flow rate of 1.6 mL/min, was as follows: 0–6 min, 33% B; 6–10 min, linear increase to 38% B; 10–12 min, decrease to 33% B; and finally 12–17 min, 33% B. Excitation/emission wavelengths were 405 and 485 nm, respectively. Quantification was performed by external calibration curves.

RESULTS AND DISCUSSION

Feed Extraction Procedure. Preliminary tests for the extraction of sulfonamides from animal feed were carried out with a quality control material consisting of pig feed spiked with SDZ and SDD at 5 µg/g.³⁵ At this initial stage of method development, a LC-UV method free of matrix interferences developed in the same study³⁵ was used to evaluate the recovery of the target antibiotics.

In order to select a suitable solvent composition, the following solvent combinations were tested: ACN/H₂O (95:5, v/v), AcEt, and mixtures of AcEt/H₂O (95:5 and 90:10, v/v), AcEt/HAc (99:1 and 98:2, v/v) and AcEt/MeOH (99:1 and 98:2, v/v). For these experiments, 1 g of the quality control material was extracted by manual shaking for 1 min using 10 mL of the extracting solvent. The results, shown in Figure 1, indicated that ACN/H₂O (95:5, v/v) and AcEt/H₂O mixtures gave the highest recoveries for both SAs, about 80–85% for SDZ and 75–80% for

SDD. However, the analysis of blank feeds of different kinds showed that dirtier extracts were obtained when ACN was used, making them less suitable for the subsequent quantification of the selected antibiotics by LC–FL. When AcEt/H₂O mixtures were used, only one interfering peak corresponding to matrix components overlapped with those corresponding to SDD. Figure 2 shows the chromatograms obtained for blank feed extracts. Therefore, 95:5 and 90:10 (v/v) AcEt/H₂O mixtures were chosen for further work.

Different extraction techniques, including manual shaking (1 min), mechanical shaking (30 min) and microwave assisted extraction (20 min at 80 °C), were also assessed. Five extractions

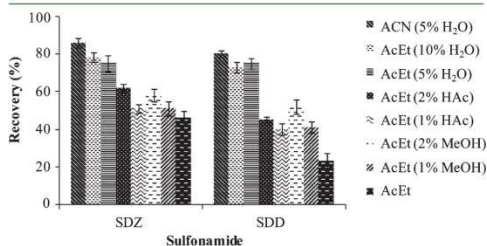


Figure 1. Recoveries obtained for SDZ and SDD using different extraction solvent compositions (mean values of 5 experiments).

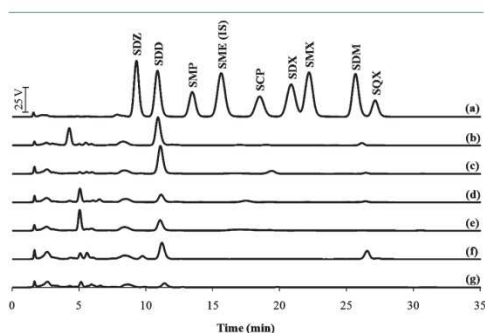


Figure 2. LC–FL chromatograms of a 200 µg/L standard mixture (a) and of blanks of different animal feeds extracted with AcEt/H₂O (95:5, v/v): pig (b), piglet (c), cow (d), chicken (e), laying hens (f) and rabbit (g).

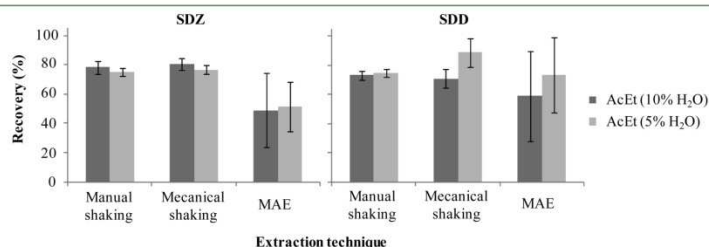


Figure 3. Recoveries obtained for SDZ and SDD using different extraction techniques (mean values of 5 experiments).

were carried out to evaluate the performance of each technique. The results obtained are shown in Figure 3. Best extraction efficiencies were obtained with manual and mechanical shaking, whereas MAE provided lower recoveries and also poorer reproducibility. Manual shaking for 1 min was selected as the most appropriate for the solid–liquid extraction, as it offered the best compromise between extraction time and efficiency.

These extraction conditions were tested in pig feed spiked at 2 µg/g with the 8 SAs, and the effect of lower water percentages, 1 and 2%, was also assessed. As shown in Figure 4, decreasing the water proportion in the extraction solvent from 5% to 1% had no significant effect on the recovery of the analytes, but the interference from the feed matrix coeluting with SDD was notably reduced.

Therefore, the conditions finally adopted consisted of manually shaking 1 g of feed with 10 mL of 99:1 (v/v) AcEt/H₂O for 1 min in a 25 mL centrifuge tube. Recoveries in these conditions ranged from 60 to 114%.

LC–FL Optimization. Sulfonamides themselves are not fluorescent, and derivatization with fluorescamine to form highly fluorescent pyrrolidine-type derivatives has often been used for fluorometric detection of SAs during LC, either in precolumn^{10,35} or postcolumn^{24,36} mode. In the present paper, a method previously applied to the analysis of sulfonamides in surface water and soils¹⁰ was adapted for their determination in feed samples. No changes were made to the already optimized parameters of the derivatization step with fluorescamine (reaction time, temperature, reagent concentration and solvent composition), but the elution gradient and flow rate were suitably modified to attain a good chromatographic separation using two different columns: one packed with 5 µm LiChrospher C₁₈ totally porous particles and another with 2.6 µm Kinetex C₁₈ core–shell particles.

First attempts were done using the conventional reversed-phase C₁₈ column. Several experiments were performed to test a wide range of gradient profiles, with acetonitrile percentages varying between 25% and 42% and flow rates ranging from 1 to 1.5 mL/min. An acceptable baseline chromatographic separation was achieved in 35 min for the majority of the target analytes using the elution program described in the LC–FL Analysis section, except for a slight overlap of the SDX and SMX peaks. Other parameters, such as column temperature and injection volume, were also studied to get a reliable separation, obtaining the best results when the column was held at 25 °C and an injection volume of 50 µL was used.

Subsequently, this method was adapted for the Kinetex column using the Kinetex Scaling Calculator³⁷ available online on the Phenomenex Web site. Only minor adjustments were needed to

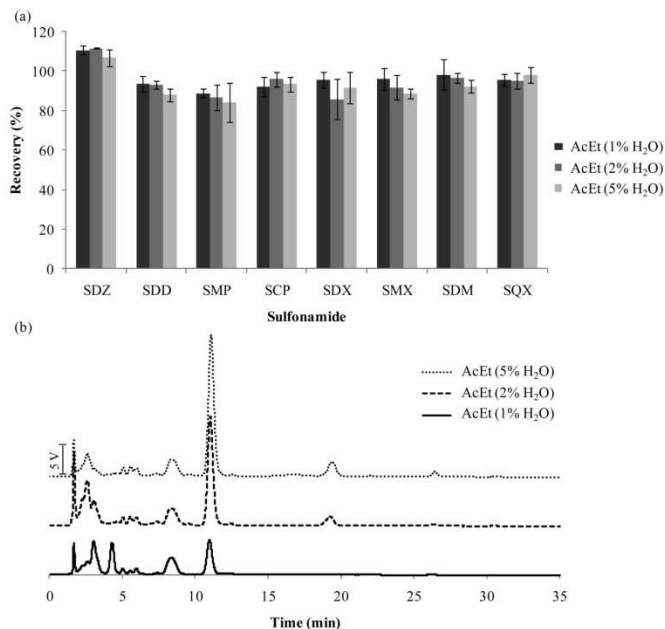


Figure 4. Recoveries obtained for SAs (a) and LC–FL chromatograms of blank piglet feed extracts (b) decreasing the water proportion in the extraction solvent (mean values of 5 experiments).

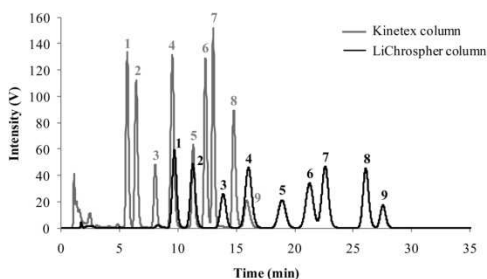


Figure 5. LC–FL chromatograms of a 200 µg/L standard mixture of the eight SAs and the internal standard (SME) using the two different columns: SDZ (1), SDD (2), SMP (3), SME (4), SCP (5), SDX (6), SMX (7), SDM (8) and SQX (9).

reach adequate analyte separation in about half the time (17 min). Moreover, an improvement in the resolution for SDX and SMX was achieved with this column, though separation was still not complete. Figure 5 shows a representative chromatogram obtained from a standard mixture (200 µg/L) of the antibiotics with both columns.

Once optimized, both methods were compared in terms of the quality parameters obtained injecting standard solutions and solvent-based blanks.

Method linearity was assessed by means of five-point calibration curves obtained with derivatized standard solutions at concentrations ranging from 40 to 800 µg/L for each compound.

Table 1. Typical Retention Times and Calibration Parameters for the Two Columns

compd	LiChrospher column				Kinetex column			
	t_R (min)	slope	intercept	r	t_R (min)	slope	intercept	r
SDZ	9.2	0.9281	-0.0443	0.9998	5.1	0.7993	-0.0010	0.9998
SDD	10.6	0.8822	-0.0440	0.9998	7.2	0.6161	-0.0002	0.9998
SMP	13.2	0.5294	-0.0286	0.9997	8.7	0.3563	-0.0008	0.9999
SCP	15.3	0.5761	-0.0297	0.9997	10.0	0.3773	-0.0006	0.9999
SDX	18.0	0.9256	-0.0481	0.9997	11.4	0.7505	-0.0023	0.9998
SMX	20.3	1.1401	-0.0565	0.9998	12.0	1.0240	-0.0039	0.9999
SDM	21.8	0.9327	-0.0459	0.9998	13.7	0.8207	-0.0040	0.9999
SQX	25.3	0.3499	-0.0204	0.9997	14.3	0.2648	-0.0059	1.0000

Linear regression analysis was carried out by plotting the ratio between the peak area of the analyte and of the internal standard versus their concentration ratio. Typical retention times (t_R) and calibration parameters for the two columns are presented in Table 1. The response obtained was linear in the tested range with correlation coefficients (r) higher than 0.9997 in all cases.

Precision was checked under repeatability conditions, where the experiments were carried out on the same day, and under intermediate reproducibility conditions, where the experiments were distributed over three different days. All experiments were conducted by the same technician using the same instrumentation. Five derivatized standard solutions at two concentration

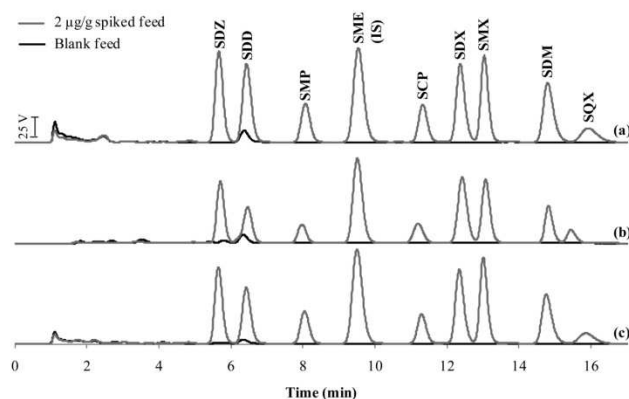


Figure 6. LC-FL chromatograms of blank and 2 µg/g spiked animal feed extracts: pig (a), laying hens (b) and rabbit (c).

Table 2. Recovery and Precision Studies with Feed Matrices

compound	LiChrospher column			Kinetex column		
	recovery ^d (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _R ^b (%)	recovery ^d (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _R ^{b,c} (%)
SDZ	99.3 (90.8–111.4)	3.1	4.1	99.4 (91.7–109.9)	3.2	3.2
SDD	77.7 (65.7–98.6)	4.3	5.2	87.3 (67.7–97.0)	4.1	4.8
SMP	72.7 (64.0–89.2)	5.1	6.5	81.1 (66.3–90.9)	5.4	5.9
SCP	73.2 (59.5–87.2)	5.5	6.6	78.6 (61.2–86.6)	5.6	6.3
SDX	96.1 (83.5–113.6)	6.5	7.4	98.0 (72.3–111.4)	5.9	6.5
SMX	82.0 (70.4–101.1)	5.7	8.4	85.8 (73.9–90.0)	5.8	7.3
SDM	79.2 (67.0–98.5)	4.0	5.0	88.5 (72.0–95.7)	4.3	4.5
SQX	84.8 (64.9–102.4)	3.3	4.9	93.1 (72.7–103.3)	3.4	3.3

feed	LiChrospher column			Kinetex column		
	recovery ^d (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _R ^b (%)	recovery ^d (%)	RSD _r ^b (%)	RSD _R ^{b,c} (%)
pig	92.6 (81.7–111.4)	4.6	5.6	96.6 (86.6–109.9)	4.6	5.5
piglet	81.3 (66.3–101.9)	5.3	6.9	80.2 (66.4–100.8)	4.9	
cow	75.3 (59.5–95.9)	4.8	5.7	75.7 (67.7–91.7)	5.9	
chicken	81.4 (64.0–113.6)	5.4	6.3	78.2 (61.2–103.8)	7.9	
laying hens	81.6 (65.9–107.5)	4.8	6.1	85.6 (70.7–111.4)	6.7	
rabbit	82.7 (68.6–103.5)	4.9	6.7	82.3 (70.7–96.9)	5.2	5.2

^a Mean value for each compound in all the feeds. ^b Pooled relative standard deviations. ^c For piglet, cow, chicken and laying hen feeds only a single-day experiment setup was applied with the Kinetex column. ^d Mean value for all the compounds in each feed.

levels (200 and 600 µg/L) were injected for this purpose. A one-way (day) analysis of variance (ANOVA) for a 95% confidence level was applied to obtain intercession (s_L), intrasession (s_r) and intralaboratory total standard deviations (s_R). The Kinetex method yielded better precision than the LiChrospher method, with repeatability (RSD_r) and intermediate reproducibility (RSD_R) values, expressed as relative standard deviation, about 1–2% vs 6–7% and 5–14% vs 11–14%, respectively, for all the sulfonamides.

Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) for the sulfonamides were determined on the basis of three and ten times, respectively, the standard deviation of the

baseline of 10 derivatized acetonitrile blanks using low-concentration standard solutions (from 0.2 to 4 µg/L). LODs for the Kinetex column were similar to those obtained with the conventional column (0.1 to 0.5 µg/L vs 0.1 to 0.3 µg/L), but LOQs were lower (0.2 to 0.7 µg/L vs 0.6 to 1.2 µg/L).

The increase in resolution, the shorter analysis time, resulting in reduced solvent consumption, and the better precision and sensitivity obtained demonstrate the advantages of the core-shell technology versus the conventional particle technology.

Method Validation. The in-house validation of the developed analytical methods requires the estimation of the parameters explained in detail in the paragraphs below.

Table 3. LOD and LOQ Values Determinated in Feed Matrices^a

	LiChrospher column		Kinetex column		LiChrospher column		Kinetex column	
	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
SDZ								
pig	0.3	1.1	0.5	1.8	0.01	0.05	0.02	0.07
piglet	0.6	2.0	0.4	1.4	0.02	0.08	0.02	0.06
cow	0.8	2.7	0.5	2.2	0.03	0.11	0.02	0.09
chicken	0.2	0.6	0.2	0.5	0.01	0.02	0.01	0.02
laying hens	0.4	1.5	0.3	0.9	0.02	0.06	0.01	0.04
rabbit	0.4	1.2	0.2	0.8	0.01	0.05	0.01	0.03
SMP								
pig	1.4	4.5	1.0	3.3	0.05	0.18	0.04	0.13
piglet	2.5	8.2	1.6	5.9	0.10	0.33	0.06	0.24
cow	0.8	2.6	0.5	1.7	0.03	0.10	0.02	0.07
chicken	3.0	10.1	2.2	7.3	0.12	0.40	0.09	0.29
laying hens	0.9	3.2	0.6	2.1	0.04	0.13	0.02	0.08
rabbit	1.8	6.1	1.3	4.5	0.07	0.24	0.05	0.18
SCP								
pig	1.2	4.1	0.2	0.7	0.05	0.16	0.01	0.03
piglet	5.7	18.9	2.6	8.5	0.23	0.76	0.10	0.34
cow	3.9	13.1	1.4	5.8	0.16	0.52	0.06	0.23
chicken	3.5	11.6	1.1	4.6	0.14	0.47	0.04	0.18
laying hens	1.6	5.3	0.4	3.2	0.06	0.21	0.02	0.13
rabbit	5.0	16.8	2.3	7.6	0.20	0.67	0.09	0.31
SDX								
pig	0.2	0.7	0.4	1.5	0.01	0.03	0.02	0.06
piglet	2.0	6.6	0.7	3.4	0.08	0.26	0.03	0.14
cow	0.7	2.4	0.2	1.1	0.03	0.10	0.01	0.04
chicken	1.0	3.4	0.6	1.9	0.04	0.14	0.02	0.08
laying hens	1.0	3.2	0.9	2.2	0.04	0.13	0.04	0.09
rabbit	0.6	2.1	0.2	0.7	0.03	0.08	0.01	0.03
SMX								
pig	0.4	1.4	0.1	0.3	0.02	0.06	0.01	0.03
piglet	2.3	7.8	0.9	4.2	0.09	0.31	0.04	0.17
cow	0.6	1.8	0.2	0.8	0.02	0.07	0.01	0.03
chicken	1.6	5.4	0.9	3.9	0.06	0.22	0.04	0.16
laying hens	0.9	2.9	0.6	1.2	0.04	0.12	0.02	0.05
rabbit	0.3	1.0	0.1	0.2	0.01	0.04	0.01	0.04
SDM								
pig	0.4	1.4	0.1	0.2	0.02	0.06	0.01	0.04
piglet	0.7	2.5	0.3	1.3	0.03	0.10	0.01	0.05
cow	0.7	2.3	0.2	0.9	0.03	0.09	0.01	0.04
chicken	1.2	4.1	0.7	1.9	0.05	0.16	0.03	0.08
laying hens	0.7	2.2	0.4	1.6	0.03	0.09	0.02	0.06
rabbit	0.3	1.1	0.3	1.0	0.01	0.04	0.01	0.04
SQX								
pig	4.3	14.5	1.7	5.5	0.17	0.58	0.07	0.22
piglet	3.0	10.2	0.9	4.4	0.12	0.41	0.04	0.18
cow	2.0	6.7	0.6	2.1	0.08	0.27	0.02	0.08
chicken	4.4	14.8	1.2	5.9	0.18	0.59	0.05	0.24
laying hens	2.6	8.6	0.7	3.5	0.10	0.34	0.03	0.14
rabbit	4.5	15.0	1.1	3.7	0.04	0.15	0.04	0.15

^a LOD is given by $(3S_{y/x})/b$ and LOQ by $(10S_{y/x})/b$ for each analyte, where $S_{y/x}$ corresponds to the standard deviation of the residuals and b is the slope of the calibration curve.

Linearity. Since external calibration using standard solutions prepared in pure solvent is proposed, the results reported for method linearity in the LC–FL Optimization section were also applicable here. Although matrix-matched calibration curves would have further compensated for discrepancies between different matrices, the variability of feed matrices and the difficulty of finding representative blank samples often make this practice unfeasible in the case of feed analysis, unless blank feed samples are available.

Specificity. Specificity was checked by testing samples of blank feeds produced for six different animal species. Only one peak, coeluting with SDD, was found in all feeds. Another peak, coeluting with SDZ, was also observed in the case of laying hen feed. Bearing in mind the magnitude of the interferences, SDZ and SDD could be quantified with an error $\leq 10\%$ in sample feeds containing concentrations of the target analytes over 0.5 and 1.5 $\mu\text{g/g}$, respectively. The absence of background peaks at the retention time of the remaining compounds showed that the method was free of endogenous matrix interferences for them. The chromatograms of blank and 2 $\mu\text{g/g}$ spiked pig, laying hen and rabbit feed samples are shown in Figure 6.

Trueness and Precision. Feed samples spiked at a carryover level of 2 $\mu\text{g/g}$ were analyzed during three different days. Repetitive application of the whole procedure to five independent spiked samples of each kind of feed was carried out each day. Data from this batch of experiments was used to evaluate the trueness and the precision of both methods in terms of repeatability (intraday precision) and intermediate reproducibility (interday precision). Results obtained are summarized in Table 2. In order to avoid the consignment of an excessive amount of data, the range and the average of the recoveries obtained for each compound in all feeds are given. Similarly, for each feed, the range and the average of the recoveries corresponding to all sulfonamides are also given. Concerning precision, the pooled standard deviations for compounds and for feeds are consigned. As can be observed, good precisions and recoveries, ranging from 59.5% to 113.6%, were obtained with both methods for all compound/matrix combinations. Intermediate reproducibility results were, as expected, higher than repeatability values. The lowest RSD_I and RSD_R corresponded to SDZ and SQX, and the highest to SDX and SMX, a consequence of the slight overlapping of their peaks in the chromatographic separation.

Sensitivity. Limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were assessed using matrix-matched calibration curves established at appropriate low concentration levels of the target analytes in feed. Extracts of blank samples of each type of feed were individually spiked prior to analysis with the sulfonamides at four increasing levels of concentrations, 1, 2, 5, and 10 $\mu\text{g/L}$, equivalent to 10, 20, 50, and 100 times the lowest instrumental LOD previously calculated using standard solutions. Based on these measurements, calibration curves for each compound were then used to calculate the LODs and LOQs. As shown in Table 3, limits in feed extracts were in all cases higher than the corresponding values in solvent because of matrix influence. Moreover, despite the extract dilution during the derivatization step, satisfactory LODs and LOQs were obtained in all cases, below 0.23 $\mu\text{g/g}$ and 0.76 $\mu\text{g/g}$ in feed respectively, which indicates that the developed methods are sensitive enough for their intended purpose. However, results again revealed a better performance of the new generation column against the conventional one.

Application to Real Feed Samples. Analysis of real feed samples was carried out in triplicate with the newly developed Kinetex method. The method was applied to four samples, one for piglets and three for pigs, which were obtained from production lines where medicated feeds with SDZ had been recently prepared. Results show that all samples tested contained SDZ concentrations in the 0.7–6.5 $\mu\text{g/g}$ range, demonstrating that the feed samples were affected by cross-contamination after the production of medicated formulations.

In conclusion, the two procedures developed provide precise, sensitive and accurate methods for multiresidue analysis of 8 sulfonamides in animal feeds. The simple and rapid extraction procedure by manual shaking with an ethyl acetate/ultrapure water mixture (99:1, v/v) gives high recoveries for all the target analytes, and no further cleanup step is necessary. The excellent sensitivity of the fluorescence detection allows SAs to be quantified, with a previous derivatization, at the required concentration levels and makes it an inexpensive and applicable alternative to MS based methods for routine laboratories. Moreover, using the recently available Kinetex C_{18} column instead of a conventional C_{18} column reduces analysis time and improves resolution and precision. The limits of detection and quantification are also greatly improved. Based on the method performance characteristics, this new validated analytical methodology is considered to be suitable for the determination of SAs in drug-free animal feeds that have been contaminated during the fabrication process. Finally, the application of the proposed method to test samples demonstrates its usefulness to evaluate possible cross-contaminations in the feed mill laboratories and, thus, ensure safety in the first stage of the food chain.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34 934039119. Fax: +34 934021233. E-mail: compano@ub.edu.

Funding Sources

Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Project Number AGL2008-05578-C05-03) is gratefully acknowledged. S.B. also thanks the Generalitat de Catalunya for a FI grant (Grant Number 2010FI-B 00714).

■ ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge the Associació Catalana de Fabricants de Pinsos (ASFAC) for providing feed samples.

■ REFERENCES

- (1) Samanidou, V. F.; Tolika, E. P.; Papadoyannis, I. N. Chromatographic residue analysis of sulfonamides in foodstuffs of animal origin. *Sep. Purif. Rev.* **2008**, *37* (4), 325–371.
- (2) Vincent, U.; Chedin, M.; Yasar, S.; von Holst, C. Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Part I. Application to targeted feed. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47* (4–5), 750–757.
- (3) Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; Leepipatpiboon, N. Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1149* (1), 102–111.
- (4) González de la Huebra, M. J.; Vincent, U.; von Holst, C. Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolide antibiotics in animal feedingstuffs by liquid chromatography with

- electrochemical detection (HPLC-ECD). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, *43* (5), 1628–1637.
- (5) Wang, L.; Yang, H.; Zhang, C.; Mo, Y.; Lu, X. Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *619* (1), 54–58.
- (6) Regulation (EC) No. 1831/2003 on additives for use in animal nutrition. *Off. J. Eur. Union* **2003**, *L 268*, 29–43.
- (7) Council Directive 90/167/EC laying down the conditions governing the preparation, placing on the market and use of medicated feedingstuffs in the Community. *Off. J. Eur. Union* **1990**, *L 92*, 42–48.
- (8) McEvoy, J. D. G. Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *473* (1–2), 3–26.
- (9) Kan, C. A.; Meijer, G. A. L. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *133* (1–2), 84–108.
- (10) Raich-Montiu, J.; Folch, J.; Compañó, R.; Granados, M.; Prat, M. D. Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1172* (2), 186–193.
- (11) Kantiani, L.; Farré, M.; Freixiedas, J. M. G. i.; Barceló, D. Development and validation of a pressurized liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for β -lactams and sulfonamides in animal feed. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217* (26), 4247–4254.
- (12) Zou, Q.-H.; Xie, M.-X.; Wang, X.-F.; Liu, Y.; Wang, J.; Song, J.; Gao, H.; Han, J. Determination of sulphonamides in animal tissues by high performance liquid chromatography with pre-column derivatization of 9-fluorenylmethyl chloroformate. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30* (16), 2647–2655.
- (13) Li, T.; Shi, Z.-G.; Zheng, M.-M.; Feng, Y.-Q. Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1205* (1–2), 163–170.
- (14) Chico, J.; Rúbies, A.; Centrich, F.; Companyó, R.; Prat, M. D.; Granados, M. High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1213* (2), 189–199.
- (15) Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Widmer, M. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1194* (1), 66–79.
- (16) Posyniak, A.; Zmudzki, J.; Mitrowska, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *J. Chromatogr., A* **2005**, *1087* (1–2), 259–264.
- (17) Aguilera-Luiz, M. M.; Vidal, J. L. M.; Romero-González, R.; Frenich, A. G. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2008**, *1205* (1–2), 10–16.
- (18) Gamba, V.; Terzano, C.; Fioroni, L.; Moretti, S.; Dusi, G.; Galarini, R. Development and validation of a confirmatory method for the determination of sulfonamides in milk by liquid chromatography with diode array detection. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *637* (1–2), 18–23.
- (19) Wu, Y.-L.; Li, C.; Liu, Y.-J.; Shen, J.-Z. Validation method for the determination of sulfonamide residues in bovine milk by HPLC. *Chromatographia* **2007**, *66*, 191–195.
- (20) Samanidou, V. F.; Tolika, E. P.; Papadoyannis, I. N. Development and validation of an HPLC confirmatory method for the residue analysis of four sulfonamides in cow's milk according to the European Union Decision 2002/657/EC. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2008**, *31* (9), 1358–1372.
- (21) Fang, G.-Z.; He, J.-X.; Wang, S. Multiwalled carbon nanotubes as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of 10 sulfonamides in eggs and pork. *J. Chromatogr., A* **2006**, *1127* (1–2), 12–17.
- (22) Jiménez, V.; Rúbies, A.; Centrich, F.; Companyó, R.; Guiteras, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2011**, *1218*, 1443–1451.
- (23) Sheridan, R.; Policastro, B.; Thomas, S.; Rice, D. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56* (10), 3509–3516.
- (24) Maudens, K. E.; Zhang, G.-F.; Lambert, W. E. Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1047* (1), 85–92.
- (25) Jiménez, V.; Companyó, R.; Guiteras, J. Preparation of quality control materials for the determination of sulfonamides in animal feed. *Food Addit. Contam.* **2009**, *26* (7), 969–977.
- (26) Jiménez, V.; Adrian, J.; Guiteras, J.; Marco, M.-P.; Companyó, R. Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting sulfonamides in feed resources. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (13), 7526–7531.
- (27) Smallidge, R. L.; Albert, K.; Britton, N. L.; Campbell, H. M.; Jeon, C.-S.; Costello, S.; Elson, K.; Flood, K.; Lee, J.-K.; Lowie, D. M.; Moran, J. W.; Mustafa, M.; Poe, B.; Proksa, P.; Turner, J. M.; Weigand, J. L.; Wetzler, L. M. Determination of sulfamethazine in swine and cattle feed by reversed-phase liquid chromatography with post-column derivatization. Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2000**, *83* (2), 260–268.
- (28) Spinks, C. A.; Schut, C. G.; Wyatt, G. M.; Morgan, C. M. R. A. Development of an ELISA for sulfa-chloropyridazine and investigation of matrix effects from different sample extraction procedures. *Food Addit. Contam.* **2001**, *18* (1), 11–18.
- (29) Injac, R.; Mlinaric, A.; Djorjevic-Milic, V.; Karljukovic-Rajic, K.; Strukelj, B. Optimal conditions for determination of zinc bacitracin, polymyxin B, oxytetracycline and sulfacetamide in animal feed by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Food Addit. Contam.* **2008**, *25* (4), 424–431.
- (30) Kantiani, L.; Farré, M.; Grases i Freixiedas, J.; Barceló, D. Determination of antibacterials in animal feed by pressurized liquid extraction followed by online purification and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (3), 1195–1205.
- (31) Boscher, A.; Guignard, C.; Pellet, T.; Hoffmann, L.; Bohn, T. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217* (41), 6394–6404.
- (32) Cronly, M.; Behan, P.; Foley, B.; Malone, E.; Earley, S.; Gallagher, M.; Shearan, P.; Regan, L. Development and validation of a rapid multi-class method for the confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53* (4), 929–938.
- (33) Gritti, F.; Leonardi, I.; Shock, D.; Stevenson, P.; Shalliker, A.; Guiochon, G. Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217* (10), 1589–1603.
- (34) Gritti, F.; Guiochon, G. Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C18 particles in gradient elution chromatography. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217* (10), 1604–1615.
- (35) Jiménez, V.; Companyó, R.; Guiteras, J. Preparation of quality control materials for the determination of sulfonamides in animal feed. *Food Addit. Contam.* **2009**, *26* (7), 969–977.
- (36) Gehring, T. A.; Rushing, L. G.; Thompson, H. C. Liquid chromatographic determination of sulfadiazine in salmon by post-column derivatization and fluorescence detection. *J. AOAC Int.* **1995**, *78* (5), 1161–1164.
- (37) Kinetex Scaling Calculator. <http://www.phenomenex.com>.

3.2.2. Publicació III. Analysis of fluoroquinolones in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection

2048

J. Sep. Sci. 2012, 35, 2048–2053

Sílvia Borràs
Juan-Gabriel
Ríos-Kristjánsson
Ramon Companyó
Maria-Dolors Prat

Departament de Química
Analítica, Universitat de
Barcelona, Barcelona, Spain

Received March 20, 2012
Revised May 2, 2012
Accepted May 3, 2012

Research Article

Analysis of fluoroquinolones in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection

An analytical method for the analysis of six fluoroquinolones (FQs) in animal feeds was developed. The sample treatment consists of a simple and rapid extraction of the analytes by manual shaking with an acetonitrile-water mixture containing hydrochloric acid without further sample cleanup. Matrix effects were minimized by diluting the extract with water. Determination was carried out by liquid chromatography using fluorimetric detection. The method was validated in-house in four different feed matrices (poultry, cow, pig, and lamb feed). Mean recoveries ranging from 80 to 105%, with relative standard deviations below 12%, were achieved from spiked animal feed samples on the 0.2–2.0 $\mu\text{g/g}$ level. No relevant differences were observed between the studied feeds, this ensuring that the method was reliable for a wide variety of feed matrices. Decision limit and detection capability values are below 0.08 and 0.13 mg/kg , respectively, for most FQs. The results obtained demonstrate the feasibility of the analytical method developed for a routine use to control the illegal use of these substances in feeding stuffs.

Keywords: Animal feed / Fluorescence detection / Fluoroquinolones / Liquid chromatography
DOI 10.1002/jssc.201200302

1 Introduction

Antimicrobial agents are widely used in veterinary medicine to treat or prevent an extensive range of infectious diseases and in this context, the use of medicated feeds plays a crucial role. As established in the Directive 90/167/EC [1], in the European Union, medicated feeds, which contain active principles at therapeutic levels, may only be manufactured under veterinary prescription from authorized premises.

Nonmedicated feed must be free from antimicrobial agents. Their use as feed additives, at subtherapeutic levels to improve growth rate and feed efficiency, was banned by Regulation (EC) 1831/2003 [2] from January 2006. However, their fraudulent use as growth promoters must be considered. Animal feed may also contain antimicrobials as a result of cross-contamination, which takes place from one

medicated feed batch to a nonmedicated one during manufacturing, transport, or even at the farm. Since an inevitable side effect of the use of antimicrobials for public health is the emergence and spread of bacterial resistance, the importance of a steady monitoring of feeds contamination is clearly necessary. Thus, the development of sensitive and reliable analytical methodology is required.

Fluoroquinolones (FQs) are broad-spectrum synthetic antimicrobials broadly administered for the treatment of urinary, respiratory, and gastrointestinal tract infections in both human and food producing animals. Among FQs, enrofloxacin (ENR) is the most frequently used in livestock production. A large number of analytical methods, for either screening or confirmatory purposes, have been developed for the analysis of FQ residues in edible products [3–15], but studies devoted to their determination in feed samples are still scarce.

A compilation of all the methods reported in the last decade for the analysis of FQs in animal feed has been summarized in a recent review [16]. Up to now, only one more paper has been published on this field [17]. Most of the developed methods are based on liquid chromatography (LC) with ultraviolet (UV), fluorimetric (FL) [18, 19] or more recently mass spectrometry (MS) [17, 20] detection. Other approaches include enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) for screening purposes [21]. LC coupled with tandem mass spectrometry (MS/MS) detection permits the quantification and the confirmation of the analytes, but requires expensive instrumentation, which is not widely available in routine laboratories.

Correspondence: Professor Maria-Dolors Prat, Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, C/ Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain
E-mail: mdprat@ub.edu
Fax: +34-934021233

Abbreviations: ACN, acetonitrile; CIP, ciprofloxacin; DAN, danofloxacin; DIF, difloxacin; ENR, enrofloxacin; FL, fluorescence; FO, fluoroquinolone; HLB, hydrophilic-lipophilic balance; MAE, microwave-assisted extraction; MAR, marbofloxacin; MeOH, methanol; PLE, pressurized liquid extraction; PSA, primary secondary amine; PVC, polyvinylchloride; SAR, sarafloxacin; UHPLC, ultra-high-pressure liquid chromatography

For the FQs extraction from feed, different phosphoric, or McIlvaine buffers as well as ACN/MeOH: buffers mixtures combined with mechanical shaking or ultrasonic techniques are proposed. However, other methodologies such as pressurized liquid extraction (PLE) [18] or microwave-assisted extraction (MAE) [17] are also applied. All current methods involve a clean-up step, which is, in all cases, performed by solid-phase extraction (SPE), either with reversed-phase cartridges (polymeric Oasis[®] HLB or C₁₈) or dispersive sorbents (PSA).

In this paper, a method for a simultaneous analysis of six FQs in animal feeds is described and validated. To ensure that the method is reliable with a wide variety of matrices, four different kinds of feeds were investigated. The method involves a simple extraction by manual shaking with an acetonitrile:aqueous solution mixture with a subsequent determination by liquid chromatography with fluorescence detection. The developed extraction procedure provides good recovery rates and extracts with less coextracted matrix components than other methods using more exhaustive extraction techniques. This fact, together with the excellent FL sensitivity, allows the FQs determination by simply diluting the extracts before injection without any clean-up step. The LC separation was performed on a Kinetex core-shell particle C₁₈ column, which has proved to be very effective to reduce the analysis time [10, 22, 23].

2 Experimental

2.1 Instrumentation

Chromatographic analysis was performed in an Agilent 1100 system (Palo Alto, CA, USA), consisting of a quaternary pump, an automatic injector and a fluorimetric detector HP 1100. Agilent ChemStation for LC systems was used for instrument control and data processing. The analytical column was a Kinetex C₁₈ (150 × 4.6 mm, 2.6 μm), equipped with a guard cartridge system KJ0-4282 (4 × 2 mm), both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The column was thermostated at 25°C.

The pH was measured using a Crison GLP21 pH-meter (Alella, Spain), equipped with a Crison 52-02 Ag/AgCl combined glass electrode.

Other instruments used in the sample preparation were a RollerMix D RM120-DE Ovan (Badalona, Spain) for the homogenization of spiked feed, a Rotary Mixer 34526 (Breda Scientific, Breda, the Netherlands) for mechanical shaking and a Heraeus Christ Labofuge 400 centrifuge (Osterode am Harz, Germany).

2.2 Chemicals and solutions

Ciprofloxacin (CIP), danofloxacin (DAN), difloxacin hydrochloride (DIF) enrofloxacin (ENR), marbofloxacin (MAR), and sarafloxacin hydrochloride trihydrate (SAR), vetranal[™] grade, were purchased from Fluka (Buchs, Switzerland). Ace-

tonitrile (ACN) HPLC gradient grade from Panreac (Castellar del Vallès, Spain) and doubly deionized water (Milli-Q, Millipore, Molsheim, France) of 18.2 MΩ/cm resistivity were used throughout. All other reagents were of analytical reagent grade.

Individual stock standard solutions (200 mg/L) of all FQs were prepared by dissolving the compounds in 0.01 mol/L nitric acid. These solutions were kept at 4°C in dark glass bottles and were stable for up to six months. A mixed working solution (containing all FQs) at a concentration of 20 mg/L was prepared weekly by dilution of the individual stock solutions with a 0.01 mol/L oxalic acid buffer at pH 4.0. Calibration standards with variable concentrations were prepared daily by dilution of the working solution with 0.01 mol/L oxalic acid buffer at pH 4.0.

2.3 Samples

Blank samples of four different quinolone-free feeds for poultry, pigs, cows, and lambs were provided by the Laboratori Agroalimentari de la Generalitat de Catalunya and the Associació Catalana de Fabricants de Pinsos (ASFAC). On arrival, they were stored at 4°C in polyvinylchloride (PVC) flasks and pelleted samples were ground. The absence of the target antibiotics was verified prior to usage.

Initially, a material containing 200 mg/kg of the six FQs was prepared by adding 0.02 g of each solid FQ to 100 g of blank poultry feed. The mixture was placed in a PVC flask containing ceramic balls and rolled on a rolling table for at least 90 h. After homogenization, 10 g were diluted with 100 g of each kind of blank feed (poultry, pig, cow, and lamb) to obtain samples at the 20 mg/kg level. Homogenization was performed as described previously.

For accuracy studies, samples spiked at 2.0, 0.5, and 0.2 mg/kg were prepared by a further dilution of the 20 mg/kg poultry feed with a suitable amount of each kind of blank feed. Three composite samples, consisting of a blank feed and two spiked ones at 0.05 and 2 mg/kg, were also prepared to determine the decision limit (CC_α) and the detection capability (CC_β) values. Composite blank feed was prepared by mixing 20 g of each blank material. Composite spiked feed at 0.05 mg/kg was prepared by adding 20 g of each blank feeds (pig, cow, and lamb), to 20 g of the poultry feed spiked at 0.2 mg/kg. Composite spiked feed at 2.0 mg/kg was prepared by mixing equal amounts of the four kind of feeds spiked at this level. After homogenization, spiked feeds were stored at 4°C. Prior to the analysis, the samples were allowed to reach room temperature.

2.4 Procedures

2.4.1 Extraction

Feed sample (1 g) was weighted in a 25-mL centrifuge tube and extracted, by manual shaking for 2 min, with 10 mL of

2050 S. Borràs et al.

an extraction solution consisting of 0.05 mol/L hydrochloric acid/acetonitrile (1:1). The mixture was centrifuged at 1400 g for 10 min. A 1-mL aliquot of the extract was then transferred to a 5-mL volumetric flask and diluted with 0.01 mol/L oxalic acid buffer at pH 4.0. Finally, it was filtered through a 0.45- μ m nylon membrane filter and injected into the LC-FL system.

2.4.2 Determination by liquid chromatography with fluorescence detection

The separation was performed using a binary gradient elution adapted from a previously reported method [24]. Mobile phase A was an aqueous solution of 0.01 mol/L oxalic acid buffer at pH 4.0 and mobile phase B was acetonitrile. The elution profile was as follows: mobile phase A for 8 min, linear gradient elution from 12 to 30% ACN in 4 min, back to 12% ACN in 2 min and a posttime of 2 min to return to initial conditions. The mobile phase flow rate was set at 1.2 mL/min and the separation was carried out at 25°C. The fluorescence detector was set to a multistep detection mode and the selected excitation/emission wavelengths were: 297/507 nm up to minute 5.5 (for MAR) and 280/450 nm from minute 5.5 to minute 16 (for CIP, DAN, ENR, SAR, and DIF). Quantification was performed by external calibration curves in oxalic acid buffer at pH 4.0.

3 Results and discussion

3.1 Extraction

The sample treatment procedure was kept as simple as possible and consists of an extraction of the analytes from the matrix without a further clean-up step. The extract was five-fold diluted and directly injected into the LC-FL system. For the selection of the extraction solvent, several ACN/water mixtures at different pH values were tested. A poultry feed spiked at 2.0 mg/kg with the six FQs was used in this study. As can be seen in Fig. 1, the results obtained indicated that acid mixtures gave higher recovery rates than neutral or ba-

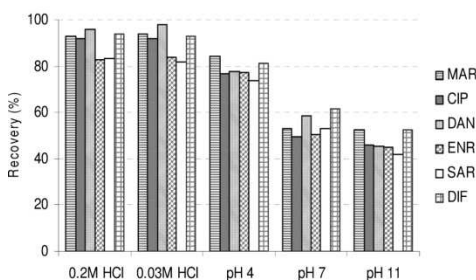


Figure 1. Recoveries obtained from poultry feed spiked with 2.0 mg/kg of each FQ using ACN/aqueous solution at different pH values ($n = 2$).

J. Sep. Sci. 2012, 35, 2048–2053

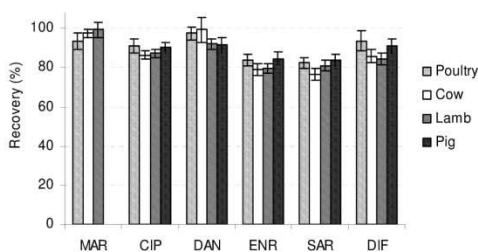


Figure 2. Recoveries obtained from different animal feeds spiked with 2.0 mg/kg of each FQ ($n = 6$).

sic mixtures. Furthermore, the best extraction was achieved with mixtures containing hydrochloric acid (HCl). The effect of ACN/water ratio on the extraction efficiency was not critical in the range 40–85% ACN, and the selected solvent was 0.05 M HCl/ACN (1:1). The effect of the volume of the extracting solution was also assessed and it was observed that increasing the volume from 5 to 10 mL had a noticeable effect on the recovery of the analytes, whereas no improvement was observed at higher volumes. Manual shaking for 2 min was selected as most appropriate for the extraction, as no significant differences were observed in the range 1–30 min. With the selected conditions, the recovery rates are higher than 80% for all of the compounds, being ENR and SAR the less recovered FQs.

The possible dependence of the recovery rates on the kind of feed was also investigated. Figure 2 shows the results obtained from the four feeds spiked with FQs at the 2.0 mg/kg level. As can be seen, no relevant differences were found between recoveries from the different feeds. Regarding individual FQ, although good recovery rates were obtained for all of them, some differences were observed. Mean recovery rates are higher than 95% for MAR and DAN, 90.3% for DIF, 89% for CIP, 83.2% for ENR and 82.1% for SAR. Since extraction recoveries can be considered independent on the feed, these mean recoveries may be used to correct the measured concentrations obtained on analyzing feed samples.

3.2 Determination by liquid chromatography with fluorescence detection

The chromatographic analyses were based on a previously reported LC-FL methodology for the determination of quinolones in water [24]. In the aforementioned method, a C₈ silica-based reversed-phase column was used. In order to improve the analysis performance, a Kinetex core-shell particle C₁₈ column (150 mm \times 4.6 mm, 2.6- μ m particle size) was used in the current study. This column can be operated with conventional liquid chromatography (LC) systems and can give results similar to those from columns packed with sub-2- μ m particles used in ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) instruments. The mobile phase was the same as with the other previously used column, with a

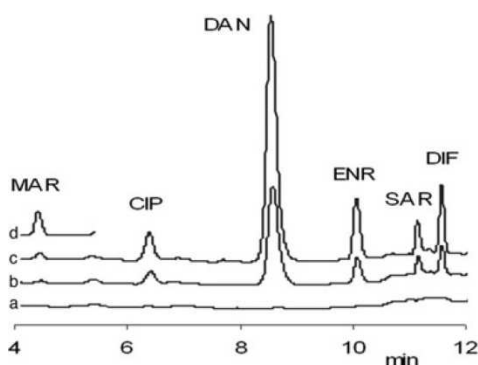


Figure 3. LC-FL chromatograms from extracts of poultry feed spiked with the six FQs at several concentrations: nonspiked (a), 0.2 mg/kg (b), 0.5 mg/kg (c), and 2.0 mg/kg (d).

slight modification in the elution gradient program. A good separation of the six FQs was obtained in a chromatographic run of 16 min, resulting in a considerable reduction in solvent consumption and time, 23 mL and 19 min per sample, respectively.

The matrix effect in the chromatographic response was studied. The peak areas obtained from FQs standard solutions in pure solvent did not significantly differ from those in the chromatograms obtained by addition of the analytes to blank feed extracts (matrix-matched standards), which indicates that external standards in pure solvent can be used for calibration. This represents a great advantage as the variability of feed matrices and the difficulty of finding representative blank samples make the use of matrix-matched calibration curves almost unfeasible in this field.

Moreover, the high sensitivity of the LC-FL method makes possible a dilution of the extracts before injection in the chromatographic system. This avoids a clean-up step, which would have lengthened the sample treatment and increased its cost. Figure 3 shows the chromatograms obtained from the diluted extracts of the poultry feed samples.

3.3 Method validation

The method was validated in the four spiked feeds under study (poultry, pig, cow, and lamb). The validation parameters used for evaluation were trueness, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), specificity, linear range, and quantification limits.

The specificity was assessed by analyzing blank feed samples to verify the absence of any signal from endogenous substances and matrix constituents at the retention times of the target compounds. Figure 4 shows the chromatograms of the four blank feed extracts and of a standard solution of the analytes. As can be observed, the diluted extracts could be directly analyzed by LC-FL, since the chromatograms thus

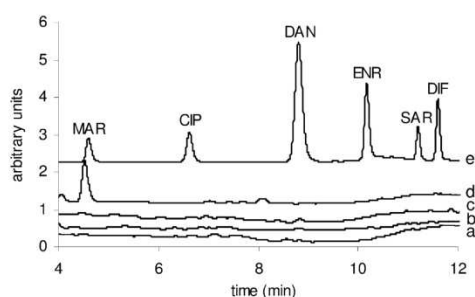


Figure 4. LC-FL chromatograms of a standard mixture of FQs and of blank extracts of different animal feeds: lamb feed (a), poultry feed (b), cow feed (c), pig feed (d), standard mixture containing 40 $\mu\text{g/L}$ of MAR, 10 $\mu\text{g/L}$ of CIP, ENR, SAR, and DIF, and 5 $\mu\text{g/L}$ of DAN (e).

obtained were quite clean and did not demonstrate any important matrix interference, with the exception for MAR in the pig feed, where a matrix peak coeluting closely to this compound prevents its determination at the studied levels.

Linearity was tested by external calibration curves for each compound using standard solutions in the 2–80 $\mu\text{g/L}$ range. The calibration parameters showed good linearity: correlation coefficients were $r > 0.999$ for all the analytes, while residuals were $<10\%$ in the lowest level and $<5\%$ in higher concentration range.

Trueness and precision (repeatability and within-laboratory reproducibility) were studied at three different levels (2.0, 0.5, and 0.2 mg/kg). They were determined by processing independently 18 spiked samples, for each type of feed, at the three different levels in three days (six samples per day, level and matrix). Results from these studies are summarized in Table 1. Repeatability is expressed as the average relative standard deviation (RSD_r) of the concentration obtained from each analyte from every replicate analysis during the same day, while within-laboratory reproducibility was determined in the same way (RSD_R) but during three different sessions. Mean found concentrations were calculated from the measured concentrations of all three days. No recovery corrections were applied for MAR, CIP, DAN, and DIF, whereas data for ENR and SAR were corrected by the corresponding recovery rates, 0.83 and 0.81, respectively. As can be seen, good precisions and accuracies were obtained for all compound/matrix combinations. Errors, expressed as the difference between the mean found and the nominal concentration (%), were below 10% for almost all compounds at all concentration levels. Values of the within-laboratory coefficient of variation were much lower than those calculated by the Horwitz equation.

The decision limit (CC α) for each FQ depended on the feed. To obtain CC α values that may provide an average information representative of the different feeds studied, a blank composite feed sample (Section 2.3) was used. CC α values, calculated from three times the signal-to-noise ratio of this

Table 1. Trueness and precision

	Nominal conc. ($\mu\text{g/g}$)	Mean conc. ($\mu\text{g/g}$)	Error (%)	Repeat. (%)	Reprod. (%) ^{a)}
Poultry feed					
MAR	2.0	1.870	6.5	3.1	4.9
	0.50	0.484	3.2	5.4	8.9
CIP	2.0	1.820	9.1	3.6	3.6
	0.50	0.468	6.3	4.5	5.5
	0.20	0.191	4.5	4.1	9.7
DAN	2.0	1.947	2.6	2.5	3.4
	0.50	0.484	3.4	2.9	4.5
	0.20	0.207	3.6	7.5	8.7
ENR	2.0	2.024 ^{b)}	1.2	3.9	3.8
	0.50	0.513 ^{b)}	2.6	4.9	6.6
	0.20	0.206 ^{b)}	3.2	7.6	8.3
SAR	2.0	2.007 ^{b)}	0.3	3.5	3.6
	0.50	0.493 ^{b)}	1.5	3.8	3.9
	0.20	0.195 ^{b)}	2.7	7.3	11.5
DIF	2.0	0.187	6.5	4.9	5.5
	0.50	0.451	9.7	4.3	6.7
	0.20	0.183	8.7	7.1	10.7
Pig feed					
CIP	2.0	1.821	8.9	1.8	2.7
	0.50	0.448	10.3	3.8	5.5
	0.20	0.197	1.7	7.2	8.9
DAN	2.0	1.827	8.5	3.6	4.4
	0.50	0.457	8.7	2.9	3.9
	0.20	0.185	7.4	5.3	11.2
ENR	2.0	2.025 ^{b)}	1.2	3.6	3.8
	0.50	0.488 ^{b)}	2.4	3.9	4.3
	0.20	0.204 ^{b)}	1.9	6.1	7.2
SAR	2.0	2.048 ^{b)}	2.4	2.1	3.4
	0.50	0.545 ^{b)}	9.1	2.5	3.8
	0.20	0.238 ^{b)}	18.8	5.3	7.3
DIF	2.0	1.820	9.0	4.0	4.1
	0.50	0.452	9.6	4.3	4.7
	0.20	0.199	0.3	4.7	6.5
Cow feed					
MAR	2.0	1.948	2.6	2.9	3.0
	0.50	0.519	3.8	3.8	4.3
CIP	2.0	1.819	9.0	2.2	2.5
	0.50	0.449	10.2	3.8	5.6
	0.20	0.181	9.5	6.1	10.5
DAN	2.0	1.954	2.3	3.8	8.4
	0.50	0.526	5.2	7.2	9.1
	0.20	0.219	9.4	4.9	10.9
ENR	2.0	1.928 ^{b)}	3.5	2.3	3.4
	0.50	0.485 ^{b)}	3.0	3.9	4.7
	0.20	0.193 ^{b)}	3.4	6.0	6.6
SAR	2.0	1.915 ^{b)}	4.3	2.3	3.8
	0.50	0.470 ^{b)}	6.0	4.2	5.1
	0.20	0.200 ^{b)}	0.2	5.2	9.8
DIF	2.0	1.793	10.3	3.9	3.5
	0.50	0.479	41	3.7	4.1
	0.20	0.219	9.7	8.3	9.5
Lamb feed					
MAR	2.0	1.986	0.7	2.1	4.2
	0.50	0.541	8.1	3.0	5.1

Table 1. Continued

	Nominal conc. ($\mu\text{g/g}$)	Mean conc. ($\mu\text{g/g}$)	Error (%)	Repeat. (%)	Reprod. (%) ^{a)}
CIP	2.0	1.758	12.1	2.4	2.8
	0.50	0.442	11.5	3.6	3.6
	0.20	0.191	4.6	6.7	7.7
DAN	2.0	1.962	1.9	1.7	3.1
	0.50	0.505	1.4	3.5	6.3
	0.20	0.209	4.4	5.8	10.9
ENR	2.0	1.902 ^{b)}	4.9	2.0	8.7
	0.50	0.490 ^{b)}	1.9	4.1	4.8
	0.20	0.216 ^{b)}	8.0	2.0	2.9
SAR	2.0	1.940 ^{b)}	3.0	2.4	3.8
	0.50	0.467 ^{b)}	6.6	5.4	6.6
	0.20	0.187 ^{b)}	6.5	3.7	10.5
DIF	2.0	1.808	9.6	3.4	4.9
	0.50	0.494	1.2	7.2	7.8
	0.20	0.223	10.4	6.2	8.6

a) $n = 18$, in three different days.

b) Corrected by extraction recovery rate.

sample [25], were 1.4 mg/kg for MAR, 0.07 mg/kg for CIP, 0.01 mg/kg for DAN, 0.04 mg/kg for ENR, 0.08 mg/kg for SAR, and 0.03 mg/kg for DIF. The detection capability (CCB) was calculated as the decision limit plus 1.64 times the corresponding standard deviations when analyzing ($n = 18$), the composite spiked feed at 0.05 mg/kg (or 2.0 mg/kg for MAR). The estimated CCB values were 1.6 mg/kg for MAR, 0.12 mg/kg for CIP, 0.06 mg/kg for DAN, 0.08 mg/kg for ENR, 0.13 mg/kg for SAR, and 0.08 mg/kg for DIF.

4 Concluding remarks

The procedure developed provides a precise, sensitive, and accurate method for the analysis of FQs in animal feed. The extraction procedure gives high recoveries for all the target analytes. Dilution of the extracts before injection in the chromatographic system proves to be sufficient to avoid matrix effects. Thus, no cleanup is required, making the method fast and simple. The absence of matrix effects on peak areas allows the use of standards in pure solvent as calibrants. The validation results, obtained from four different kinds of feeds, ensure that the method is reliable with a wide variety of feed matrices and indicate that it is suitable for the routine analysis of low levels of nonauthorized FQs in animal feeds samples.

Financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Project Number AGL2008-05578-C05-03) is gratefully acknowledged. The authors acknowledge the Laboratori Agroalimentari of the Generalitat de Catalunya and the Associació Catalana de Fabricants de Pinsos (ASFAC) for providing feed samples. S. Borràs also thanks the Generalitat de Catalunya for an FI grant (Grant Number 2010FI_B 00714).

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Council Directive 90/167/EC, *Off. J. Eur. Union* 1990, L 92, 42.
- [2] Regulation (EC) No 1831/2003, *Off. J. Eur. Union* 2003, L 268, 29.
- [3] Hernández-Arteseros, J. A., Barbosa, J., Compañó, R., Prat, M. D., *J. Chromatogr. A* 2002, 945, 1–24.
- [4] Andreu, V., Blasco, C., Picó, Y., *Trends Anal. Chem.* 2007, 26, 534–556.
- [5] Carretero, V., Blasco, C., Picó, Y., *J. Chromatogr. A* 2008, 1209, 162–173.
- [6] Li, Y. L., Hao, X. L., Ji, B. Q., Xu, C. L., Chen, W., Shen, C. Y., Ding, T., *Food Addit. Contam., Part A* 2009, 26, 306–313.
- [7] Zhang, H., Chen, S., Lu, Y., Dai, Z., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1959–1967.
- [8] Cho, H.-J., Yi, H., Cho, S. M., Lee, D. G., Cho, K., Abd El-Aty, A. M., Shim, J.-H., Lee, S.-H., Jeong, J.-Y., Shin, H.-C., *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1034–1043.
- [9] Rodríguez, E., Moreno-Bondi, M. C., Marazuela, M. D., *Food Chem.* 2011, 127, 1354–1360.
- [10] Jiménez, V., Companyó, R., Guiteras, J., *Talanta* 2011, 85, 596–606.
- [11] Chico, J., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R., Prat, M. D., Granados, M., *J. Chromatogr. A* 2008, 1213, 189–199.
- [12] Granelli, K., Elgerud, C., Lundström, A., Ohlsson, A., Sjöberg, P., *Anal. Chim. Acta* 2009, 637, 87–91.
- [13] Bohm, D. A., Stachel, C. S., Gowik, P., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 8217–8223.
- [14] Garrido Frenich, A., Aguilera-Luiz, M. d. M., Martínez Vidal, J. L., Romero-González, R., *Anal. Chim. Acta* 2010, 661, 150–160.
- [15] Jiménez, V., Rúbies, A., Centrich, F., Companyó, R., Guiteras, J., *J. Chromatogr. A* 2011, 1218, 1443–1451.
- [16] Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A. M., Brufau, J., Medina, M., Bosch, J., *Trends Anal. Chem.* 2011, 30, 1042–1064.
- [17] Xu, H., Wang, T., Zhao, Q., Zeng, Q., Wang, H., Xu, Y., Zhang, X., Wang, F., Ding, L., *Chromatographia* 2011, 74, 267–274.
- [18] Pecorelli, I., Galarini, R., Bibi, R., Floridi, A., Casciarri, E., Floridi, A., *Anal. Chim. Acta* 2003, 483, 81–89.
- [19] Galarini, R., Fioroni, L., Angelucci, F., Tovo, G. R., Cristofani, E., *J. Chromatogr. A* 2009, 1216, 8158–8164.
- [20] Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., Bohn, T., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 6394–6404.
- [21] Scortichini, G., Annunziata, L., Di Girolamo, V., Burratti, R., Galarini, R., *Anal. Chim. Acta* 2009, 637, 273–278.
- [22] Borràs, S., Companyó, R., Guiteras, J., *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 5240–5247.
- [23] Tylová, T., Kamenik, Z., Flieger, M., Olšovská, J., *Chromatographia* 2011, 74, 19–27.
- [24] Prat, M. D., Benito, J., Compañó, R., Hernández-Arteseros, J. A., Granados, M., *J. Chromatogr. A* 2004, 1041, 27–33.
- [25] Commission Decision 2002/657/EC, *Off. J. Eur. Union* 2002, L 221, 8.

3.2.3. Discussió dels resultats

3.2.3.1. Dopatge de les mostres de pinso

Atesa l'absència de CRM disponibles que continguin els compostos d'interès en la matriu d'estudi, en comptes de la veracitat s'ha avaluat la recuperació dels anàlits. En ambdós casos, la preparació de les mostres dopades s'ha basat en un procediment prèviament establert en el grup de recerca per a la preparació d'un material per al control de qualitat consistent en un pinso per a porcs dopat amb dues sulfamides (SDZ i SDD) [114]. Així doncs, a diferència de la resta de mètodes reportats per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos, en que les mostres es dopen amb dissolucions patró dels anàlits, el dopatge s'ha dut a terme a partir de l'addició directa de quantitats conegudes dels anàlits en estat sòlid a mostres de pinso blanc. D'aquesta manera, la incorporació té lloc seguint el procediment emprat en la fabricació de pinsos medicamentosos i, per tant, de la mateixa manera en que es dona la contaminació creuada. A més, per tal de comprovar que els mètodes proporcionen resultats fiables independentment de la composició de la matriu, s'han dopat pinsos destinats a diferents espècies animals (garrins, vaques, pollastres, etc.). Atès que la concentració dels pinsos que es volen preparar és baixa, primerament s'ha procedit a preparar un pinso més concentrat d'una matriu representativa i posteriorment, s'han realitzat dilucions amb la mateixa matriu de pinso blanc (Figura 3.1). La resta de pinsos en estudi s'han dopat a partir del pinso de concentració intermèdia. La dilució entre 10-100 vegades d'aquest pinso fa que la presència de la matriu corresponent només representi entre un 1-10 % del total. D'aquesta manera s'ha evitat la preparació de pinsos més concentrats i les posteriors etapes de dilució per a cadascuna de les diferents matrius. En cadascuna de les etapes, l'homogeneïtzació de les mostres dopades s'ha realitzat en un agitador durant 5 dies en flascons de plàstic que contenen boles de tefló per tal d'afavorir la mescla.

En el cas de les sulfamides, per a la preparació dels pinsos més concentrats s'ha escollit, entre totes les matrius exemptes d'anàlits disponibles, el pinso d'engreix per a porcs, fonamentalment per dues raons. D'una banda, perquè la cria de bestiar porcí és l'activitat més estesa de la indústria ramadera a Catalunya i, d'altra banda, perquè la majoria de premescles autoritzades van destinades a aquest sector. En total, s'han dopat 6 pinsos diferents que contenen tots els anàlits a una concentració

de $2 \mu\text{g g}^{-1}$, la qual es pot considerar representativa d'un pinso contaminat com a resultat d'una contaminació creuada. Posteriorment, per a les fluoroquinolones s'ha procedit de la mateixa manera. En aquest cas, els pinsos més concentrats s'han preparat amb pinso per a pollastres. D'altra banda, s'ha optat per preparar 4 pinsos dopats a 3 concentracions diferents (0.2 , 0.5 i $2 \mu\text{g g}^{-1}$) per tal d'avaluar l'eficiència del mètode a concentracions més baixes (Figura 3.1).

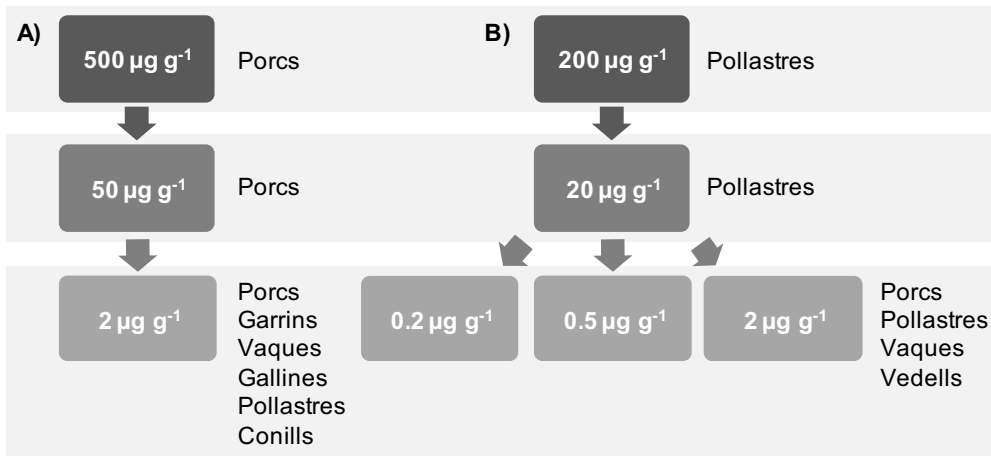


Figura 3.1. Esquema de la preparació dels pinsos dopats per: (A) sulfamides i (B) fluoroquinolones.

3.2.3.2. Propietats fisicoquímiques dels anàlits

Pel que fa a les característiques àcid-base, les sulfamides són compostos ionitzables que presenten dos equilibris degut a la presència de dos grups amino en la seva estructura (Figura 3.2). Així, el nitrogen unit al carboni 4 és capaç d'acceptar un protó en medi àcid (pK_{a1}), mentre que el nitrogen del grup sulfonamido pot cedir un protó a valors de pH alcalins (pK_{a2}). En general, les sulfamides presenten valors de pK_{a1} entre 1.3-2.9 i de pK_{a2} en l'interval 5.7-8.5 [173]. Per tant, en funció del pH del medi, es poden trobar en forma catiònica, neutra o aniònica i, tot i que molt minoritàriament, també en forma zwitteriònica. Són solubles en solvents orgànics polars.

Les quinolones, en funció de les seves característiques àcid-base, es poden classificar en dos grups: quinolones àcides i quinolones amfòteres. Les quinolones estudiades en aquest treball es corresponen amb les quinolones amfòteres per a les

quals s'ha establert un MRL en aliments [38]. El caràcter àcid de les quinolones àcides ve donat pel grup carboxil situat en la posició 3, mentre que les quinolones amfòteres tenen, a més, grups piperazinil o metil piperazinil en la posició 7 que els confereixen característiques bàsiques. Per tant, aquestes últimes, en funció del pH del medi, es poden trobar en forma catiònica, aniònica o zwitteriònica ja que el grup carboxil és més àcid que el grup piperazinil o metil piperazinil protonat (Figura 3.3).

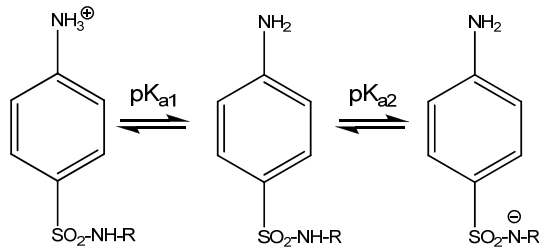


Figura 3.2. Equilibris àcid-base de les sulfamides.

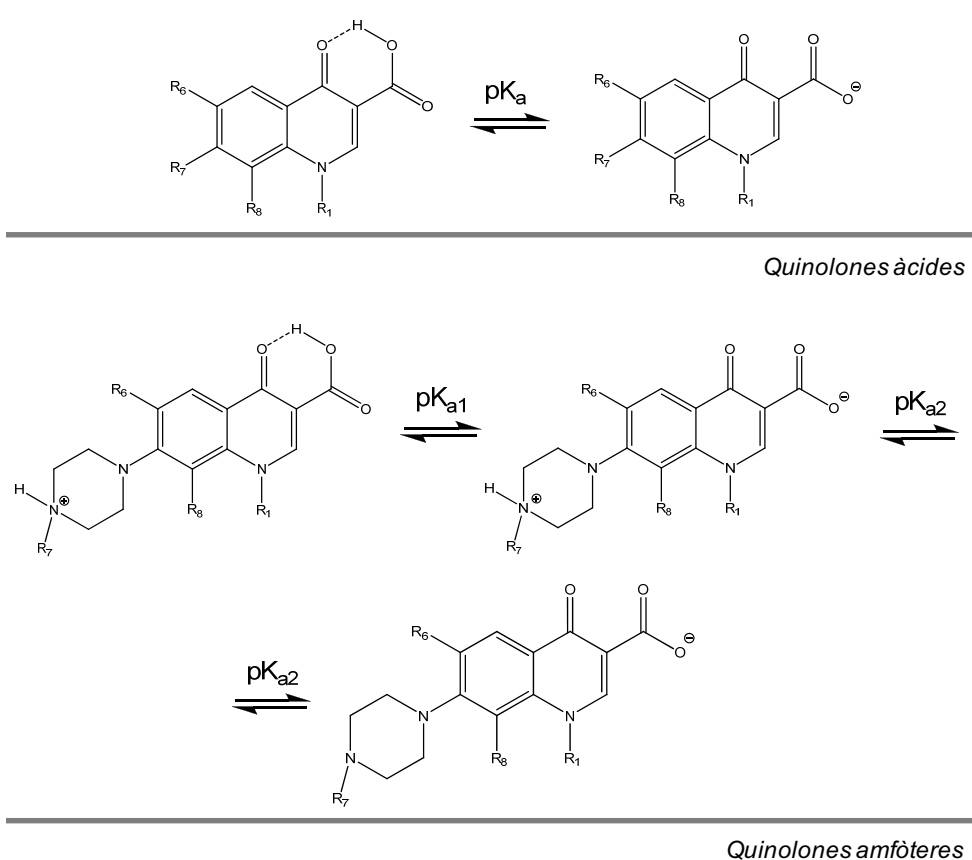


Figura 3.3. Equilibris àcid-base de les quinolones.

Les quinolones àcides (FLU i OXO) presenten valors de pK_a entre 5.5-6.0, mentre que per les quinolones amfòteres estudiades els valors de pK_{a1} i pK_{a2} es troben entre 5.5-6.5 i 7.5-9.3, respectivament [24]. Els pK_a associats al grup carboxil són unes dues unitats més elevats que el de l'àcid benzoic (pK_a 4.2). Aquesta disminució de l'acidesa indica la formació d'un enllaç d'hidrogen intramolecular entre el protó no ionitzat del grup carboxil i l'oxigen del grup carbonil veí [174]. Són solubles en solvents orgànics polars i en solucions hidroorgàniques bàsiques o àcides, mentre que a valors de pH entre 6-8 són poc solubles en aigua [175].

3.2.3.3. Tractament de mostra

Els mètodes multiresidu desenvolupats per a la determinació en pinsos de les sulfamides i les fluoroquinolones estudiades es mostren en les Figura 3.4 i Figura 3.5, respectivament. Per a l'extracció de les sulfamides, l'addició de petites quantitats d'aigua (5 %) a un solvent orgànic com l'ACN prèviament reportada [121], ha proporcionat bones recuperacions per a tots els anàlits. En el present estudi però, s'ha observat que el reemplaçament de l'ACN per l'acetat d'etil (AcEt), menys polar, permet obtenir recuperacions similars amb una menor extracció de components de la matriu (Figura 3.6 i *Figure 2* publicació II). Finalment, s'ha provat també que la disminució del percentatge d'aigua fins l'1 % contribueix encara més a la reducció d'interferències sense afectar negativament les recuperacions (*Figure 4* publicació II).

En el cas de les fluoroquinolones, les millors recuperacions s'obtenen en condicions àcides (*Figure 1* publicació III), de la mateixa manera que en la resta de mètodes reportats en què l'extracció es du a terme a pH iguals o inferiors a 4 [91, 113, 129]. D'altra banda, tal com s'ha observat també per a les sulfamides, l'augment del temps d'extracció emprant agitació mecànica no afecta significativament el valor de les recuperacions obtingudes (Figura 3.7 i *Figure 3* publicació II), així com tampoc la naturalesa del pinso (*Table 2* publicació II i *Figure 2* publicació III).

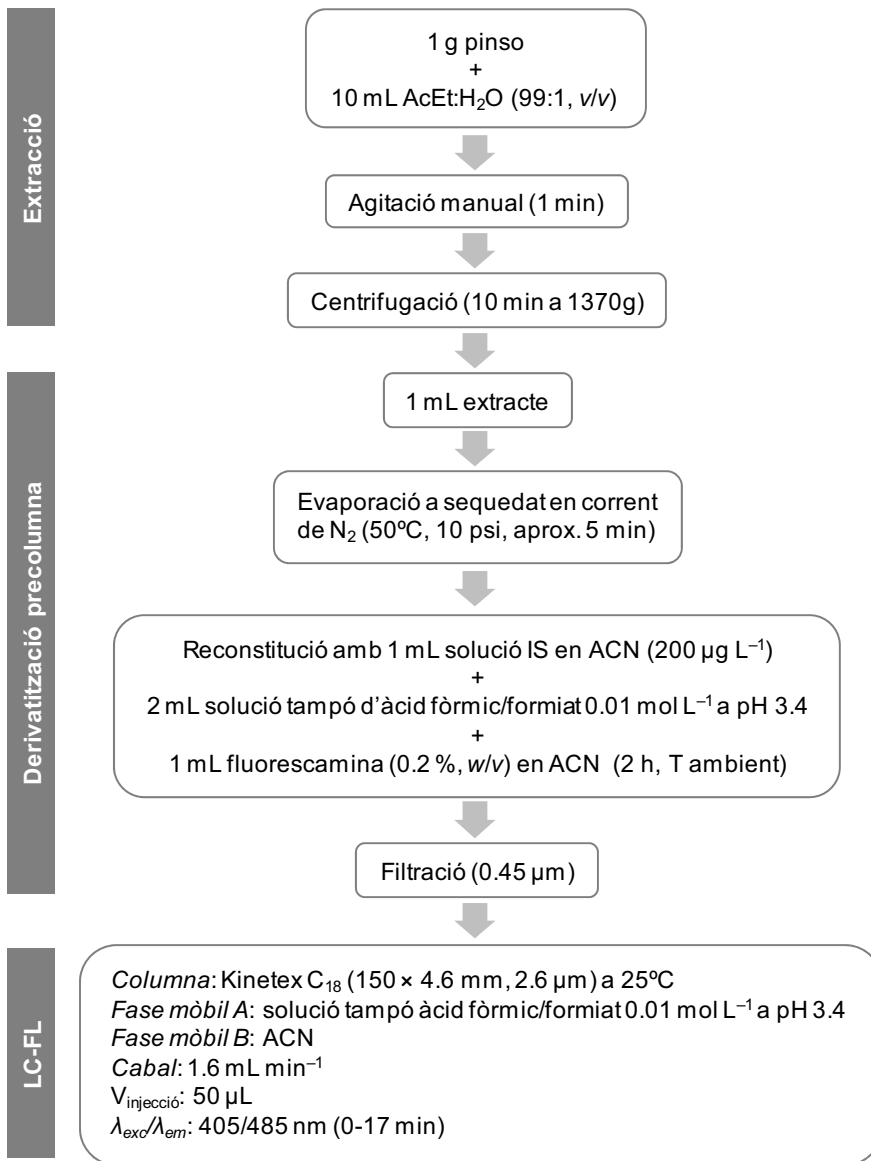


Figura 3.4. Esquema del procediment per a l'anàlisi de sulfamides en pinsos.

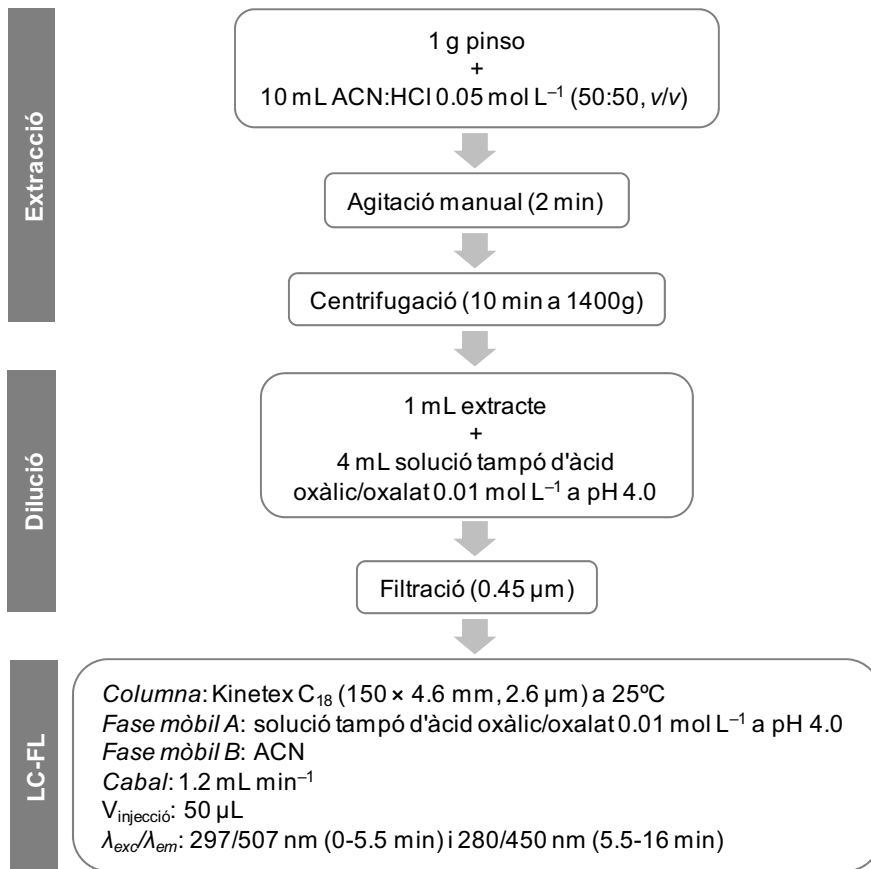


Figura 3.5. Esquema del procediment per a l'anàlisi de fluoroquinolones en pinsos.

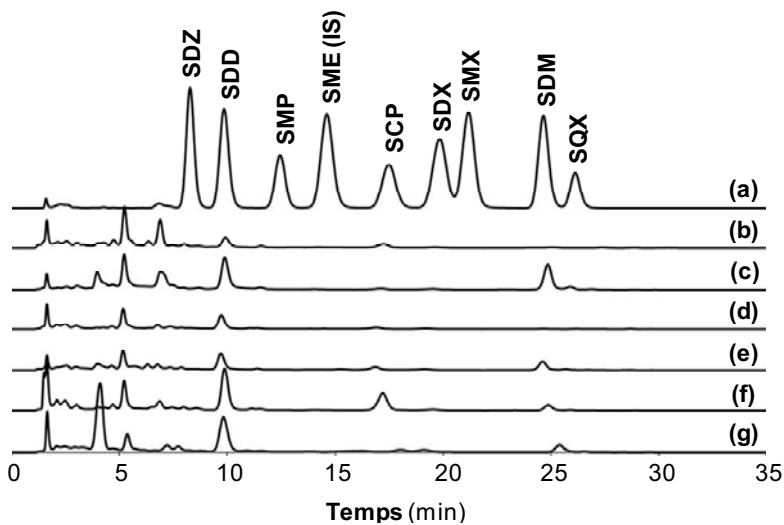


Figura 3.6. Cromatogrames de LC-FL corresponents a un patró de 200 µg L⁻¹ (a) i pinsos blancs de diferents espècies animals extrets amb ACN (5 % H₂O): porcs (b), garrins (c), vaques (d), pollastres (e), gallines ponedores (f) i conills (g).

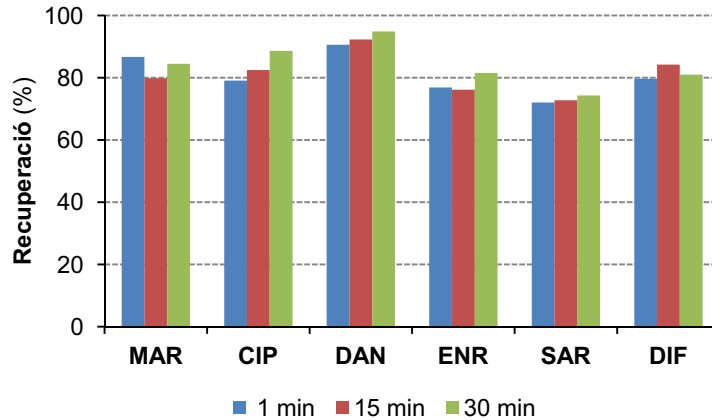


Figura 3.7. Recuperacions obtingudes per al pinso d'aus dopat amb $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de cada fluorquinolona en funció del temps d'extracció: agitació manual (1 min) i agitació mecànica (15 i 30 min).

3.2.3.4. Determinació per LC-FL

Per a la separació cromatogràfica dels derivats de les sulfamides, s'ha comprovat que l'ús de la columna C_{18} de diàmetre de partícula més petit i de nucli sòlid ($150 \times 4.6 \text{ mm}$; $2.6 \mu\text{m}$), ofereix respecte la columna C_{18} convencional de rebliment totalment porós i de llargada superior ($250 \times 4 \text{ mm}$; $5 \mu\text{m}$), els següents avantatges:

- Augment de la resolució
- Augment de la sensibilitat (disminució dels LOD i LOQ)
- Disminució del temps d'anàlisi
- Reducció del consum de dissolvents (fase mòbil)

D'aquí que per a l'anàlisi de les fluorquinolones s'hagi optat directament per emprar la mateixa columna C_{18} de partícules de nucli sòlid. Ambdós mètodes desenvolupats constitueixen la primera aplicació d'aquest tipus de columnes per a la determinació d'agents antimicrobians en pinsos. Diverses publicacions també han reportat recentment el seu ús i avantatges, tant en sistemes d'HPLC com d'UHPLC, en el camp dels aliments [176-184].

L'elevada eficàcia que presenten aquestes columnes resulta de la reducció dels principals efectes que contribueixen a l'eixamplament de les bandes

cromatogràfiques (difusió d'Eddy i transferència de massa) que proporcionen les partícules de nucli sòlid (*core-shell*), les quals consten d'un nucli esfèric de sílice d'alta densitat no porós recobert d'una capa porosa homogènia (Figura 3.8).

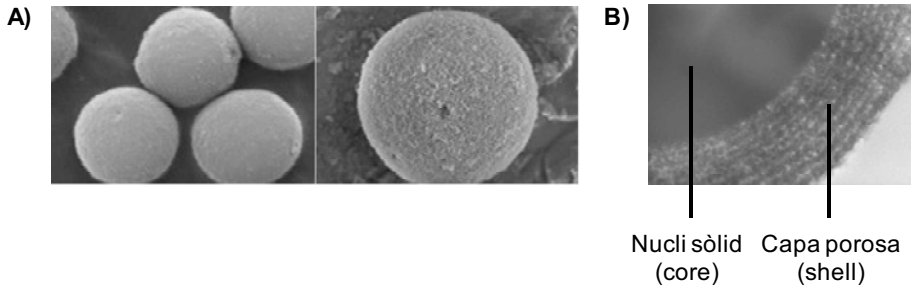


Figura 3.8. Microscòpia electrònica de rastreig de partícules de nucli sòlid (*Kinetex core-shell*): (A) íntegres i (B) secció transversal [185].

D'una banda, la uniformitat i morfologia d'aquestes partícules facilita una distribució òptima i un espai intersticial similar entre elles que homogeneïtza els diferents camins de difusió possibles (Figura 3.9), i de l'altra, la porositat només de les capes més externes redueix el recorregut dels anàlits i accelera la transferència de massa (Figura 3.10).

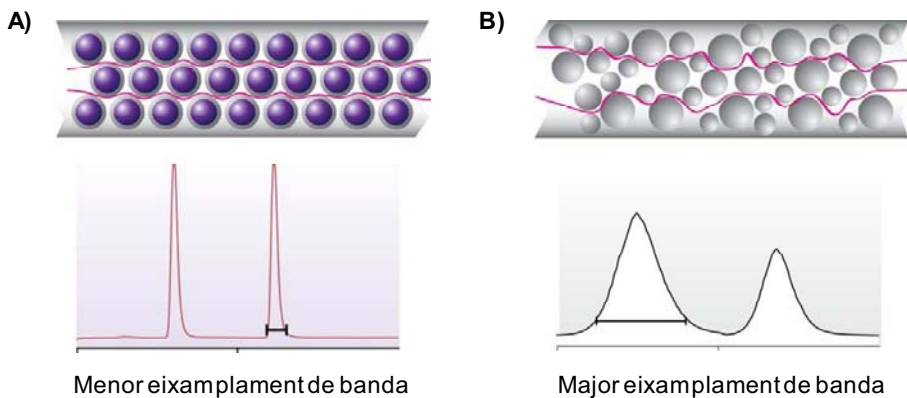


Figura 3.9. Efecte de la difusió d'Eddy (efecte multi camí) en l'eixamplament de banda de: (A) partícules de nucli sòlid i (B) partícules totalment poroses [185].

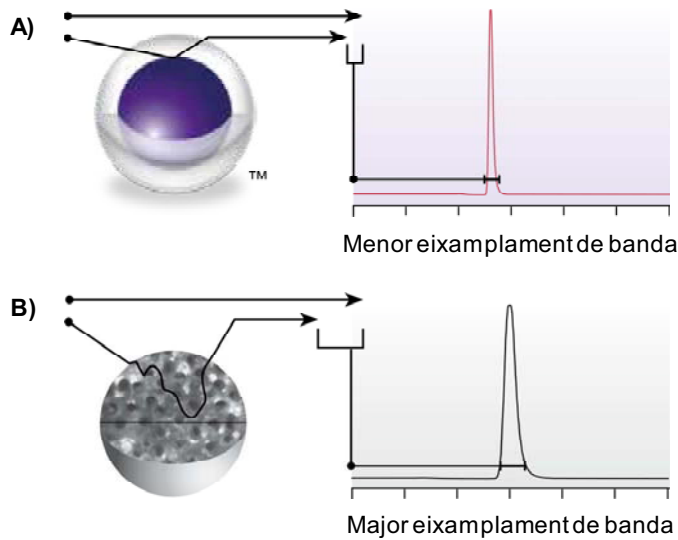


Figura 3.10. Efecte de la transferència de massa en l'eixamplament de banda de: (A) partícules de nucli sòlid i (B) partícules totalment poroses [185].

En quan a la detecció fluorimètrica, les condicions de derivatització amb fluorescamina prèviament reportades per a l'anàlisi de sulfamides en mostres ambientals han resultat també adequades per a la seva determinació en pinsos [186]. La fluorescamina és el reactiu derivatitzant utilitzat ja que és específic per a amines primàries i aromàtiques (Figura 3.11). A més, aquesta reacciona amb les diferents sulfamides donant lloc a fluoròfors amb espectres d'excitació i emissió molt semblants entre sí ja que la fluorescència és deguda principalment a la contribució de la fluorescamina [187]. Això permet treballar amb la mateixa parella de $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ per a totes elles. El temps d'estabilització del senyal varia entre aproximadament 60 i 120 min per a les diferents sulfamides i posteriorment assoleix un valor constant durant un mínim de 8 hores [187]. No obstant, l'addició del patró intern (SME) en l'etapa de derivatització permet compensar les possibles variacions del senyal amb el temps i/o entre mostres evitant així que la quantificació es vegi afectada. Un altre avantatge que presenta la fluorescamina és que tant el reactiu en sí com els seus productes d'hidròlisi no són fluorescents, fet que evita haver de separar els derivats dels anàlits de l'excés de reactiu. D'altra banda, malgrat que la derivatització precolumna *off-line* incrementa el temps d'anàlisi, s'ha adoptat aquesta estratègia ja que permet reduir el consum de reactiu derivatitzant, el qual té un cost elevat.

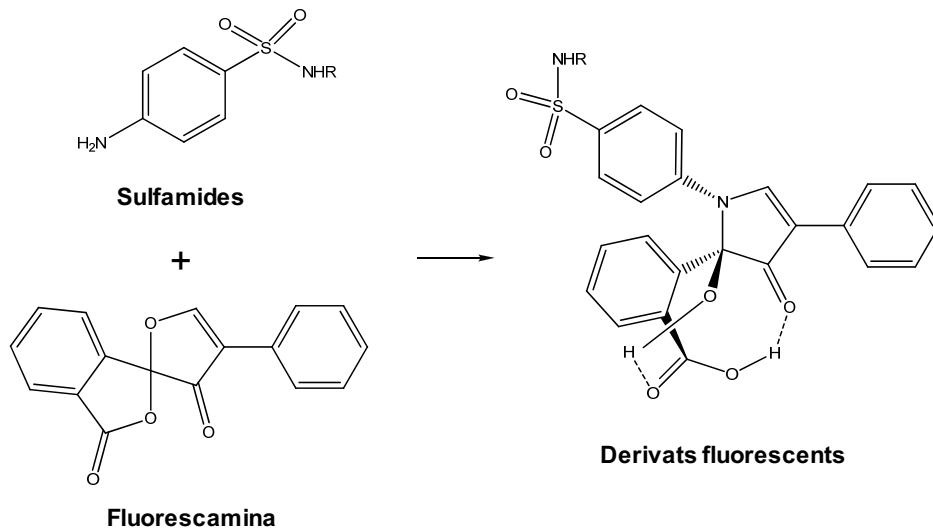


Figura 3.11. Reacció de derivatització de les sulfamides amb fluorescamina [186].

Pel que fa a les fluoroquinolones, la seva fluorescència intrínseca facilita el procés de detecció per LC-FL i no s'ha considerat necessari l'ús de cap patró intern. La intensitat del senyal varia considerablement entre elles, sent la DAN i la MAR la més i menys fluorescents, respectivament (*Figure 3* publicació III). En la Taula 3.2 es mostren els LOD i LOQ obtinguts per a les diferents fluoroquinolones, establerts com la concentració corresponent a 3 i 10 vegades, respectivament, la desviació estàndard de la línia base en el temps d'elució de cadascun dels anàlits d'extractes blancs corresponents al pinso d'aus.

Taula 3.2. LOD i LOQ determinats per a les diferents fluoroquinolones en pinso d'aus.

Fluoroquinolona	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
MAR	105	350
CIP	45	150
DAN	6	20
ENR	25	80
SAR	45	150
DIF	25	80

En comparació amb la majoria de mètodes reportats fins al moment per a la determinació de sulfamides i quinolones en pinsos, s'ha reduït considerablement el temps d'anàlisi eludint l'ús de tècniques d'extracció com la MAE o la PLE i evitant un laboriós procés de purificació que allarga la preparació de mostra. A més a més, en ambdós casos s'ha aconseguit, respecte els mètodes cromatogràfics que empren detectors convencionals, una disminució significativa dels LOD i LOQ (Taula 3.3 i Taula 3.4).

Taula 3.3. Sensibilitat dels mètodes cromatogràfics reportats per a l'anàlisi de sulfamides en pinsos.

Nombre de sulfamides	Tècnica analítica	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
2	LC-UV	350-730	1350-3160	[114]
10	LC-UV	390-640	1290-2130	[128]
8	LC-UV	74-265	265-868	[131]
2	LC-FL	56-200	189-665	[114]
8	LC-FL	10-230	20-760	^a
8	LC-FL	10-100	20-340	^b
13	LC-MS/MS	0.5-4.2	0.9-7.1	[138]
7	LC-MS/MS	0.1-1.1	0.3-2.9	[122]
7	LC-MS/MS	0.1-2.2	0.3-5.8	[123]

^a Publicació II (columna convencional).

^b Publicació II (columna de partícules de nucli sòlid).

Taula 3.4. Sensibilitat dels mètodes cromatogràfics reportats per a l'anàlisi de fluoroquinolones en pinsos.

Nombre de quinolones	Tècnica analítica	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
13	LC-FL	400-1500	5000	[91]
11	LC-FL	40-800	100-2400	[113]
6	LC-FL	6-105	20-350	^c
5	LC-MS/MS	5-9.1	16.5-30	[129]

^c Publicació III.

3.3. Mètode multiclasse per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos

El Laboratori Agroalimentari de Cabrils (LAC) és el responsable de l'anàlisi de les mostres de pinso preses en els controls oficials a Catalunya. Dins el Pla d'Investigació de Residus (PIR), du a terme la determinació de medicaments veterinaris, principalment β -agonistes i agents antimicrobians, per tal de controlar l'ús il·legal d'aquestes substàncies en la cria de bestiar, així com verificar que els tractaments legals d'aquests animals a través dels pinsos es realitzen correctament. Pel que fa als agents antimicrobians, té implementats 12 mètodes, 8 dels quals inclosos en l'abast de l'acreditació segons la norma ISO/IEC 17025:2005 [70], per a l'anàlisi d'un total de 24 compostos pertanyents a 9 famílies diferents (Taula 3.5). Aquests es basen en la LC acoblada majoritàriament a detectors convencionals d'UV i FL, i en menor proporció a la MS/MS. En general, els diversos compostos d'una família s'agrupen en un mateix mètode d'anàlisi, excepte en el cas dels nitrofurans i els coccidiostàtics, per als quals es requereixen 2 i 3 mètodes diferents, respectivament. Així doncs, els mètodes establerts inclouen des de 1 fins a un màxim, en el cas de les sulfamides, de 5 anàlits. Com a conseqüència, sovint una mostra ha de ser sotmesa a diversos mètodes per tal de cobrir la determinació de tots els compostos exigits, fet que disminueix l'eficiència i productivitat del laboratori.

Per aquest motiu, l'objectiu del present treball ha estat agrupar els 12 mètodes anteriors en un únic mètode basat en la LC-MS/MS, així com també incloure més anàlits en algunes de les famílies i introduir noves famílies no considerades fins al moment (Taula 3.6). En total, el mètode establert cobreix de manera simultània el cribratge, la confirmació i la quantificació de 50 anàlits pertanyents a 13 famílies diferents. S'han estudiat les condicions per a la seva extracció, separació cromatogràfica i detecció per MS/MS. Pel que fa al *clean-up* dels extractes s'han avaluat diferents estratègies basades en la SPE i la d-SPE per a la reducció del efecte matriu, sense resultats satisfactoris.

El desenvolupament i la validació d'aquest mètode multiclasse ha donat lloc a l'article que es presenta a continuació: *Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013, 405(26), 8475-8486.

Taula 3.5. Mètodes de rutina establerts al LAC per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos.

Famílies	Tècnica analítica	Interval de concentracions (mg kg ⁻¹)	Acreditat	
<i>Sulfamides</i>				
Sulfadiazina	SDZ	LC-UV	5-1000	Sí
Sulfapiridina	SPD			
Sulfadimidina	SDD			
Sulfametoxipiridazina	SMP			
Sulfaquinoxalina	SQX		5-100	
<i>Tetraciclins</i>				
Oxitetraciclina	OTC	LC-FL	5-1000	Sí
Doxiciclina	DC			
Tetraciclina	TC			
Clortetraciclina	CTC			
<i>Quinolones</i>				
Enrofloxacina*	ENR	LC-FL	1-20	No
<i>Macròlids</i>				
Tilosina	TYL	LC-MS/MS	1-20	Sí
Espiramicina	SPI			
Eritromicina	ERY			
<i>Fenicols</i>				
Cloramfenicol	CAP	LC-MS/MS	0.5-10	Sí
<i>Coccidiostàtics</i>				
Monensina	MON	LC-UV	1-100	Sí
Salinomicina	SAL			
Narasina	NAR			
Lasalocid	LAS	LC-FL	1-100	Sí
Amprolium	AMP	LC-UV	10-100	No
<i>Nitrofurans i Quinoxalines</i>				
Furaltadona	FTD	LC-UV	10-100	Sí
Carbadox	CBX			
Olaquinox	OLQ			
Nifursol	NIF	LC-UV	0.5-200	No
<i>Polipèptids</i>				
Bacitracina	BAC	LC-MS/MS	1-20	No

* Mètode desenvolupat en aquesta tesi (publicació III).

Taula 3.6. Nous anàlits i famílies d'agents antimicrobians inclosos en el mètode multiclasse.

Nous anàlits			
Quinolones		Sulfamides	
Ciprofloxacina	CIP	Sulfaclopiridazina	SCP
Danofloxacina	DAN	Sulfadimetoxina	SDM
Difloxacina	DIF	Sulfadoxina	SDX
Marbofloxacina	MAR	Sulfamerazina	SMR
Norfloxacina	NOR	Sulfametoxazole	SMX
Sarafloxacina	SAR	Sulfatiazole	STZ
Àcid oxolínic	OXO		
Flumequina	FLU		
Cocciostàtics		Fenicols	
Decoquinat	DCQ	Florfenicol	FLOR
Diclazuril	DCZ		
Clopidol	CLOP		
Nicarbazina	NCZ		
Noves famílies			
Benzimidazoles		Pleuromutilines	
Fenbendazole	FEN	Tiamulina	TIA
Flubendazole	FLUB	Valnemulina	VAL
Oxibendazole	OXI		
Lincosamides		Diaminopirimidines	
Lincomicina	LIN	Trimetoprim	TRI

3.3.1. Publicació IV. *Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*

Anal Bioanal Chem (2013) 405:8475–8486
DOI 10.1007/s00216-013-7268-4

RESEARCH PAPER

Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

S. Borràs · R. Companyó · J. Guiteras · J. Bosch ·
M. Medina · S. Termes

Received: 27 May 2013 / Revised: 18 July 2013 / Accepted: 19 July 2013 / Published online: 7 August 2013
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

Abstract A rapid multiclass method that covers 50 antimicrobials from 13 different families in animal feeds was developed. Samples were extracted using a mixture of methanol, acetonitrile and a McIlvaine buffer combined with sonication. Feed extracts were simply diluted prior to injection, since the clean-up strategies that were tested, based on either solid-phase extraction or dispersive solid-phase extraction, were ineffective at minimizing matrix-related signal suppression/enhancement. Analysis was carried out by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry using an electrospray ionization source operating in positive and negative modes. For the quantification, matrix-fortified standard calibration curves were used to compensate for matrix effects and losses in sample preparation. The method was validated in-house in pig, poultry and cattle feed matrices and showed satisfactory performance characteristics. Thus, the proposed approach was suitable for application in a routine high-throughput laboratory for the official control of feeds.

Keywords Animal feed · Antibiotics · Coccidiostats · Cross-contamination · Matrix effects · LC-MS/MS

Introduction

The compound feed industry reached an estimated worldwide production of 954 million tonnes in 2012. The European Union

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-013-7268-4) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Borràs · R. Companyó (✉) · J. Guiteras
Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: compano@ub.edu

J. Bosch · M. Medina · S. Termes
Laboratori Agroalimentari de Catalunya, Generalitat de Catalunya,
08348 Cabrils, Spain

(EU) is one of the leading compound feed manufacturers and accounts for 20 % of global production [1]. The potential for the rapid spread of diseases among livestock has made the routine use of veterinary drugs integral to maintain the viability of the growing animal food industry. Oral drug administration via feed is the most common practice [2]. Hence, about 3–7 % of the feeds that are produced correspond to medicated feeds.

Antimicrobials are by far the largest authorized group in the production of medicated premixes. Tetracyclines are the most commonly used antimicrobials, followed by sulfonamides, trimethoprim and macrolides [3]. However, the manufacture of medicated feeds in the same production lines as non-medicated ones has raised concerns about unavoidable cross-contamination, which may occur in all stages of feed production and processing, as well as during storage and transport [4].

Contaminated feeds may be given unknowingly to non-target animals. This could harm certain species and lead to residues in end products for human consumption, which may cause serious public health problems (e.g. the development and transfer of resistant bacterial strains, and the onset of allergies in individuals with hypersensitivity) [5].

In order to ensure a high level of human and animal protection, the EU adopted harmonized community rules on this matter. Following the As Low As Reasonably Achievable principle, Directive 2009/8/EC [4] established maximum limits for unavoidable carry-over of coccidiostats and histomonostats, which are used as feed additives. However, this regulation does not give legal cover to the carry-over of other authorized antimicrobials prescribed in medicated feeds. Zero-tolerance levels should therefore be applied to antimicrobials other than coccidiostats and histomonostats in non-target feeds.

Notifications of the improper presence of residues of antimicrobials in animal feeds can be found in the Rapid Alert System for Food and Feed portal database [6]. Since 2000, 51

notifications about feeds have been listed. Most of them refer to the presence of coccidiostats and, to a lesser extent, tetracyclines and other antimicrobials (e.g. sulfadiazine, amoxicillin, colistin, chloramphenicol and bacitracin). Thus, the availability of multiclass analytical methods to monitor a variety of antimicrobial families is of great interest for laboratories involved in the official control of feeds.

In the last few years, the use of multiresidue and especially multiclass methods for the analysis of antimicrobials in food-stuff matrices has become an emerging analytical trend. However, this approach has not been extensively applied in the analysis of animal feeds.

Most of the methods reported in this field in the last 10 years, compiled in a previous review [7], have ranged from single-analyte to multiresidue methods dealing with a few analytes from the same or, at most, three different classes of antimicrobials. Real multiclass approaches are still scarce in the literature [8–10].

Moreover, few methods have reported the use of mass spectrometry in feed analysis. To date, only one such method makes use of high-resolution mass spectrometry instruments [11]. Matrix effects caused by coeluting interfering matrix components, which reduce (ion suppression) or increase (ion enhancement) the analyte response, are the main problems to overcome. In the case of feed analysis, these phenomena were found to take place extensively in comparison with other kinds of matrices (maize, honey, meat, eggs or milk) [8]. However, matrix effects often do not get the attention they deserve [12]. Due to the high complexity and variability of the feed matrix composition, ignoring these detrimental effects may adversely affect the accuracy and reliability of a method [7].

The aim of the present study was to develop a multiclass LC-MS/MS method, based on a triple quadrupole, for the simultaneous analysis of 50 antimicrobials in animal feeds. The procedure was designed to cover the 12 methods that were in use at the *Laboratori Agroalimentari de Generalitat de Catalunya* (LAC) for the official controls of feeds and also to include 25 new compounds. The target compounds, which included amphenicols (2), benzimidazoles (3), coccidiostats (9), diaminopyrimidines (1), lincosamides (1), macrolides (3), nitrofurans (2), pleuromutilins (2), polypeptides (1), quinolones (9), quinoxalines (2), sulfonamides (11) and tetracyclines (4), as well as their abbreviations, are listed in Table 1. Various clean-up strategies, based on either solid-phase extraction (SPE) or dispersive solid-phase extraction (d-SPE), were assessed and compared using different kinds of feeds. Special focus was placed on the evaluation of matrix effects, both during the development of the method and the validation studies. Matrix effects are comprehensively reported in the paper. The proposed approach was finally applied to the analysis of real feed samples.

Experimental

Chemicals and reagents

Methanol (HPLC grade), formic acid (98 %) and anhydrous disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) were supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile (HPLC grade) and sodium hydroxide 1 mol L^{-1} (NaOH) were obtained from J. T. Baker (Deventer, Holland). Dimethylsulfoxide (DMSO) and citric acid monohydrate were purchased from Carlo Erba (Val de Reuil, France) and ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA) from Merck (Darmstadt, Germany). Calcium chloride dihydrate (CaCl_2) was supplied by Scharlau (Barcelona, Spain). All chemicals were of analytical grade unless stated otherwise. Double-deionized water of $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ resistivity was obtained with a Milli-Q water purification system (Millipore, Molsheim, France).

Oasis HLB cartridges (200 mg, 6 mL, and 60 mg, 3 mL), used for solid-phase extraction, were purchased from Waters (Milford, MA, USA). Bondesil PSA and C_{18} bulk sorbents were provided by Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

The McIlvaine buffer (0.1 mol L^{-1} , pH 4.6) containing EDTA was prepared by mixing solutions of Na_2HPO_4 (0.2 mol L^{-1}), citric acid (0.1 mol L^{-1}) and EDTA (0.1 mol L^{-1}) in suitable proportions (46/52.5/15, v/v/v). The final pH was measured in order to check that the desired pH was attained.

Standard solutions

Veterinary drug standards, listed in Table 1, were of the highest purity available and were purchased from several commercial suppliers. Six compounds, three of them isotopically labelled, were used as surrogate standards and were added at the beginning of the analytical process: SDD- ^{13}C (for sulfonamides), NOR- d_5 (for quinolones), ROX (for macrolides), DMC (for tetracyclines), RDZ- d_3 (for non-ionophore coccidiostats) and NIG (for ionophore coccidiostats).

Individual stock standard solutions ($1,000 \text{ mg L}^{-1}$) of all compounds were prepared by weighing the appropriate amount of analyte and dissolving it in the required weight of solvent. Depending on the specific solubility properties, compounds were generally dissolved in pure methanol, with the following exceptions: FEN, FLUB, OXI, CLOP, BAC, NCZ, FTD, DCZ, CBX and NIF were dissolved in DMSO, CIP in formic acid (0.05 mol L^{-1}) and NOR and OXO in NaOH (0.1 mol L^{-1}). When necessary, sonication was used to ensure complete dissolution.

Six intermediate standard solutions (100 mg L^{-1}) containing several analytes, grouped according to their sensitivity (group A, B or C as listed in Table 1), were prepared by dilution of the concentrated stock solutions with methanol. Intermediate solutions were kept at -20°C for up to 6 months,

Table 1 Retention time and MS/MS parameters for all analytes and surrogate standards

Analyte	Abbrev.	Group	t_R (min)	ESI	C.V. (V)	d.t. (ms)	Quantification transition	C.E. (eV)	Confirmation transition	C.E. (eV)
Benzimidazoles										
Fenbendazole	FEN	A	5.95	+	30	300	300.0>268.0	25	300.0>158.8	40
Flubendazole	FLUB	A	5.15	+	30	5	314.0>282.0	25	314.0>122.7	35
Oxibendazole	OXI	A	3.50	+	30	30	250.2>217.9	20	250.2>175.8	30
Coccidiostats										
Diclazuril	DCZ	A	7.80	–	30	100	407.1>336.1	24	405.0>333.8	22
Decoquinat	DCQ	A	9.52	+	25	100	418.2>372.2	40	418.2>203.9	55
Nicarbazin	NCZ	B	7.24	–	20	100	301.1>136.8	30	301.1>106.7	45
Clopidol	CLOP	B	2.33	+	40	10	191.9>100.7	32	191.9>86.6	32
Amprolium	AMP	C	0.47	+	40	200	149.9>107.8	20	149.9>80.7	20
Monensin	MON	A	11.16	+	20	90	693.2>461.3	54	693.2>479.2	54
Narasin	NAR	A	11.59	+	60	100	787.5>431.2	52	787.5>531.3	52
Salinomycin	SAL	A	10.96	+	60	85	773.2>431.1	54	773.2>265.0	54
Lasalocid	LAS	B	12.30	+	55	50	613.1>377.2	45	613.1>577.2	45
Amphenicols										
Chloramphenicol	CAP	B	3.94	–	30	85	321.2>151.9	25	321.2>257.0	15
Florfenicol	FLOR	C	3.62	–	30	45	356.2>184.6	30	356.2>118.9	40
Polypeptides										
Bacitracin	BAC	B	3.59	+	40	35	475.0>85.7	55	475.0>109.8	55
Quinoxalines										
Carbadox	CBX	B	2.69	+	30	10	263.0>231.0	16	263.0>129.7	20
Olaquinox	OLQ	C	2.13	+	30	10	264.0>212.0	25	264.0>142.8	30
Macrolides										
Erythromycin	ERY	A	4.01	+	20	55	734.1>157.8	30	734.1>576.1	25
Spiramycin	SPI	A	2.84	+	30	15	422.3>100.7	20	422.3>173.8	20
Tylosin	TYL	A	4.40	+	50	40	916.1>173.9	38	916.1>772.2	36
Quinolones										
Difloxacin	DIF	A	2.73	+	30	15	400.0>356.1	25	400.0>299.0	25
Enrofloxacin	ENR	A	2.50	+	20	15	360.0>316.1	24	360.0>245.0	25
Marbofloxacin	MAR	B	2.23	+	30	20	363.1>71.8	20	363.1>320.0	20
Norfloxacina	NOR	C	2.30	+	30	10	320.0>233.0	25	320.0>302.0	25
Ciprofloxacina	CIP	C	2.35	+	20	10	332.1>288.1	21	332.1>314.1	21
Danofloxacina	DAN	C	2.44	+	10	10	358.1>95.6	30	358.1>340.2	25
Sarafloxacina	SAR	C	2.68	+	30	15	386.0>299.0	25	386.0>368.0	25
Oxolinic acid	OXO	A	4.00	+	60	50	262.0>244.0	20	262.0>215.9	30
Flumequine	FLU	A	5.08	+	60	35	262.0>244.0	20	262.0>201.9	30
Sulfonamides										
Sulfadimidina	SDD	A	2.91	+	30	15	279.0>185.8	20	279.0>91.6	30
Sulfadoxina	SDX	A	3.54	+	30	30	311.0>155.8	20	311.0>91.6	30
Sulfadimetoxina	SDM	A	4.27	+	30	45	311.0>155.8	20	311.0>91.6	30
Sulfametoxazole	SMX	A	3.56	+	20	35	254.0>155.7	16	254.0>91.6	25
Sulfamerazina	SMR	A	2.65	+	20	15	265.0>155.7	20	265.0>91.7	30
Sulfametoxypyridazina	SMP	A	2.97	+	30	10	281.0>155.7	20	281.0>91.6	30
Sulfapyridina	SPD	A	2.56	+	30	10	250.0>155.7	20	250.0>91.7	25
Sulfadiazina	SDZ	B	2.42	+	20	15	251.0>155.7	18	251.0>91.7	25
Sulfachlorpyridazina	SCP	B	3.36	+	25	15	284.9>155.7	14	284.9>91.7	25
Sulfaquinoxalina	SQX	B	4.32	+	30	40	301.0>155.7	20	301.0>91.7	25
Sulfathiazole	STZ	B	2.50	+	20	10	256.0>155.7	14	256.0>91.6	25

Table 1 (continued)

Analyte	Abbrev.	Group	t_R (min)	ESI	C.V. (V)	d.t. (ms)	Quantification transition	C.E. (eV)	Confirmation transition	C.E. (eV)
Diaminopyrimidines										
Trimethoprim	TRI	B	2.19	+	45	20	291.1>230.0	26	291.1>122.7	29
Lincosamides										
Lincomycin	LIN	A	2.10	+	20	20	407.2>125.8	30	407.2>359.5	20
Tetracyclines										
Chlortetracycline	CTC	B	3.15	+	30	25	479.0>444.1	25	479.0>153.8	25
Doxycycline	DC	B	3.27	+	30	30	445.2>428.1	30	445.2>154.1	45
Oxytetracycline	OTC	B	2.47	+	30	15	460.9>426.0	20	460.9>443.3	18
Tetracycline	TC	B	2.56	+	20	20	445.1>410.0	20	445.1>153.9	25
Nitrofurans										
Nifursol	NIF	A	8.35	–	30	100	364.1>181.7	25	364.1>225.8	25
Furaltadone	FTD	B	2.14	+	20	15	325.1>99.7	25	325.1>252.0	16
Pleuromutilins										
Tiamulin	TIA	A	4.47	+	20	40	494.2>191.8	20	494.2>118.6	50
Valnemulin	VAL	A	4.98	+	20	45	565.2>263.0	20	565.2>163.7	30
Surrogate standards										
Nigericin	NIG	A	12.80	+	65	100	747.4>703.1	75		
Roxitromycin	ROX	A	4.85	+	40	45	837.4>679.3	25		
Phenylsulfadimidine- ¹³ C ₆	SDD- ¹³ C	A	2.95	+	30	15	285.2>185.9	20		
Demeclocycline	DMC	B	2.84	+	30	30	465.1>448.0	20		
Norfloxacin-d ₅	NOR-d ₅	C	2.30	+	30	10	325.1>238.1	25		
Ronidazole-d ₃	RDZ-d ₃	C	2.32	+	17	10	204.1>142.9	15		

while stock solutions were kept at -20°C for up to 1 year, both in dark glass bottles.

A working standard solution was prepared daily in methanol by dilution of the intermediate solutions at suitable concentrations (2, 8 and 20 mg L^{-1} for groups A, B and C, respectively).

A mixed surrogate standard solution was prepared by dilution of the stock solutions with methanol at appropriate concentrations (10 mg L^{-1} for SDD-¹³C, ROX and NIG; 40 mg L^{-1} for DMC and 100 mg L^{-1} for NOR-d₅ and RDZ-d₃). This solution was also stored at -20°C in dark glass bottles for up to 1 month.

Apparatus

Extraction was performed with a JP Selecta 3000515 ultrasonic bath from Afora (Barcelona, Spain). A Sorvall RC-5B plus centrifuge (Newtown, CT, USA) and a vortex mixer SA8 from Stuart (Stone, Staffordshire, UK) were also used in the sample treatment. A turboVap LV evaporation system from Caliper (Hopkinton, MA, USA) was used for the evaporation of the extracts. Solid-phase extraction was carried out with a Visiprep solid-phase extraction unit from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The pH was measured using a Crison GLP21 pH meter (Alella, Spain), equipped with a Crison 52-02 Ag/AgCl combined glass electrode.

Samples and pretreatment

Feed samples from farms and feed mills that were received by the LAC for routine analysis were used in this study. We focused on pig, poultry and cattle feeds, as more than 90 % of the total EU compound feed production is intended for these three animal species [13].

Samples were checked by LC-MS/MS to ensure that they were free of any of the target antimicrobials. Blank feeds were used for the development of the method and for calibration and validation purposes. Feeds were minced, homogenized and stored at room temperature until analysis.

Spiked feeds were prepared by adding the appropriate amount (range 50–500 μL) of the working standard solution to each portion of the weighed samples. Samples were vortex-mixed before the extraction.

Sample preparation

Extraction was based on a previously reported procedure [10]. Feed samples weighing 4 g, placed in a 50-mL polypropylene centrifuge tube, were spiked with analytes (if required) and with 50 μL of the mixed surrogate standard solution. Then, 15 mL of the extraction solution, consisting of methanol/

acetonitrile/McIlvaine buffer (37.5/37.5/25, v/v/v), was added. The mixture was manually shaken for 30 s and placed in an ultrasonic bath for 15 min. In contrast to the method proposed by Boscher et al. [10], no sample clean-up was performed.

After centrifugation at 3,000 rpm for 10 min, 3 mL of the supernatant was simply diluted to 10 mL with a 5 mmol L⁻¹ formic acid/methanol (50/50, v/v) mixture in a volumetric flask. Finally, the extracts were filtered directly into vials through 0.22- μ m membrane filters and injected into the LC system.

LC instrumentation and conditions

An Acquity UPLC system from Waters (Milford, MA, USA) was used. Chromatographic separation was achieved on a Kinetex XB-C₁₈ column (100 mm \times 2.1 mm; 1.7 μ m particle size) with an installed pre-filter, both from Phenomenex (Torrance, CA, USA). The column was maintained at 35 °C, and the injection volume was set to 8 μ L. Mobile phase A consisted of 5 mmol L⁻¹ aqueous formic acid, while mobile phase B was 50 mmol L⁻¹ aqueous formic acid/acetonitrile (10/90, v/v). Mobile phases were filtered through a 0.2- μ m membrane filter unit prior to usage. The mobile phase flow rate was 0.5 mL min⁻¹ and was directed to the mass spectrometer without splitting. The following linear binary solvent gradient was applied: 0–1 min 0 % B; 1–1.5 min 0–15 % B; 1.5–8.5 min 15–70 % B; 8.5–9 min 70–100 % B; 9–12 min 100 % B; 12–14 min 100–0 % B and finally, 14–16 min 0 % B.

MS/MS instrumentation and parameters

The instrument consisted of a Quattro Premier triple quadrupole mass spectrometer from Micromass (Waters, Milford, MA, USA), equipped with an ESI source. It was operated in positive and negative ion modes under the following working conditions: capillary voltage of 3.5 and -3.0 kV, respectively; source temperature of 120 °C; desolvation temperature of 300 °C; cone and desolvation gas (N₂) flow rates of 50 and 500 L h⁻¹, respectively; and gas (Ar) pressure in the collision cell of 7 \times 10⁻³ mbar. Instrument control and data acquisition under time scheduled multiple reaction monitoring (MRM) conditions were achieved using MassLynx 4.0 software. Table 1 shows the quantification and confirmation transitions selected, as well as the retention time (*t_R*), ESI mode (+/-), cone voltages (C.V.), collision energies (C.E.) and dwell times (d.t.) optimized for each compound.

Results and discussion

Sample preparation

Due to the different physicochemical properties of the large number of families considered, the extraction and clean-up

procedures are the most challenging steps in a multiclass method. A sample treatment method, previously reported by Boscher et al. [10] for the analysis of 33 antimicrobials in feed (24 in common with our method), was taken as the starting point of this study. The extraction was performed successfully and consisted of a mixture of organic solvents and a McIlvaine buffer, containing EDTA, combined with sonication. Addition of EDTA was required to properly extract tetracyclines and macrolides, which have a strong tendency to form chelates with divalent metallic cations [14]. For the clean-up, two previously proposed approaches [10] based on d-SPE (method I) and SPE (method II) were initially assessed. Both strategies were compared with a generic SPE protocol (method III), reported by Waters [15]. The three methods are summarized in Table S1 (Electronic Supplementary Material).

It is well known that when ESI is used, the presence of matrix components can affect the ionization of the target compounds, decreasing or enhancing the analyte response. Hence, the effectiveness of the clean-up procedures was evaluated both in terms of recovery values and reduction of the ion suppression/enhancement on the resulting MS/MS signals.

Preliminary experiments were carried out in duplicate with pig feed spiked with all analytes at a concentration of 2 μ g g⁻¹. Mean recoveries (in percent) for each antimicrobial class, presented in Fig. S1 (Electronic Supplementary Material), were calculated against blank feed extracts spiked at the expected concentrations prior to injection. Benzimidazoles, coccidiostats, pleuromutilins and BAC were insufficiently recovered, or not recovered at all, when SPE cartridges (method II and III) were used. Moreover, method II resulted in low recoveries for the other families, and although a significant improvement was attained by applying the generic SPE protocol (method III), the recovery rates of some families of compounds were still low compared with those obtained using PSA (method I). The results were in accordance with those reported by Boscher et al. [10]. Therefore, d-SPE was selected as the clean-up method. However, in further experiments, the last tedious and time-consuming steps of method I (e.g. evaporation, transfer, dilution and refrigeration) were replaced by dilution of the extract (3 to 10 mL). In addition, different d-SPE sorbents (C₁₈ and its combination with PSA) were tested to improve recoveries. As shown in Fig. S2 (Electronic Supplementary Material), the use of the C₁₈ sorbent resulted in poor efficiency for ionophore coccidiostats (<30 % for MON, NAR, SAL and LAS), whereas with PSA, the lowest recoveries were obtained for tetracyclines (<65 %). The mixture of these sorbents proved to be an acceptable compromise for tetracyclines (>75 %), but ionophore losses were still considerable (recoveries <60 %).

At the same time, and in order to assess possible matrix effects, responses from matrix-matched standards were compared with responses from an identical analyte concentration in solvent (5 mmol L⁻¹ formic acid/methanol; 50/50, v/v). Results

revealed that, although d-SPE provided satisfactory recoveries, it was unable to remove coeluting matrix interferences, which caused intensive signal suppression/enhancement.

Several attempts were then made to overcome this problem. Different factors related to d-SPE and their combinations (see Table 2) were studied. Unfortunately, matrix effects were not reduced by using either a higher amount of sorbent or a smaller volume of extract in the d-SPE clean-up. Removal of fatty matrix components by precipitation via overnight refrigeration of the extract also led to unsatisfactory results. Matrix effects for the combination of C₁₈ and PSA plus dilution of pig feed extracts spiked at 2 µg g⁻¹ are depicted in Fig. 1. Some compounds, such as TRI and AMP or NIF and BAC, still showed extensive suppression or enhancement effects, respectively. Acidic quinolones (OXO and FLU) behaved in a different way, with significant signal enhancement in comparison with piperazinyl quinolones, which were slightly suppressed. However, matrix effects proved to be of little relevance for sulfonamides and coccidiostats (except for AMP). Figure 1 shows that similar matrix effects were observed for most of the studied compounds, whether the dilution was carried out with d-SPE or without it. As a consequence, d-SPE was abandoned. No further clean-up approaches were considered, since a more selective strategy would likely result in the loss of some families of analytes as well. Therefore, extracts were simply diluted before injection, without additional treatments. The sensitivity achieved by this process was sufficient to determine the analytes at the concentration levels of interest. As shown in Table 3, extraction recoveries were satisfactory (above 70 %) for most compounds and matrices tested, and despite some exceptions (CAP in cattle feed or DCZ and TRI in poultry feed) similar recoveries were also obtained for each analyte among the three investigated feeds.

Finally, the variability of the final matrix effects between different animal feeds was evaluated. Three matrix-matched calibration curves ($n=5$, from 25 to 225 µg L⁻¹) were performed by spiking extracts from pig, cattle and poultry blank feed samples. The slopes were graphically compared for each analyte, and no significant differences between matrices were observed. Figure S3 (Electronic Supplementary Material)

Table 2 d-SPE clean-up procedure: tested factors

d-SPE sorbent	Sorbent amount	Volume of extract loaded
PSA	250 mg	2.5 mL
C ₁₈	500 mg	5 mL
PSA+C ₁₈	130+130 mg	None
None	250+250 mg	
Refrigeration (overnight)	Dilution	Feed matrix
Before d-SPE	Before d-SPE	Pigs
Before injection	After d-SPE	Cattle
(no d-SPE)	Before injection	Poultry
None	(no d-SPE)	
	None	

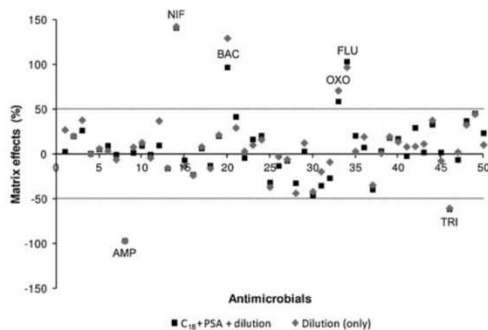


Fig. 1 Matrix effect for each antimicrobial in pig feed extracts, spiked at 2 µg g⁻¹, after two different clean-up procedures. A value of 0 % means no matrix effect. Negative values stand for suppression of the analyte signal, whereas positive values point to matrix-induced signal enhancement

shows the calibration curves for some of the studied compounds. The conclusion was that, at least in principle, matrix-fortified standard curves (blank feed samples spiked before extraction) prepared from a single feed could be used to compensate for losses in sample preparation and the matrix-related effects of any kind of feed. However, matrix effect studies during the method validation pointed to a feed-dependent effect for some of the target compounds, as presented in “Method validation”.

LC-MS/MS method

The liquid chromatography conditions were optimized by the injection of a mixed standard solution of all compounds. Two columns were tested in order to obtain a satisfactory separation. The Kinetex XB-C₁₈ core-shell column was chosen as it provided better resolution and sensitivity than an Acquity UPLC BEH C₁₈ column of the same length, diameter and particle size. A wide range of gradient profiles were also studied, with initial mobile phase percentages of the organic component varying between 0 and 20 %. The content of organic solvent was raised to 100 % during the gradient profile to prevent column contamination due to matrix compounds. The final selected gradient allowed the elution of all analytes to be achieved within a significantly short time of 16 min, including the cleaning and preconditioning steps. Despite the large number of targeted antimicrobials, complete separation of compounds with common mass transitions (FLU/OXO and SDX/SDM) was achieved.

The mass spectrometer parameters were optimized by the injection of individual standard solutions prepared in methanol. All analytes were ionized in positive mode, with the exception of DCZ, CAP, FLOR and NIF, which were detected in the negative mode. The sodium adduct [M + Na]⁺ was selected as the precursor ion for ionophore coccidiostats

Table 3 Extraction recovery rates from spiked feeds at 2 µg g⁻¹

Analyte	% Recovery mean (RSD, n=3)		
	Pigs	Cattle	Poultry
Benzimidazoles			
FEN	85 (1)	92 (2)	70 (1)
FLUB	87 (3)	86 (7)	88 (5)
OXI	86 (1)	82 (10)	77 (4)
Coccidiostats			
DCZ	83 (3)	114 (4)	57 (2)
DCQ	88 (3)	98 (5)	73 (3)
NCZ	83 (2)	86 (5)	75 (2)
CLOP	89 (1)	92 (5)	101 (7)
AMP	90 (9)	110 (15)	78 (1)
MON	98 (1)	103 (2)	76 (3)
NAR	90 (2)	107 (2)	54 (8)
SAL	96 (4)	101 (3)	66 (1)
LAS	76 (2)	69 (4)	75 (1)
Amphenicols			
CAP	107 (8)	69 (4)	91 (8)
FLOR	102 (7)	105 (11)	103 (9)
Polypeptides			
BAC	102 (8)	92 (11)	83 (6)
Quinoxalines			
CBX	77 (10)	73 (9)	100 (1)
OLQ	71 (9)	79 (4)	84 (6)
Macrolides			
ERY	100 (3)	92 (3)	99 (2)
SPI	94 (3)	93 (3)	95 (8)
TYL	88 (1)	84 (7)	101 (2)
Quinolones			
DIF	94 (7)	84 (5)	71 (11)
ENR	88 (8)	91 (5)	86 (4)
MAR	85 (6)	91 (7)	76 (8)
NOR	80 (3)	69 (4)	68 (10)
CIP	82 (1)	82 (8)	71 (3)
DAN	72 (10)	83 (18)	55 (5)
SAR	88 (10)	79 (6)	75 (4)
OXO	93 (2)	82 (5)	85 (4)
FLU	91 (3)	87 (9)	86 (5)
Sulfonamides			
SDD	89 (4)	82 (4)	85 (7)
SDX	99 (4)	79 (5)	99 (5)
SDM	93 (10)	81 (4)	98 (3)
SMX	92 (8)	88 (4)	84 (4)
SMR	86 (10)	104 (4)	80 (3)
SMP	92 (7)	92 (12)	100 (12)
SPD	90 (2)	92 (11)	94 (6)
SDZ	94 (5)	80 (9)	90 (3)
SCP	89 (12)	71 (8)	100 (4)
SQX	91 (2)	88 (10)	89 (9)

Table 3 (continued)

Analyte	% Recovery mean (RSD, n=3)		
	Pigs	Cattle	Poultry
STZ	93 (9)	82 (3)	79 (6)
Diaminopyrimidines			
TRI	89 (3)	88 (6)	49 (5)
Lincosamides			
LIN	88 (4)	94 (8)	81 (7)
Tetracyclines			
CTC	79 (5)	71 (3)	80 (8)
DC	77 (7)	64 (8)	81 (6)
OTC	81 (9)	63 (12)	66 (6)
TC	83 (4)	77 (6)	74 (7)
Nitrofurans			
NIF	79 (1)	83 (4)	82 (3)
FTD	87 (7)	93 (7)	78 (7)
Pleuromutilins			
TIA	85 (2)	88 (6)	92 (4)
VAL	97 (2)	89 (7)	83 (3)

(MON, NAR, SAL and LAS), whereas the protonated or deprotonated molecular ions, $[M + H]^+$ or $[M - H]^-$, were selected for the other compounds. The product ion spectra were then recorded at different values of collision energy to find the two most intense transitions for each analyte.

Data for quantification and confirmation were acquired in the MRM mode, in which the total ion current acquisition was split into 14 retention time-based windows to achieve better sensitivity. Two transitions were monitored for identification, although only one was used for quantification. Identification was based on retention time, while confirmation was performed according to the ion ratio criteria in Decision 2002/657/EC [16].

Figure S4 (Electronic Supplementary Material) shows a typical chromatogram corresponding to the lowest concentration level of a matrix-matched calibration curve prepared in pig feed.

Method validation

There is still no widespread agreement about whether European Commission Decision 2002/657/EC [16] should be applied to feed analysis. However, because it is extensively used in food analysis, some of its criteria were applied in the validation of the present method, together with requirements for official feed controls stated in Regulation (EC) 882/2004 [17] and Regulation (EC) 152/2009 [18].

The protocol included the processing of blank samples from pig, poultry and cattle feeds. Due to the high variability of the feed matrix composition, new feeds (not used during the

development of the method) were included in the validation assays.

Depending on their sensitivity, the investigated compounds were divided into three groups. Two concentration levels were selected for the validation procedure of each group. The lowest level was chosen around the limit of quantification (LOQ), whereas the second level was four times higher to cover the relevant quantification concentrations for the different compounds. Hence, validation levels were 0.05 and 0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group A), 0.2 and 0.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group B) and 0.5 and 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group C) for analytes with high, intermediate and low sensitivity, respectively. The distribution of compounds among the three groups is given in Table 1.

The validation parameters that were measured were specificity, linearity, trueness, precision (repeatability and within-laboratory reproducibility), limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$). The validation results are summarized in Table 4.

Specificity/selectivity For the specificity assessment, 24 representative blank samples (including ten pig feeds, seven cattle feeds and seven poultry feeds) were analysed and checked for endogenous peaks with a signal-to-noise ratio above 3 at the retention times of the compounds of interest. Feeds were carefully selected to account for the high variability and complexity of the matrix composition, which depends on factors such as animal species (pigs, cattle, poultry), age (e.g. pigs/piglets), gender (e.g. hens/chickens) or regimes (e.g. growing, fattening, pregnancy, lactation, etc.). The method provided clean, background-free mass traces for all analytes in the 24 matrices studied.

The method also meets the criteria for compound identification. It scores four identification points through the measurement of a precursor ion plus two product ions. The ion ratio for each analyte in the samples matched the ion ratio for the standards within each run, since differences between the calculated ratios were lower than the maximum permitted tolerances [16].

Linearity Quantitative analysis was based on matrix-fortified standards. Blank feed samples ($n=6$) were spiked in the range of 0.025–0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group A), 0.1–1 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group B) and 0.25–2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group C) and subjected to the entire analytical procedure. Least-square regression analysis was performed by plotting the peak area versus the analyte concentration. The calibration parameters showed good linearity, with correlation coefficients (r) higher than 0.99 for all the analytes in the three feed matrices. Surrogate standards were used for internal quality control of the method performance (recovery and sensitivity).

Accuracy Trueness and precision were determined by processing five validation series. For pig feed, three independent

series were analysed on three different days to account for within- and between-day variations, while only single-day experiments were performed for cattle and poultry feed. Each series consisted of one non-spiked matrix sample, a six-point calibration curve and six replicates of blank samples spiked at the two validation levels. This resulted in 19 individual extractions, dilutions and injections per analytical run.

Trueness, expressed at each validation level as the relative difference between the mean measured and nominal concentrations (in percent), was lower than 15 % for most analytes. It increased in only a few cases up to 22 %, especially in cattle feed matrix.

Repeatability (RSD_r) and within-laboratory reproducibility (RSD_R) values were calculated as the relative standard deviation of six replicate measurements for each concentration level on the same day and on three different days, respectively. RSD_r values below 15 % were obtained in most cases, whereas RSD_R ranged between 10 and 20 %.

Sensitivity The LOD and LOQ were determined as the concentration of the analyte at which the signal-to-noise (S/N) ratio was equal to 3 and 10, respectively. LOD values were in the range of 0.1–71.4 ng g^{-1} , whereas LOQ values were from 0.2 to 238.1 ng g^{-1} (see Table 4). For all compounds, it was experimentally verified that peaks with $S/N \geq 10$ were obtained from both MS transitions at the LOQ.

The limits obtained for AMP, CBX and OLQ were more than five times lower than those reported for the LC-UV analytical methods described in Regulation (EC) 152/2009 [18] to control the illegal presence of such non-authorized additives in feed.

Finally, the decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$) values were also determined in pig feed, as stated in Decision 2002/657/EC [16]. According to Directive 2009/8/EC [4], only maximum limits for unavoidable cross-contamination of coccidiostats (except AMP and CLOP) and histomonostats have been established. After the application of good manufacturing practices, carry-over rates of approximately 1 and 3 % of the authorized maximum content can be tolerated for sensitive and less sensitive non-target animal species, respectively. Thus, the more restrictive 1 % was taken as the maximum permitted level for these compounds (LAS, NAR, SAL, MON, DCQ, NCZ and DCZ). Target analytes that do not belong to these two classes of antimicrobials, for which a maximum permitted level has not been defined, were considered to be non-authorized drugs.

$CC\alpha$, defined as the concentration at and above which it can be concluded that a sample is non-compliant with an error probability of α , was determined using the calibration curve procedure. For substances with an established permitted limit (coccidiostats), $CC\alpha$ was calculated as the concentration at the permitted limit plus 1.64 times the within-laboratory reproducibility standard deviation. For banned compounds, $CC\alpha$

Table 4 Validation data for the three feed matrices

Analyte	Group	MPL (ng g ⁻¹) ^a	Trueness (%) ^b			RSD _r (%) ^d			RSD _k (%) ^d			LOQ (ng g ⁻¹)			CC α (ng g ⁻¹)			CC β (ng g ⁻¹)			RSD (%) ^e	
			Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry		
Benzimidazoles																						
FEN	A	-	1/-6	-18/-14	6/6	5/5	15/7	4/3	8/16	0.2	0.7	0.2	8.0	8.2	<10	<20						
FLUB	A	-	-4/-5	-19/-17	4/8	13/12	8/12	10/7	20/14	3.2	1.7	2.2	13.0	13.8	<10	<10						
OXI	A	-	-5/-10	-13/-5	2/1	8/6	7/10	7/3	12/18	4.6	5.3	3.6	12.3	12.6	<10	<20						
Coccidiostats																						
DCZ	A	10	-6/-15	-4/-16	11/-2	13/10	13/6	5/8	16/20	7.4	9.5	8.0	14.0	18.0	<20	>20						
DCQ	A	400	-3/-5	12/-4	6/4	10/7	9/12	7/4	13/6	15.4	23.2	19.0	419.6	439.3	<20	>20						
NCZ	B	1,250 ^b	-2/-10	5/-13	11/7	6/7	9/8	4/3	12/19	56.2	77.4	56.2	1,289.1	1,328.2	<20	<20						
CLOP	B	-	-12/-18	-19/-16	4/13	16/16	16/12	13/6	16/14	97.1	84.1	75.6	46.9	102.9	<20	<20						
AMP	C	-	-6/-7	-22/-17	-12/8	16/14	10/8	10/7	19/13	238.1	223.9	215.3	191.4	270.8	>20	>20						
MON	A	1,250	1/-7	-6/-21	7/6	8/3	14/10	10/5	8/7	8.8	20.1	10.2	1,256.4	1,262.8	<20	>20						
NAR	A	700	-7/-10	-13/-4	5/6	4/4	21/4	7/2	7/10	1.4	5.9	1.9	705.6	711.3	>20	>20						
SAL	A	700	-2/-9	14/6	9/9	5/4	12/3	7/3	9/8	0.4	3.9	0.9	707.2	714.5	<20	>20						
LAS	B	1,250	-5/-11	6/-2	7/5	5/3	6/3	3/2	17/11	71.7	74.3	81.7	1,303.0	1,355.9	>20	>20						
Amphenicols																						
CAP	B	-	-12/-13	-9/-12	-4/0	12/7	9/13	11/3	18/16	70.7	65.4	86.6	45.4	80.3	<20	>20						
FLOR	C	-	-15/-17	1/-13	16/10	16/11	5/12	5/3	20/18	185.7	163.7	193.6	158.1	247.0	<20	>20						
Polypeptides																						
BAC	B	-	7/-14	-4/-19	2/2	6/13	13/16	6/4	12/20	69.7	91.8	91.1	54.0	76.2	<20	>20						
Quinoxalines																						
CBX	B	-	-14/-10	5/-8	2/2	20/16	16/21	11/12	21/14	84.6	92.4	72.4	54.2	108.2	<20	<20						
OLQ	C	-	-7/-18	8/2	-10/-19	13/17	17/5	17/10	12/18	181.8	207.5	221.9	102.8	210.0	>20	>20						
Macrolides																						
ERY	A	-	-4/-12	-17/-11	7/11	11/7	15/8	11/4	12/16	9.5	11.4	12.2	11.5	12.4	<10	<10						
SPI	A	-	-5/-10	-15/4	-1/7	17/7	17/13	19/7	17/10	16.2	22.4	8.5	11.7	19.8	<10	<10						
TYL	A	-	5/-7	1/1	-7/4	6/7	4/2	14/2	11/12	23.2	24.0	21.4	15.8	17.0	<10	<10						
Quinolones																						
DIF	A	-	-8/-9	-17/-10	5/2	7/8	18/11	13/9	10/18	10.4	16.4	12.3	10.7	11.2	<10	<10						
ENR	A	-	5/-10	-6/-10	8/1	10/9	12/13	15/5	17/20	18.7	19.3	17.2	14.8	16.1	<20	<20						
MAR	B	-	-3/-8	-17/1	8/12	7/7	15/10	9/6	9/16	42.6	49.6	54.0	53.1	59.5	>20	>20						
NOR	C	-	10/-5	3/-7	7/5	8/9	16/11	12/3	10/12	202.7	214.7	228.0	133.3	176.2	<20	<20						
CIP	C	-	-4/-10	-14/-10	4/8	8/5	18/7	14/4	13/17	176.5	187.9	167.5	141.0	162.7	>20	>20						
DAN	C	-	-4/2	-14/-2	1/9	18/9	6/12	12/5	22/15	149.3	151.6	158.1	171.9	290.1	>20	>20						
SAR	C	-	8/-3	-14/-10	4/5	9/10	13/11	5/3	14/13	164.7	184.8	171.6	144.5	196.3	<10	<10						
OXO	A	-	-9/-16	-12/-21	1/6	6/9	12/9	3/4	10/14	9.7	18.9	13.9	13.1	13.4	<10	<10						

Table 4 (continued)

Analyte	Group	MPL (ng g ⁻¹) ^a	Trueness (%) ^c			RSD _r (%) ^d			RSD _R (%) ^d			LOQ (ng g ⁻¹)			CC α (ng g ⁻¹)		CC β (ng g ⁻¹)		RSD (%) ^e	Inter-species
			Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Poultry	Pigs	Cattle	Pigs	Pigs	Pigs	Intra-species			
FLU	A	-	-4/-10	-16/-7	9/3	4/6	10/11	5/2	15/13	11/7	22.2	12.4	13.5	14.1	14.1	<10	<10	<10	<10	
Sulfonamides																				
SDD	A	-	1/-6	6/-11	9/8	13/6	13/13	9/4	21/8	11.7	15.5	17.1	11.5	14.3	14.3	<10	<10	<10	<10	
SDX	A	-	-6/-13	1/-6	6/3	12/7	6/11	5/3	17/14	17.2	10.5	23.4	11.6	13.1	13.1	<10	<10	<10	<10	
SDM	A	-	-1/-11	-3/-17	11/10	8/8	6/9	8/4	9/18	7.7	10.6	8.7	7.9	9.2	9.2	<10	<10	<10	<10	
SMX	A	-	-3/-15	-6/-13	1/8	11/10	15/13	11/8	15/19	22.9	17.5	14.7	12.7	15.7	15.7	<10	<10	<10	<10	
SMR	A	-	-18/-16	-14/-21	12/3	11/12	12/9	17/5	21/19	19.8	21.3	12.9	10.6	14.1	14.1	<20	<20	<20	<20	
SMP	A	-	-8/-10	-15/-12	9/13	17/14	11/16	5/7	17/22	10.2	12.3	9.9	12.3	14.1	14.1	<20	<20	<20	<20	
SPD	A	-	-7/-13	-15/-19	9/-7	15/12	5/16	9/7	24/15	23.4	21.5	24.1	11.8	14.6	14.6	<10	<10	<10	<10	
SDZ	B	-	-12/-5	-3/-10	11/5	14/8	18/9	7/6	18/23	54.6	65.0	53.0	41.4	55.2	55.2	<20	<20	<20	<20	
SCP	B	-	-4/-10	-13/-6	3/8	10/8	17/5	9/2	17/20	66.7	66.3	58.3	44.1	71.4	71.4	<20	<20	<20	<20	
SQX	B	-	-10/-16	-14/-19	7/4	6/7	7/8	6/5	12/18	63.6	65.7	54.6	45.3	50.8	50.8	<10	<10	<10	<10	
STZ	B	-	-7/-11	-2/5	-1/8	13/8	9/15	5/7	17/15	55.1	44.7	58.5	54.7	71.5	71.5	<20	<20	<20	<20	
Diaminopyrimidines																				
TRI	B	-	-10/-8	-18/-12	4/8	9/7	11/8	7/6	21/22	67.1	62.0	53.3	66.6	82.7	82.7	>20	>20	>20	>20	
Lincosamides																				
LIN	A	-	-14/-11	6/-8	-5/5	19/8	6/8	10/7	24/22	6.0	4.5	5.3	13.2	14.3	14.3	>20	>20	>20	>20	
Tetracyclines																				
CTC	B	-	7/-6	-17/-15	14/4	5/7	18/10	5/5	9/10	83.7	83.3	77.0	40.4	53.2	53.2	<10	<10	<10	<10	
DC	B	-	0/-9	-8/1	3/2	4/5	7/4	6/2	12/14	79.3	75.5	70.3	55.6	63.1	63.1	<10	<10	<10	<10	
OTC	B	-	-6/-10	-6/-2	16/12	10/6	23/11	11/7	18/14	83.3	83.2	77.8	66.1	86.3	86.3	<10	<10	<10	<10	
TC	B	-	-11/-9	-14/1	-1/6	13/6	9/6	10/3	17/24	77.8	86.8	73.9	62.4	81.0	81.0	<10	<10	<10	<10	
Nitrofurans																				
NIF	A	-	0/-2	-20/-15	14/6	9/7	11/5	2/2	12/17	10.0	23.4	16.1	12.1	15.9	15.9	<10	<10	<10	<10	
FTD	B	-	-14/-10	-18/-2	-14/13	18/14	10/15	6/4	19/22	78.9	68.7	67.6	54.6	101.7	101.7	>20	>20	>20	>20	
Pleuromutilins																				
TIA	A	-	-5/-11	-14/-8	10/3	9/4	9/9	4/4	12/16	1.6	1.4	0.6	7.8	8.3	8.3	<10	<10	<10	<10	
VAL	A	-	-5/-12	-8/-21	11/7	7/5	4/2	5/2	11/17	3.7	2.4	1.6	8.2	8.6	8.6	<10	<10	<10	<10	

^a Maximum permitted limit (MPL) established by Commission Directive 2009/8/EC

^b MPL for NCZ amended in Regulation (EU) 574/2011

^c First validation level/second validation level: 0.05/0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group A), 0.2/0.8 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group B), 0.5/2 $\mu\text{g g}^{-1}$ (group C)

^d Repeatability (RSD_r) and within-laboratory reproducibility (RSD_R)

^e Signal variability (RSD) within and between animal feed matrices

was calculated as the concentration at the y -intercept plus 2.33 times its standard deviation under within-laboratory reproducibility conditions.

$CC\beta$ is defined as the smallest content of the substance that may be detected, identified and/or quantified in a sample with an error probability of β . In the case of substances with an established permitted limit, the detection capability is the concentration at which the method is able to detect permitted limit concentrations with a statistical certainty of $1-\beta$. For banned compounds, $CC\beta$ is the minimum concentration at which the method can detect truly contaminated samples with an error probability of β . It is usually calculated from the signal of $CC\alpha$ plus 1.64 times the within-laboratory reproducibility standard deviation at this level. In the present paper, the within-laboratory reproducibility standard deviation obtained at the lowest validation level was used to calculate $CC\beta$. $CC\alpha$ and $CC\beta$ values were checked experimentally and are summarized in Table 4.

A comparison with the maximum permitted levels for coccidiostats indicated that the method is sensitive enough to prove the possible illicit presence of these drugs in animal feeds.

Matrix effects From the development of the method, the preliminary conclusion on matrix effects was that matrix-fortified standard curves (blank feed samples spiked before extraction) prepared from a single feed could be used to compensate for the matrix-related effects of any kind of feed. However, a comparison of the sets of calibration curves obtained in the accuracy study revealed significant differences in the slopes among feeds. Thus, unacceptable errors were obtained when cattle and poultry feeds were quantified against the pig feed matrix-fortified calibration curve instead of the curve prepared in the corresponding matrix. Consequently, the initial assumption that a single feed could be suitable for quantifying other feeds, even those intended for other animal species, was questioned. To address this issue, the variability in the signal due to matrix effects within and between animal feed matrices was evaluated in depth. Three different feeds for each species (three for pigs, three for cattle and three for poultry) were spiked at $2 \mu\text{g g}^{-1}$, and the relative standard deviation (RSD) of the measured peak areas was calculated for each feed matrix combination (e.g. pig/pig, pig/cattle, pig/poultry, cattle/cattle, cattle/poultry, etc.). The results of this study are summarized in Table 4. For some compounds, results are also depicted in Fig. S5 (Electronic Supplementary Material). Acceptable intra- and inter-species differences (<20 %) were obtained for 33 of the 50 target compounds. For another seven antimicrobials, variations of over 20 % were only noticed inter-species. The ten remaining analytes showed differences greater than 20 % both within and between animal feed species. Moreover, it is interesting to note that for some compounds strongly affected by matrix effects (OXO, FLU and NIF), relatively low variability among different feeds was

obtained (<10 %). Conversely, other compounds (TRI and AMP) exhibited both significant matrix effects and high variability both intra- and inter-species (>20 %). A third situation, less critical, was the case of antimicrobials (e.g. NAR, OLQ and LIN) showing a strong influence of the feed nature but with low matrix effects. Thus, it can be concluded that the variable composition of some individual feeds, even within those intended for the same animal species, can lead to sample extracts with high variations in matrix components and thus to different extents of ion suppression/enhancement for some of the target analytes.

Application to real samples

To evaluate the applicability of the method, 21 feed samples (nine for pigs, six for cattle and six for poultry) were analysed, which were received by the LAC from farms and feed mills. Results revealed that only three samples were free of any of the target compounds, whereas nine feeds were found to contain at least five antimicrobials, the most frequent being TIA, TYL and DC. Moreover, TRI, whose combination with sulfonamides results in a synergistic antibacterial effect, was detected in all feeds containing SDZ. All samples contaminated with coccidiostats were found to be compliant with the maximum permitted limits established by Directive 2009/8/EC. The antimicrobials detected, as well as their concentration levels, are summarized in Table S2 (Electronic Supplementary Material).

Conclusions

A fast and easy LC-MS/MS multiclass method was developed for the analysis of 50 antimicrobials in animal feeds. Dealing with the extensive matrix-related signal suppression or enhancement proved to be quite a challenge, since none of the clean-up strategies tested (SPE or d-SPE) minimized such detrimental effects. Thus, no clean-up was performed. For most of the target analytes, low matrix effects or no differences in matrix effects, either intra- or inter-species, were observed. In such cases, matrix-fortified calibration curves prepared from a single feed can be used for the quantification of any kind of feed samples. In contrast, for the few compounds that showed significant matrix effects with high intra- and inter-species variation, the more tedious, but accurate, standard addition method must be applied to ensure correct quantification.

The proposed method presents several advantages over previously reported multiclass approaches. A significant reduction in time and cost of analysis is achieved by avoiding a clean-up step, which allows for high sample throughput in routine laboratories involved in official controls. Moreover, a special effort was made to adjust the acquisition time windows, to allow the quantification of both positively and negatively ionized

compounds in a single injection. Lastly, a limited survey of real feeds demonstrated that positive feed samples were mainly contaminated by more than one class of antimicrobials. This highlights the usefulness of a multiclass approach to ensure the required quality of feeds reaching the market.

Acknowledgments Silvia Borràs acknowledges the Generalitat de Catalunya for an FI grant (grant number 2010FI_B00714).

References

- Alltech (2013) Global feed summary. <http://www.alltech.com/sites/default/files/2013-feed-tonnage-report.pdf>. Accessed May 2013
- European Medicines Agency (EMA) (2012) Sales of veterinary antimicrobial agents in 19 EU/EEA countries in 2010. Second European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) report. European Medicines Agency (EMA). http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2012/10/WC500133532.pdf. Accessed May 2013
- European Commission Directorate General for Health and Consumers (DG SANCO) (2010) Evaluation of the EU legislative framework in the field of medicated feed. Final report. Directorate General for Health and Consumers (DG SANCO). European Commission. http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/labelling/medicated_feed_report_20100224.pdf. Accessed May 2013
- European Commission Union (2009) Commission Directive 2009/8/EC amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in non-target feed. *Off J Eur L* 40:19–25
- McEvoy JDG (2002) Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Anal Chim Acta* 473(1–2):3–26
- European System Directorate General for Health and Consumers (DG SANCO) (2013) Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF portal database). <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal>. Accessed May 2013
- Borràs S, Companyó R, Granados M, Guiteras J, Pérez-Vendrell AM, Brufau J, Medina M, Bosch J (2011) Analysis of antimicrobial agents in animal feed. *TrAC Trends Anal Chem* 30(7):1042–1064
- Mol HGJ, Plaza-Bolaños P, Zomer P, de Rijk TC, Stolker AAM, Mulder PPJ (2008) Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrices. *Anal Chem* 80(24):9450–9459
- Cronly M, Behan P, Foley B, Malone E, Earley S, Gallagher M, Shearan P, Regan L (2010) Development and validation of a rapid multi-class method for the confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig and poultry compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 53(4):929–938
- Boscher A, Guignard C, Pellet T, Hoffmann L, Bohn T (2010) Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217(41):6394–6404
- van der Heeft E, Bolck YJC, Beumer B, Nijrolder AWJM, Stolker AAM, Nielen MWF (2009) Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis. *J Am Soc Mass Spectrom* 20(3):451–463
- Chico J, van Holthoof F, Zuidema T (2012) Ion suppression study for tetracyclines in feed. *Chromatography Research International* 2012:9. doi:10.1155/2012/135854, Article ID 135854
- European Feed Manufacturers' Federation (FEFAC) (2012) Feed & food: statistical yearbook 2011. European Feed Manufacturers' Federation (FEFAC) <http://www.fefac.eu/file.pdf?FileID=39499>. Accessed April 2013
- Martínez JL, Aguilera MM, Romero R, Garrido A (2009) Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 57(5):1760–1767
- Waters (2008) Waters Oasis HLB cartridges and 96-well plates. Care and use manual. <http://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf>. Accessed May 2013
- European Commission (2002) Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities L* 221:8–36
- European Commission (2004) Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules. *Off J Eur Union* 191:1–59
- European Commission (2009) Commission Regulation (EC) No 152/2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of feed. *Off J Eur Union* 54:1–130

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography–tandem mass spectrometry

S. Borràs, R. Companyó, J. Guiteras, J. Bosch, M. Medina and S. Termes

Table S1
Clean-up methods tested for the purification of feed extracts

	Method I	Method II	Method III
Cartridge/ sorbent	PSA (250 mg)	Oasis HLB (200 mg, 6 mL)	Oasis HLB (60 mg, 3 mL)
Condition		MeOH (6 mL) H ₂ O (6 mL)	MeOH (2 mL) H ₂ O (2 mL)
Load	Extract (5 mL)	Extract (5 mL) evaporated to 1 mL + H ₂ O (5 mL)	Extract (5 mL) evaporated to 1 mL + H ₂ O (5 mL)
Wash		H ₂ O (3 mL)	5 % MeOH in H ₂ O (2 mL)
Elution		MeOH (6 mL)	MeOH (2 mL)
	Vortex (1 min) + centrifugation (3,000 rpm, 10 min) + supernatant (3 mL) evaporated to 800 µl with N ₂ (45°C)	Eluate evaporated to 500 µl with N ₂ (45°C)	Eluate evaporated to 500 µl with N ₂ (45°C)
Dilution to 1.5 mL with 5 mmol L ⁻¹ formic acid			
Refrigeration overnight (4°C)			
Dilution of 300 µl with 900 µl of 5 mmol L ⁻¹ formic acid/MeOH (25/75, v/v)			
Filtration (0.22-µm) + LC-MS/MS injection			

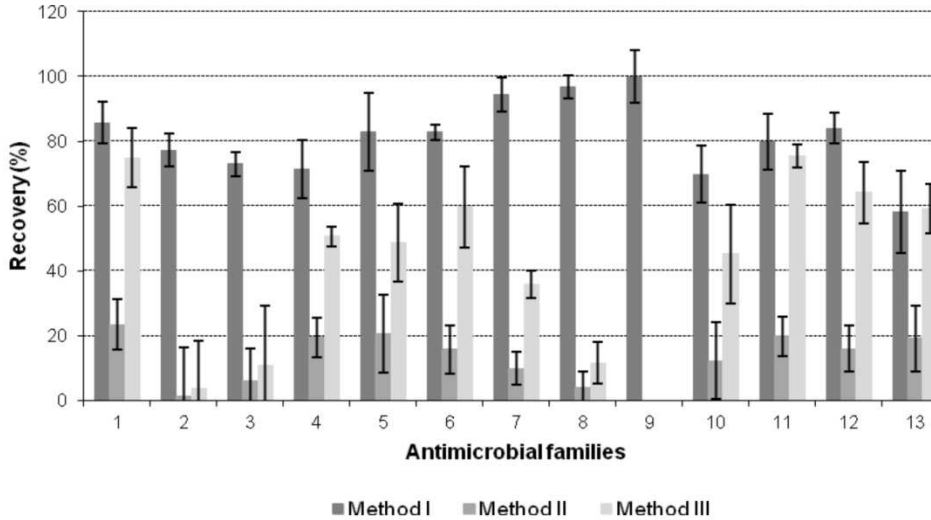


Fig. S1 Mean recoveries for the three clean-up methods tested in pig feed spiked at $2 \mu\text{g g}^{-1}$ for the 13 antimicrobial classes: (1) amphenicols; (2) benzimidazoles; (3) coccidiostats; (4) diaminopyrimidines; (5) lincosamides; (6) macrolides; (7) nitrofurans; (8) pleuromutilins; (9) polypeptides; (10) quinolones; (11) quinoxalines; (12) sulfonamides; (13) tetracyclines

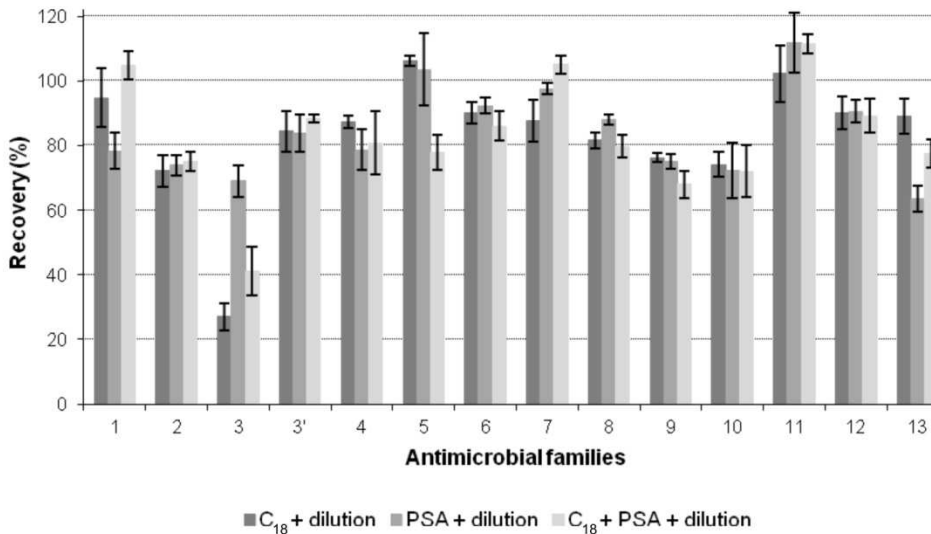


Fig. S2 Mean recoveries for the d-SPE sorbents tested in pig feed spiked at $2 \mu\text{g g}^{-1}$ for the 13 antimicrobial classes: (1) amphenicols; (2) benzimidazoles; (3) ionophore coccidiostats; (3') non-ionophore coccidiostats; (4) diaminopyrimidines; (5) lincosamides; (6) macrolides; (7) nitrofurans; (8) pleuromutilins; (9) polypeptides; (10) quinolones; (11) quinoxalines; (12) sulfonamides; (13) tetracyclines

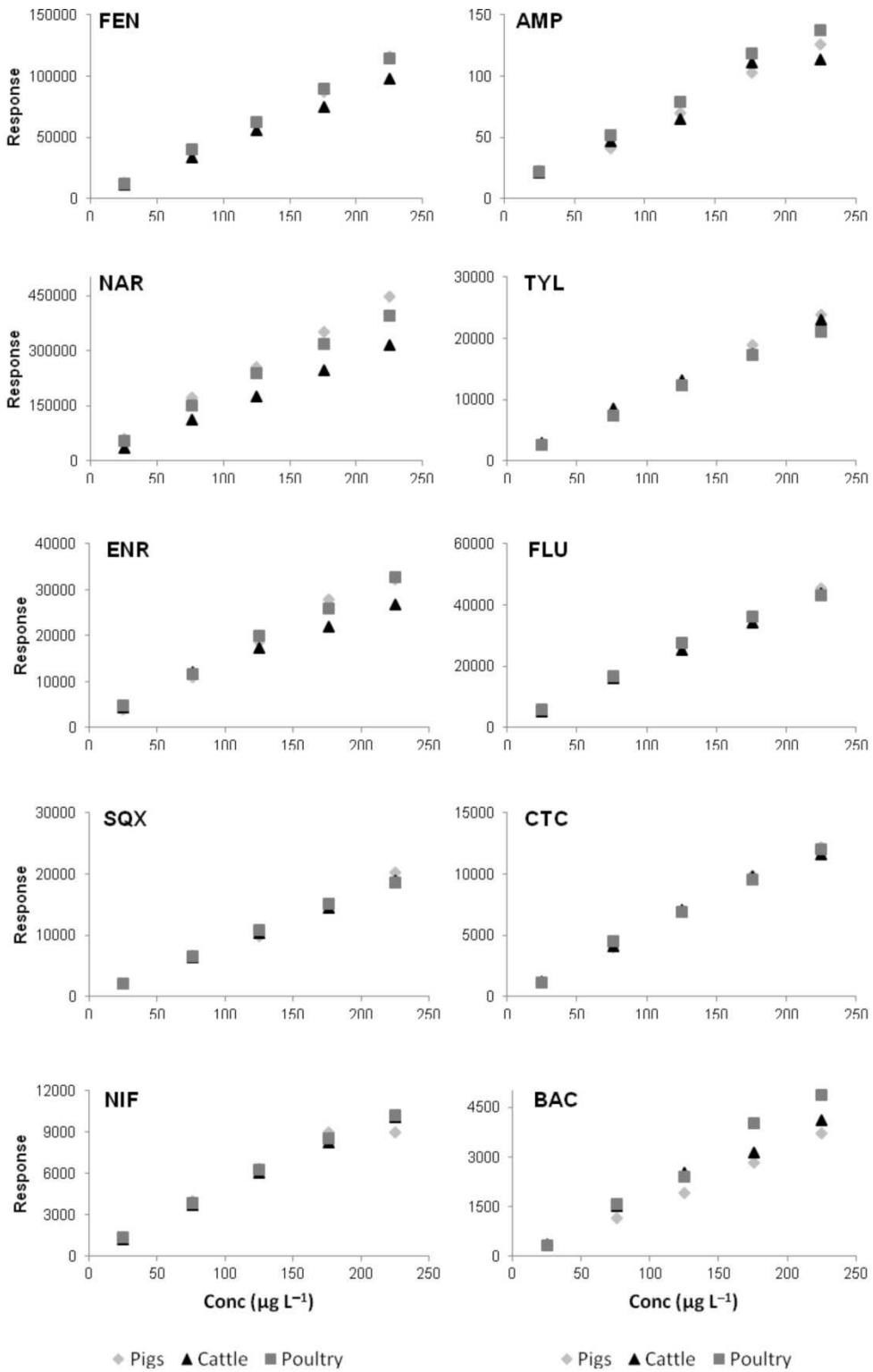
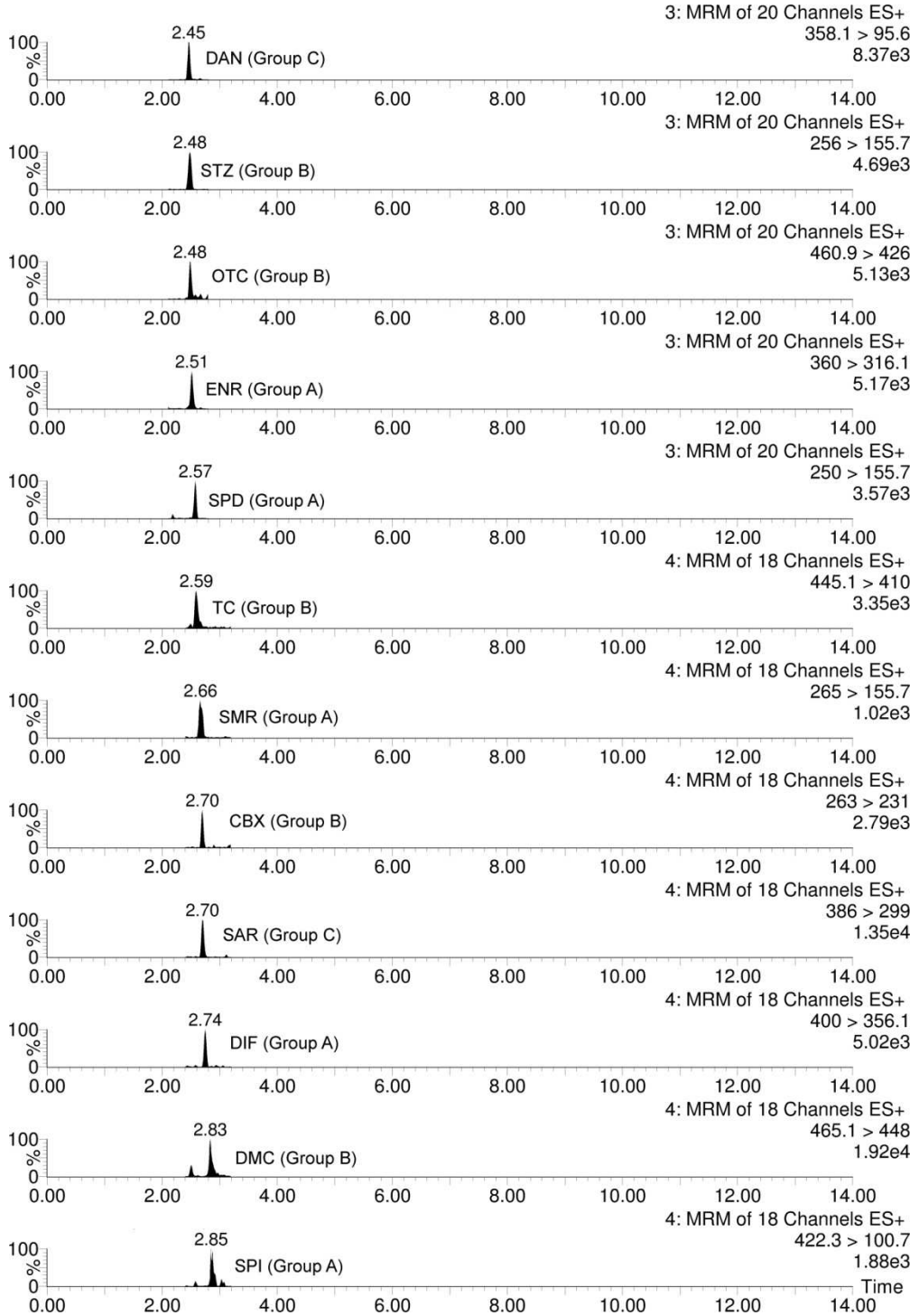
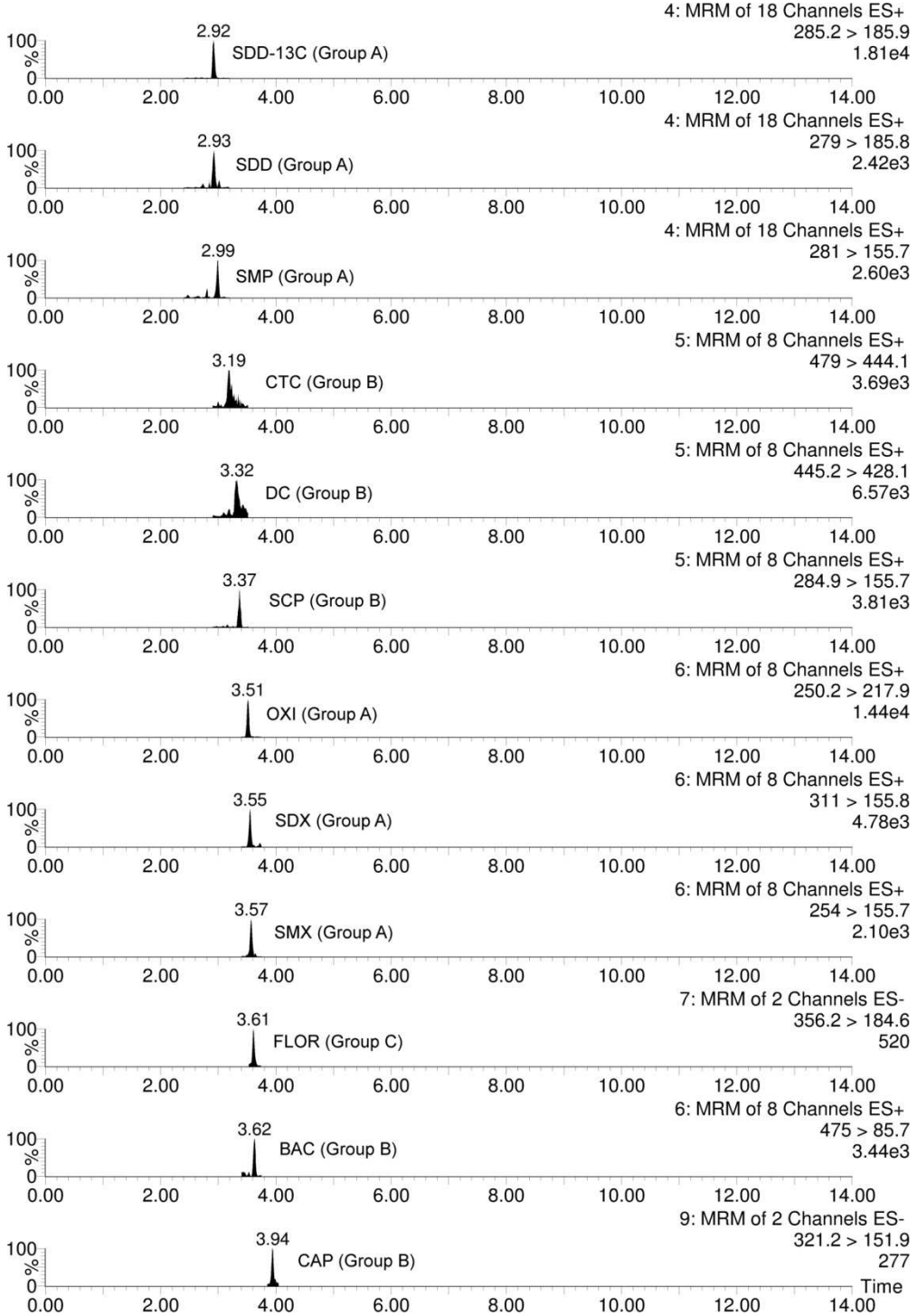
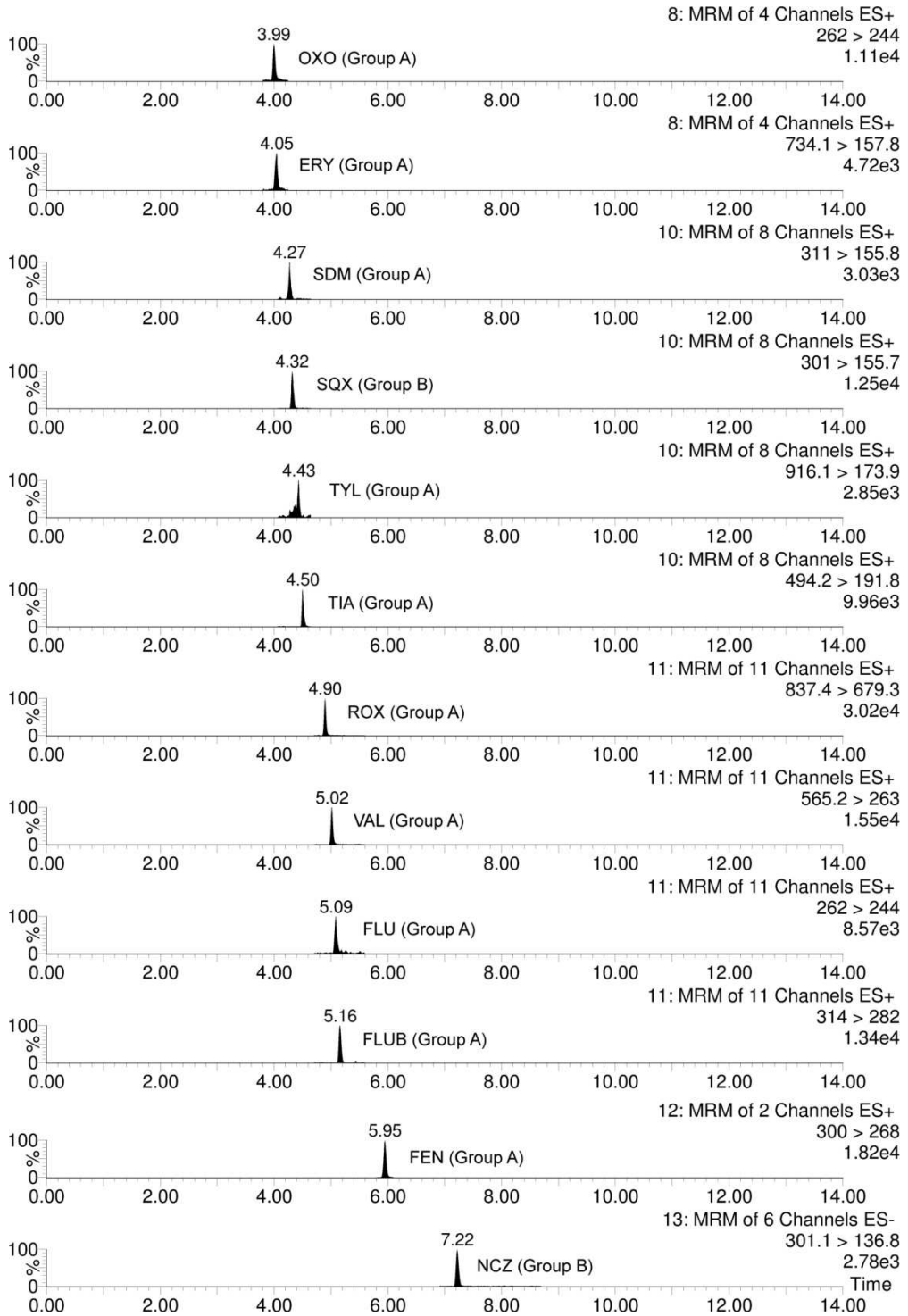


Fig. S3 Matrix-matched calibration curves for some of the target antimicrobials in the three feed matrices studied, in the range 25–225 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 5$)









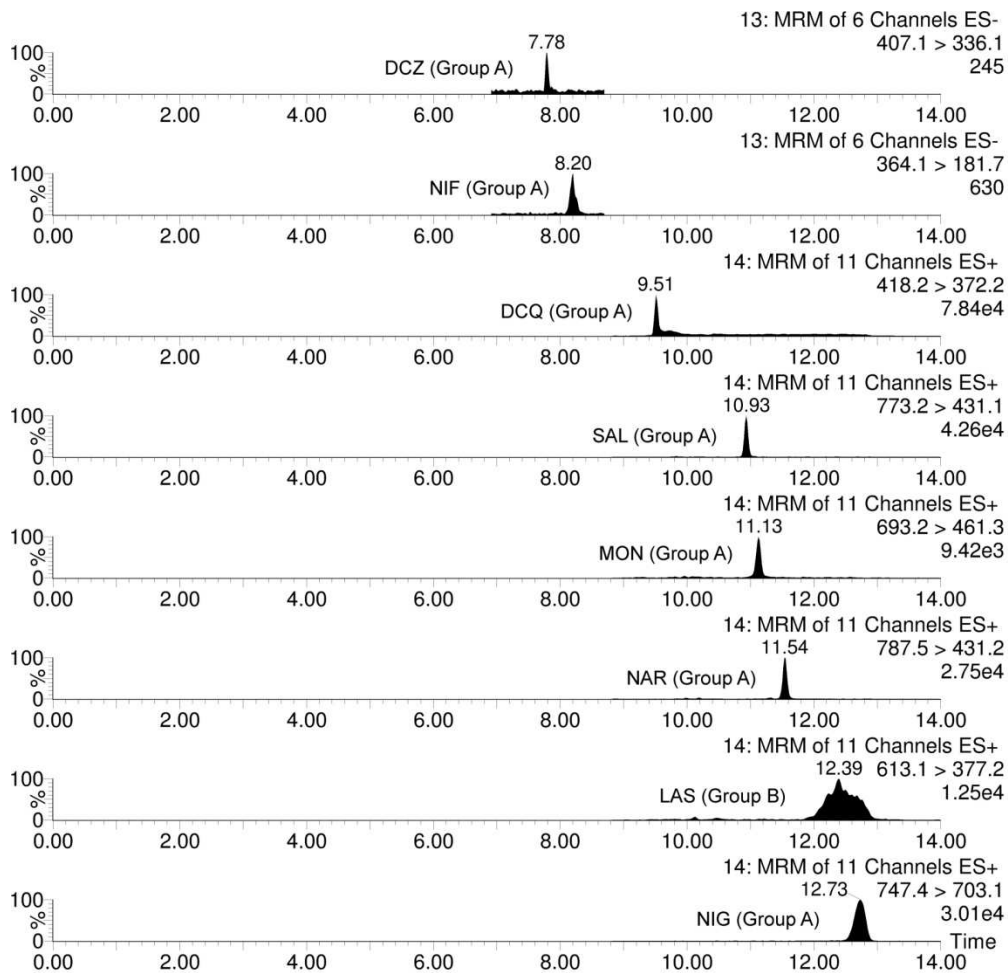
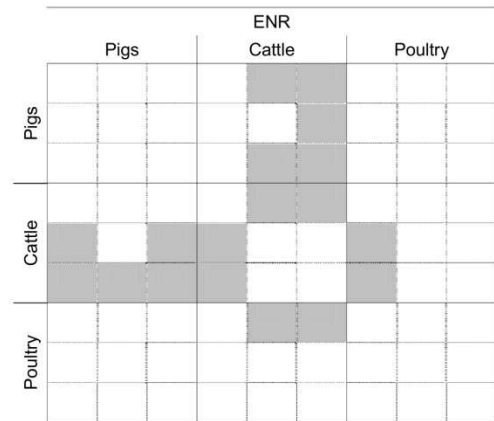
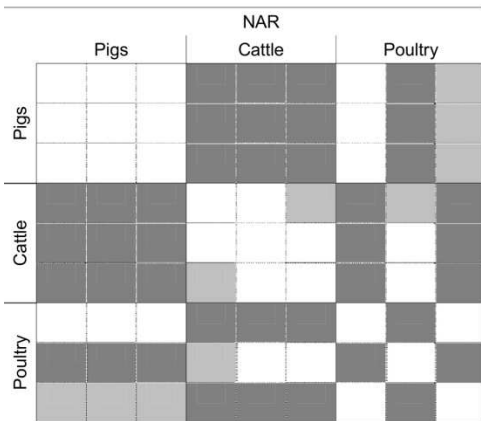
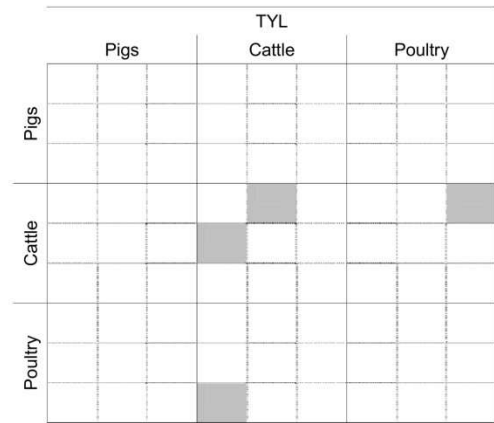
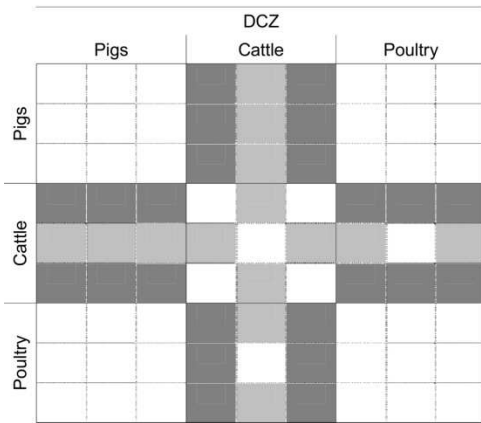
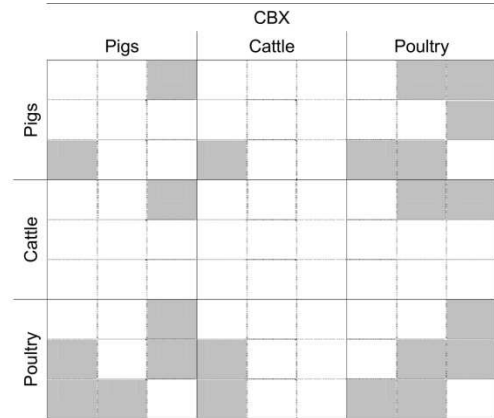
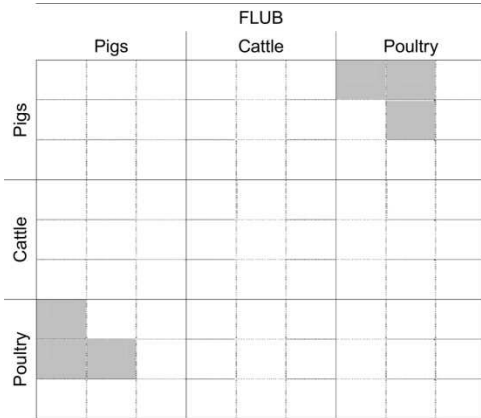
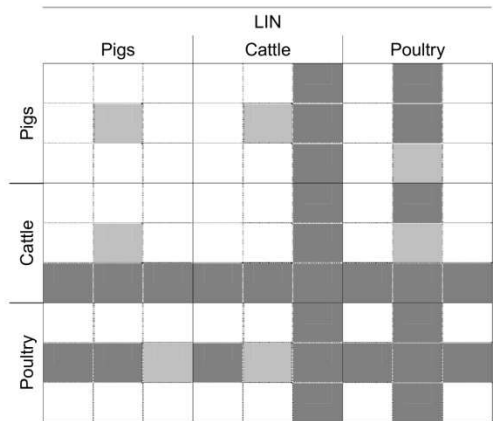
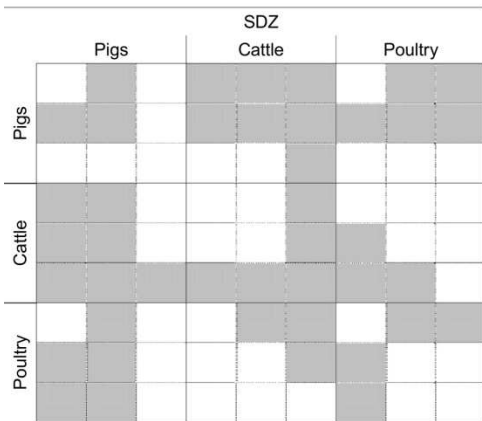
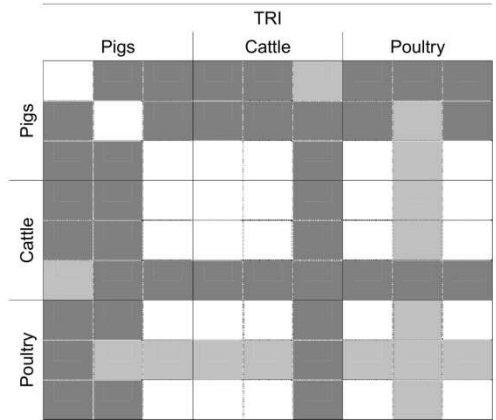
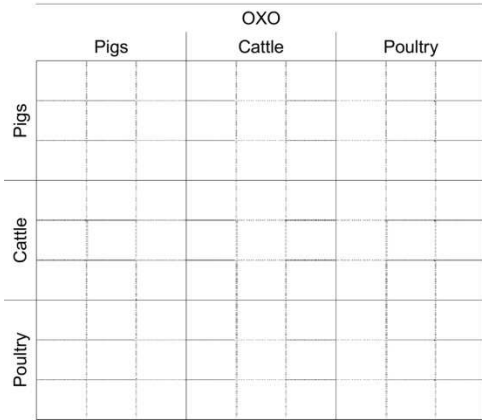
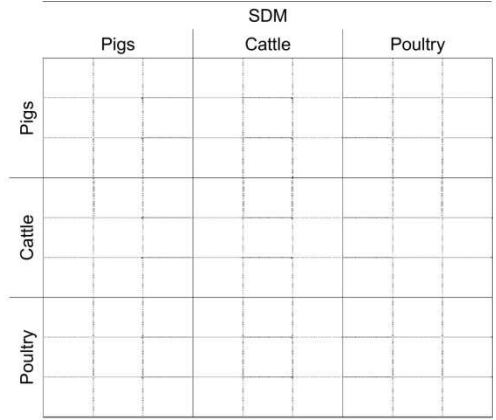
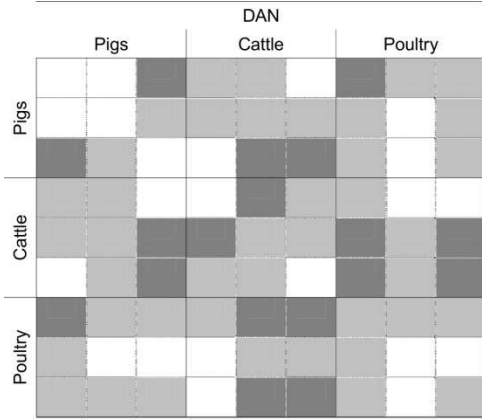


Fig. S4 MS/MS quantification transitions of the 50 analytes and the 6 surrogate standards obtained from the lowest concentration matrix-fortified standard in pig feed (group A: $0.025 \mu\text{g g}^{-1}$, group B: $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ and group C: $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$)

1)





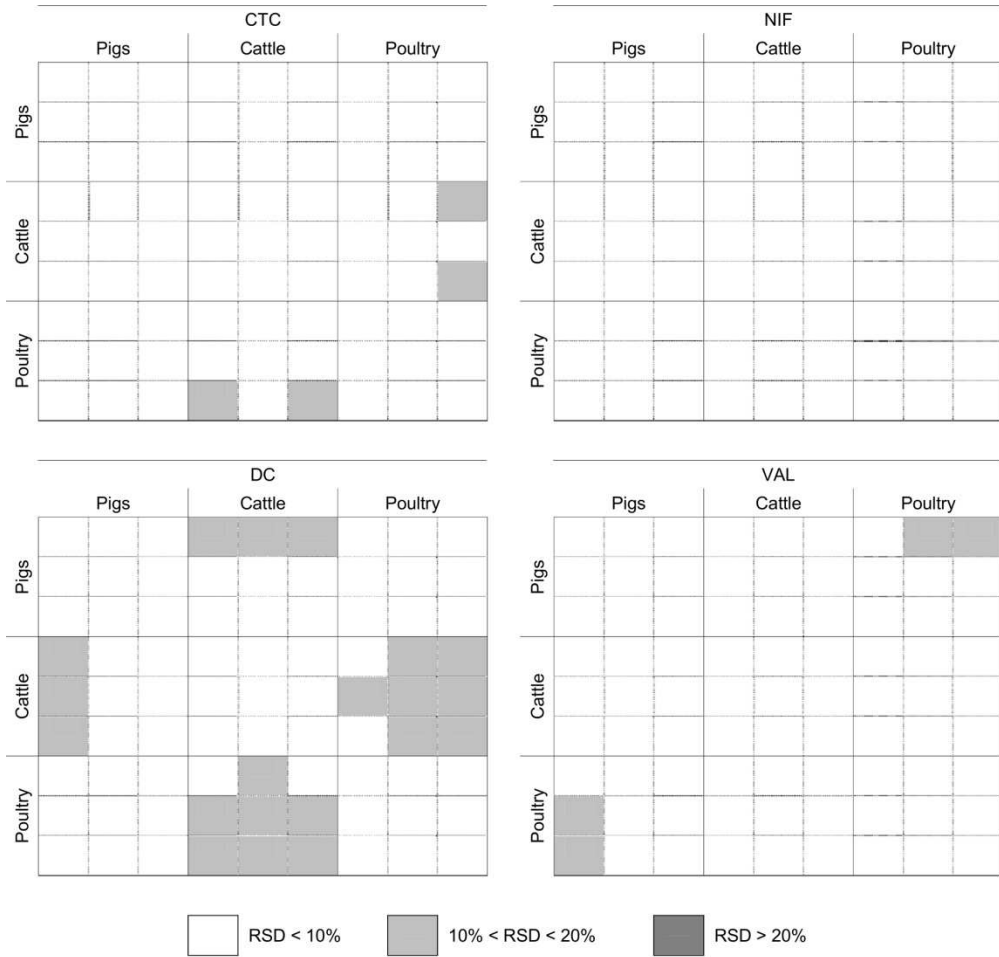


Fig. S5 Relative standard deviation (RSD) of the measured peak areas for each feed matrix combination spiked at $2 \mu\text{g g}^{-1}$

3.3.2. Discussió dels resultats

3.3.2.1. Dopatge de les mostres de pinso

Com en els dos mètodes desenvolupats anteriorment, s'ha avaluat la recuperació dels anàlits. No obstant, en aquest cas, atès l'elevat nombre d'agents antimicrobians considerats i l'àmplia varietat de pinsos estudiats, no ha resultat factible dopar les mostres amb els anàlits en estat sòlid tal com s'ha fet per a les sulfamides i les fluoroquinolones. Així doncs, com en la majoria de mètodes descrits a la bibliografia, el dopatge s'ha realitzat a partir de l'addició de quantitats conegudes de dissolucions patró dels anàlits a les diferents mostres de pinsos blancs (Taula 3.7).

Taula 3.7. Tipus de pinsos emprats durant el desenvolupament i la validació del mètode.

Porcí	Boví	Aviram
Porcs creixement	Vedells creixement	Gallines ponedores
Porcs engreix	Vedells engreix	Pollastres engreix
Truges gestants	Vaques	
Truges lactants	Vaques lleteres	
Garrins		

3.3.2.2. Tractament de mostra

En la Figura 3.12 es mostra l'esquema del mètode multiclasse desenvolupat. Ateses les diferents propietats fisicoquímiques de les famílies estudiades, l'establiment d'un mètode d'aquestes característiques requereix un tractament de mostra genèric i poc selectiu. Pel que fa a l'extracció, els agents antimicrobians tenen tendència a unir-se a certs components del pinso, especialment proteïnes i metalls. Així, l'ACN i el MeOH emprats tenen la doble funció de precipitar les proteïnes i extreure els anàlits, mentre que el tampó de McIlvaine-EDTA permet l'extracció eficient dels compostos més polars. El seu ús ha estat àmpliament descrit a la bibliografia per a l'extracció d'agents antimicrobians en aliments [188-198] i, en algunes ocasions, també en pinsos [116, 118, 129, 130, 143]. L'àcid cítric que conté i l'EDTA addicionat actuen com a agents complexants necessaris per tal de prevenir la unió

de certs agents antimicrobians, principalment tetraciclines, macròlids i quinolones, als metalls presents en el pinso.

Per a algunes de les famílies estudiades s'han addicionat, a l'inici del tractament de mostra, patrons interns (IS, *internal standard*). Per a les sulfamides, quinolones i coccidiostàtics no ionòfors s'ha seleccionat un patró marcat isotòpicament, mentre que en el cas de les tetraciclines, macròlids i coccidiostàtics ionòfors s'ha utilitzat un altre compost de la mateixa família (Figura 3.13). La verificació de les recuperacions dels IS (>70 %) en cadascuna de les mostres s'ha emprat per controlar l'eficiència del procés d'extracció durant l'aplicació del mètode.

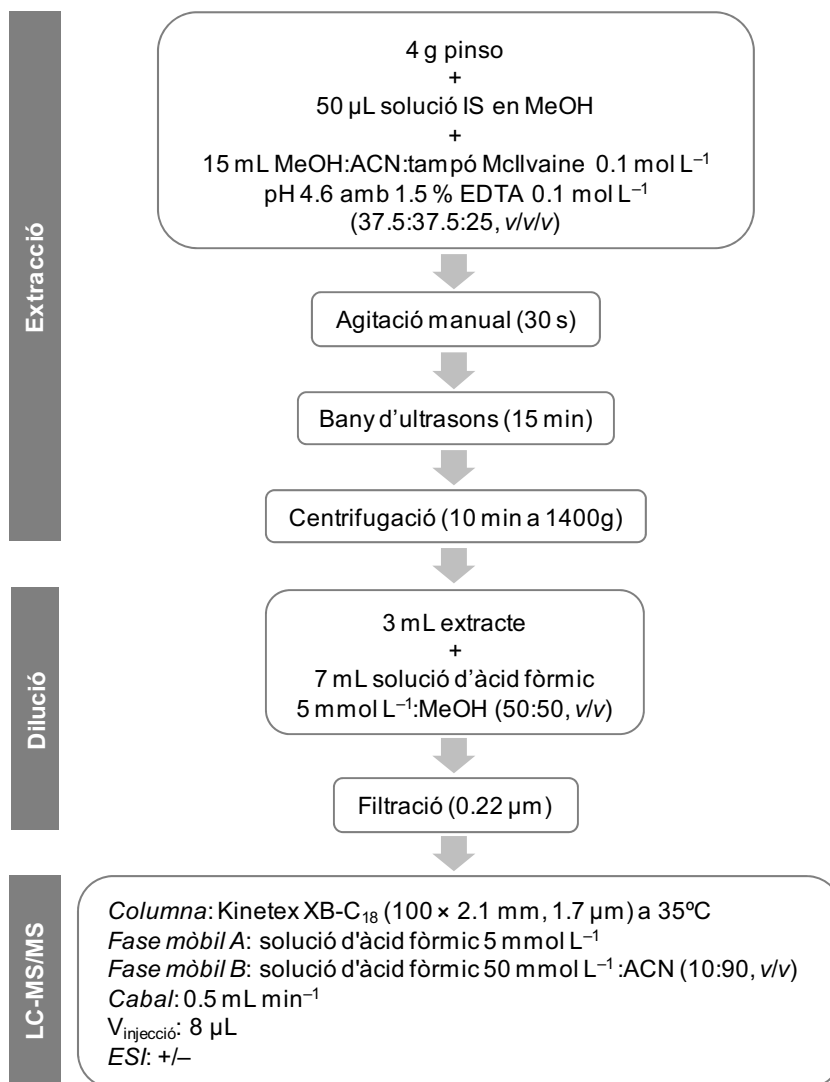
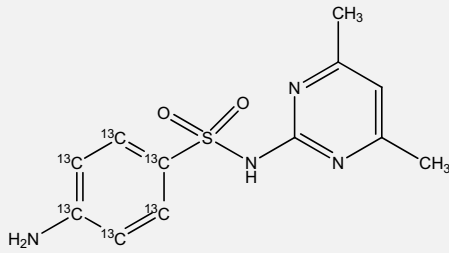
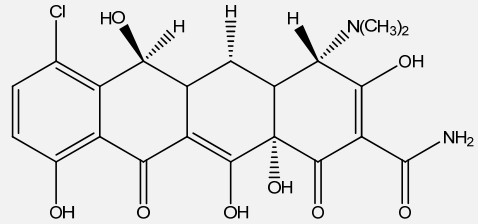


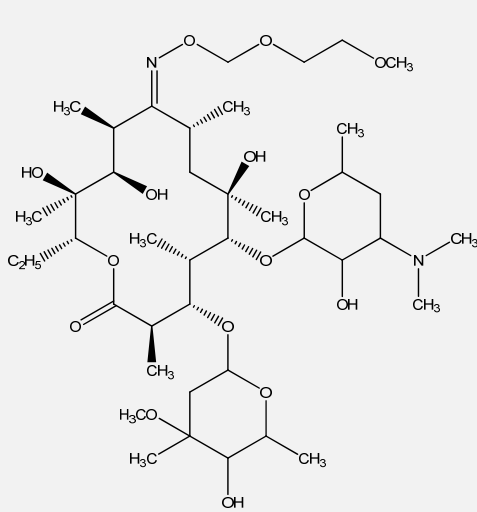
Figura 3.12. Esquema del procediment per a l'anàlisi de 50 agents antimicrobians en pinsos.

**Fenilsulfamidina-¹³C₆ (SDD-¹³C)**

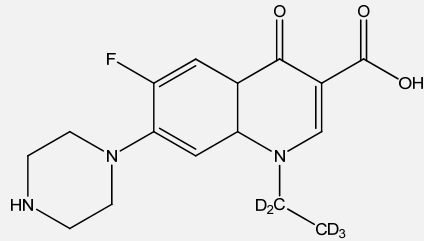
IS sulfamides

**Demeclociclina (DMC)**

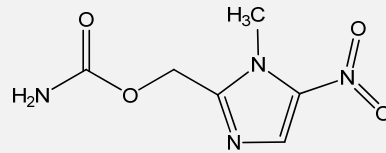
IS tetraciclins

**Roxitromicina (ROX)**

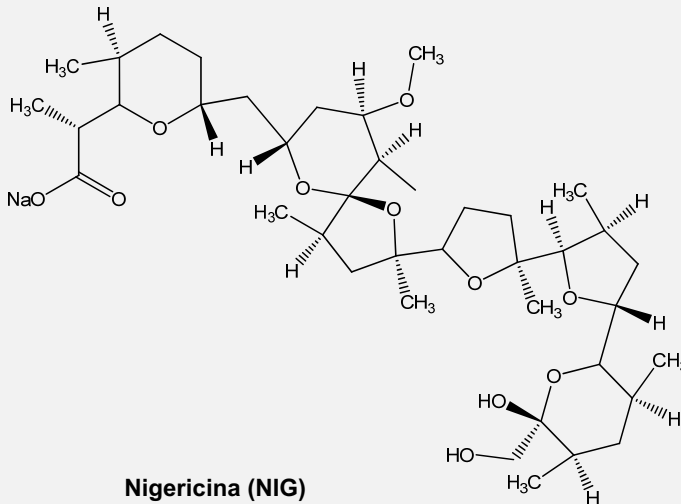
IS macròlids

**Norfloxacin-d₅ (NOR-d₅)**

IS quinolones

**Ronidazole-d₃ (RDZ-d₃)**

IS coccidiostàtics no ionòfors

**Nigericina (NIG)**

IS coccidiostàtics ionòfors

Figura 3.13. Estructura dels patrons interns.

Pel que fa al *clean-up* dels extractes, la SPE basada en l'ús de cartutxos HLB, molt estesa en el camp, ha resultat massa selectiva per a la diversitat d'anàlits inclosos en el mètode. La d-SPE proporciona, en canvi, millors recuperacions per a la majoria de les famílies d'agents antimicrobians considerades (*Figure S1* publicació IV). Les baixes o nul·les recuperacions obtingudes per a les tetraciclines i els coccidiostàtics ionòfors emprant PSA i C₁₈, respectivament (*Figure S2* publicació IV), també han estat observades en altres treballs [118, 135]. Aquests ho atribueixen a fortes interaccions entre el sorbent i els anàlits. En el cas dels coccidiostàtics ionòfors (MON, NAR, SAL i LAS), aquest comportament concorda amb el fet que siguin els compostos més retinguts en la columna cromatogràfica de fase estacionària C₁₈ emprada (entre 11-12.30 min). No obstant, la d-SPE no ha resultat eficient per a la reducció del efecte matriu observat (*Table 2* publicació IV). Així, per exemple, la mescla de sorbents (*Figure 1* publicació IV), l'augment de la quantitat de sorbent (*Figura 3.14*), la dilució de l'extracte abans de la d-SPE (*Figura 3.15*) o la congelació de l'extracte abans de la dilució per afavorir la precipitació dels lípids (*Figura 3.16*) no han contribuït a una disminució del efecte matriu respecte la simple dilució de l'extracte per la qual s'ha optat finalment.

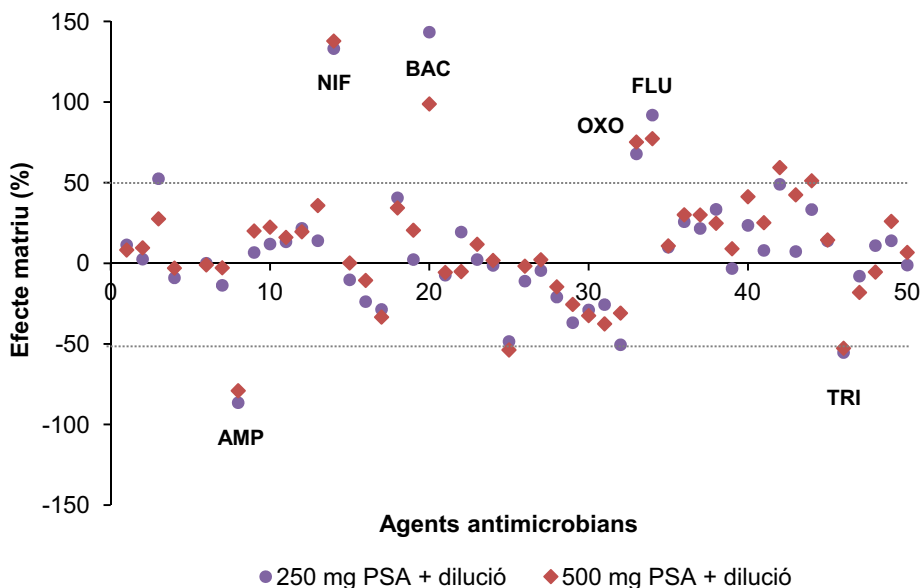


Figura 3.14. Efecte de la quantitat de sorbent emprada en la d-SPE en l'efecte matriu per a cada agent antimicrobià en extractes de pinso per a porcs dopats a $2 \mu\text{g g}^{-1}$.

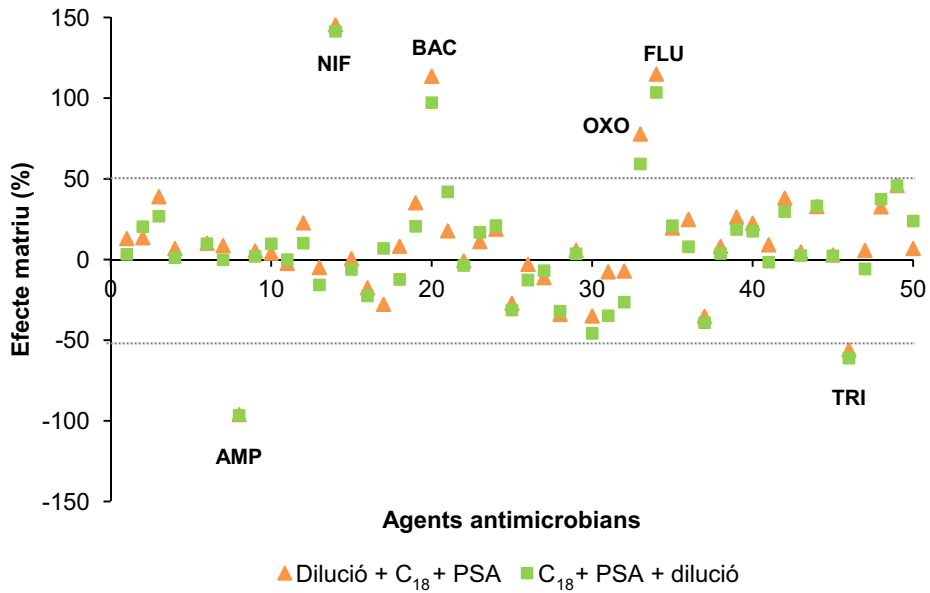


Figura 3.15. Efecte de la dilució, prèvia o posterior a la d-SPE, en l'efecte matriu per a cada agent antimicrobià en extractes de pinso per a porcs dopats a $2 \mu\text{g g}^{-1}$.

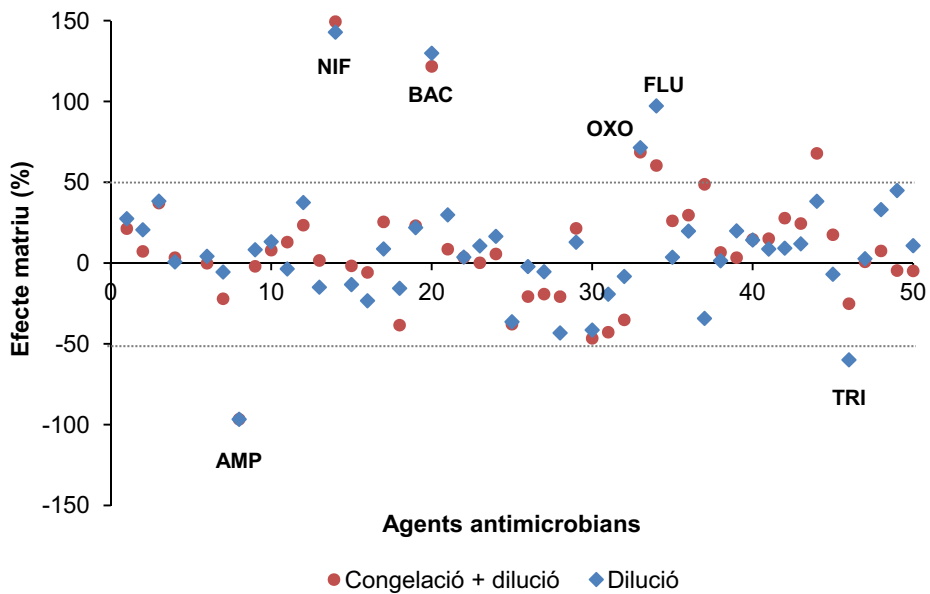


Figura 3.16. Efecte de la congelació de l'extracte prèvia a la dilució en l'efecte matriu per a cada agent antimicrobià en extractes de pinso per a porcs dopats a $2 \mu\text{g g}^{-1}$.

3.3.2.3. Determinació per LC-MS/MS

Per a la separació cromatogràfica, s'ha comparat novament l'eficàcia de dues columnes: una Acquity BEH C₁₈ convencional de partícules poroses i una Kinetex XB-C₁₈ de partícules de nucli sòlid, ambdues de la mateixa llargada, diàmetre i mida de partícula (100 x 2.1 mm; 1.7 µm). També en aquest cas, la columna Kinetex proporciona una millor resolució i un augment de la sensibilitat per a la majoria dels compostos. A la Figura 3.17 es mostren els cromatogrames corresponents als anàlits per als quals aquesta millora ha estat més significativa. Cal esmentar el comportament del LAS, el qual no elueix emprant la columna Acquity BEH C₁₈, però sí amb la columna Kinetex XB-C₁₈ (pic amb cua). Aquest comportament també ha estat observat recentment per d'altres autors en comparar les columnes Acquity BEH C₁₈ i Luna C₁₈ per a l'anàlisi de coccidiostàtics en ous per LC-MS/MS [199]. Aquests ho atribueixen a interaccions secundàries del LAS amb grups silanol residuals de la fase estacionària en la columna Acquity BEH C₁₈. La incorporació de dues cadenes laterals d'isobutil a la base de la cadena C₁₈ en la columna Kinetex XB-C₁₈ sembla ser més efectiva que els ponts d'etilè de la columna Acquity BEH C₁₈ en la reducció d'aquestes interaccions secundàries. D'altra banda, convé destacar que en aquest cas, en que s'utilitza un instrument d'UHPLC, l'ús de la columna de partícules de nucli sòlid no aporta una disminució significativa del temps d'anàlisi en comparació amb el guany obtingut habitualment amb els instruments d'HPLC convencionals.

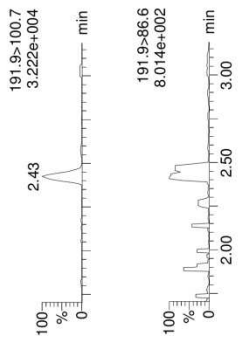
Pel que fa a la detecció per MS, s'ha monitorat una transició per als 6 IS i dues per cadascun dels 50 anàlits, és a dir, un total de 106 transicions. D'aquesta manera, s'obtenen 4 IP (1 per l'ió precursor i 1.5 per cada ió producte) per a la confirmació de cada anàlit d'acord amb la Decisió 2002/657/CE [151]. Com a ió precursor s'ha seleccionat l'ió que dona un senyal més intens. Per a la majoria dels compostos aquest correspon a l'ió molecular protonat $[M+H]^+$, si la ionització té lloc en ESI positiu, o desprotonat $[M-H]^-$ si aquesta es produeix en ESI negatiu. Per a la SPI i la BAC però, el senyal més intens correspon a l'ió doble i triplement protonat, $[M+2H]^{2+}$ i $[M+3H]^{3+}$, respectivament. Aquests també han estat detectats i seleccionats com a ions precursors per a aquests compostos en d'altres treballs [92, 118]. Pel que fa als coccidiostàtics ionòfors (MON, NAR, SAL i LAS), la formació d'adductes amb cations sodi $[M+Na]^+$ presents com a impureses en els solvents emprats com a modificadors orgànics de la fase mòbil també ha estat àmpliament

reportada en altres estudis [110, 118, 120, 126, 127, 132, 135, 137]. En el cas del DCZ, atès que la molècula conté 3 àtoms de Cl i que aquest té dos isòtops estables (^{35}Cl i ^{37}Cl) l'elecció de dos ions precursors diferents és el més habitual [101, 120, 126]. Els ions m/z 405 i 407 es corresponen amb les dues combinacions d'isòtops amb una abundància natural més elevada: 41.7 % $^{35}\text{Cl}_2$ ^{37}Cl i 43.5 % $^{35}\text{Cl}_3$. Únicament en el cas de l'AMP s'ha seleccionat com a ió precursor un fragment resultant del trencament del grup metilpiridina [200]. D'altra banda, les fragmentacions observades per a algunes de les famílies es corresponen també amb les descrites en d'altres publicacions:

- *Quinolones*: en el cas de l'OXO i la FLU l'ió producte majoritari prové de la pèrdua de H_2O del grup carboxil en posició 3, mentre que per a les piperazinil fluoroquinolones l'ió majoritari s'origina per la pèrdua de CO_2 del mateix grup (DIF, ENR, CIP), seguida en alguns casos (NOR i SAR) de la fragmentació de l'anell piperazinil ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$) [201].
- *Sulfamides*: es detecten dos fragments característics corresponents al grup *p*-sulfoanilina (m/z 156) seguit de la pèrdua del grup sulfonil (m/z 92) [201].
- *Tetraciclines*: s'observa la pèrdua de NH_3 (DC) o de NH_3 i H_2O (CTC, OTC i TC) [201].
- *Coccidiostàtics no ionòfors*: els fragments més intensos pel DCZ, el DCQ i el CLOP corresponen a la pèrdua de dos àtoms de clor, al trencament de l'èster i a la fragmentació de l'anell aromàtic per l'àtom de N, respectivament [199, 202]. Per a la NCZ, consistent en una mescla equimolar de 2-hidroxí-4,6-dimetilpirimidina i 4,4'-dinitrocarbanilida, aquesta última és seleccionada com a ió precursor i el seu producte majoritari es genera per la fragmentació del grup amida [101, 120, 126, 200].

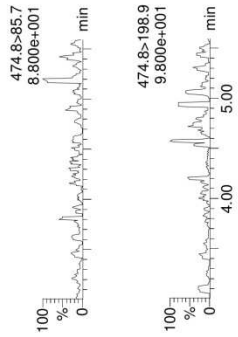
A)

Clopidol (ES+)

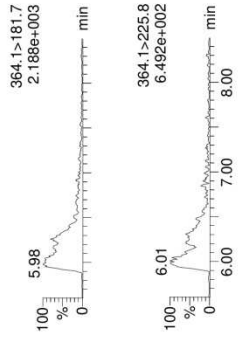


0.05 µg mL⁻¹

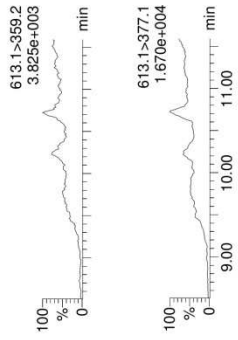
Bacitracina (ES+)



Nifursol (ES-)

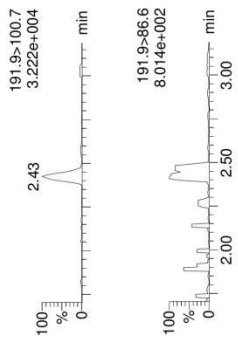


Lasalocid (ES+)

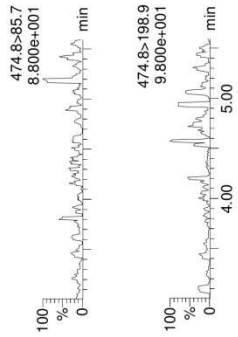


0.5 µg mL⁻¹

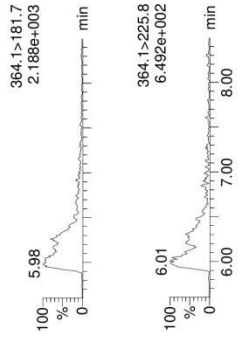
Clopidol (ES+)



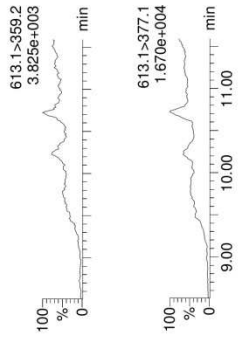
Bacitracina (ES+)



Nifursol (ES-)

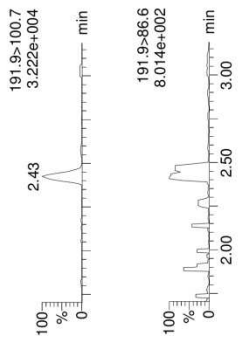


Lasalocid (ES+)

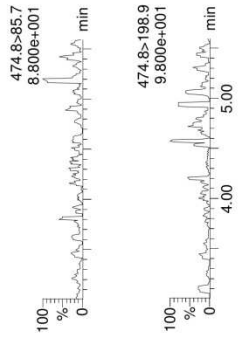


1 µg mL⁻¹

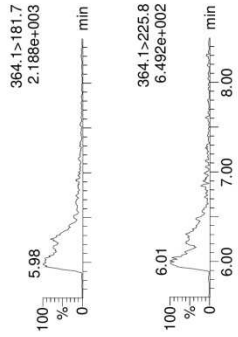
Clopidol (ES+)



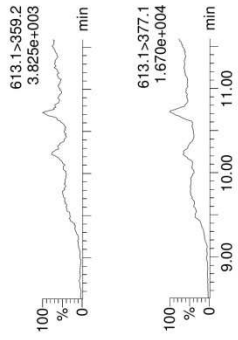
Bacitracina (ES+)



Nifursol (ES-)



Lasalocid (ES+)



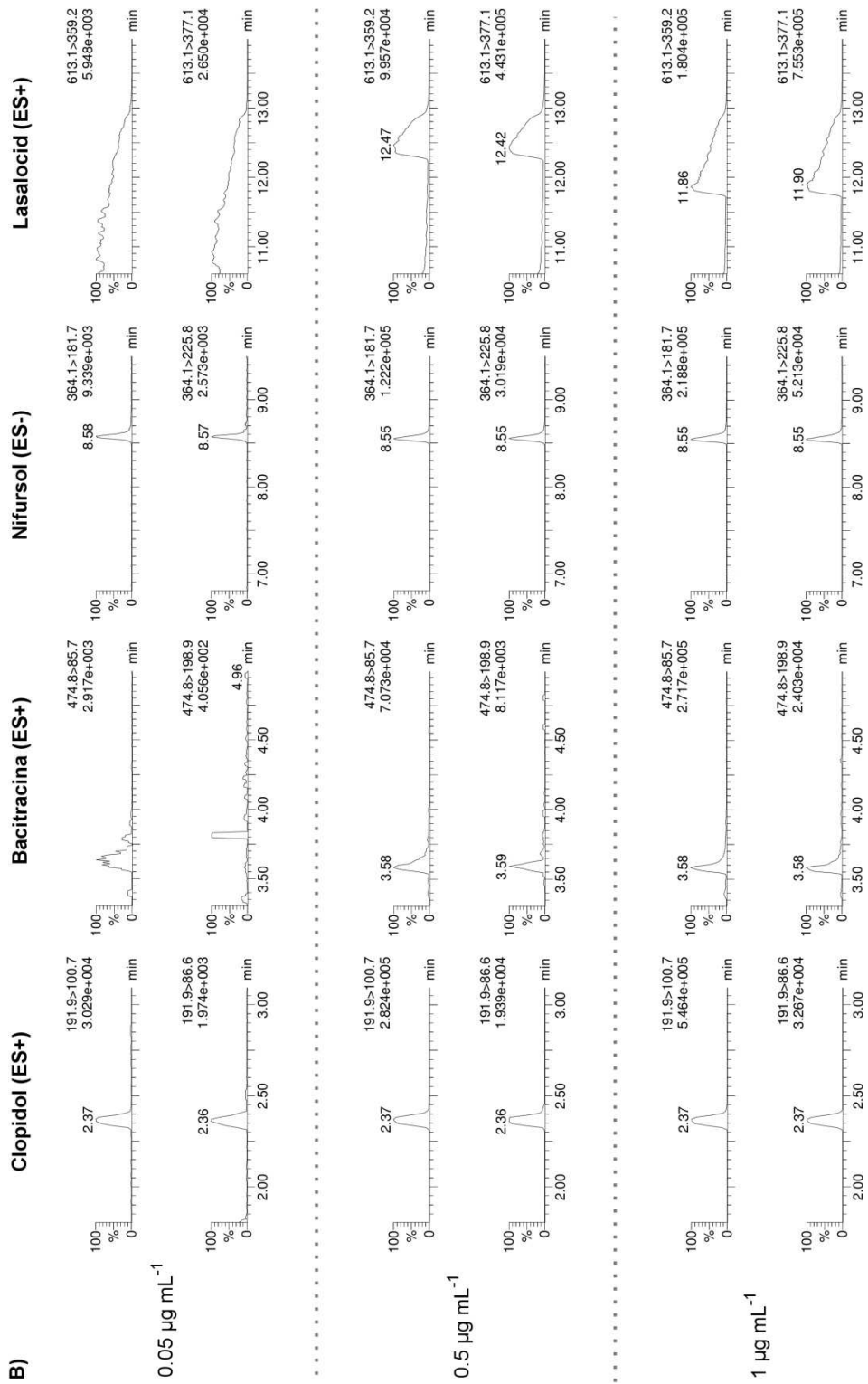


Figura 3.17. Cromatogrames de patrons en solució (56 anàlits) a diferents concentracions obtinguts amb la columna: (A) Acquity BEH C₁₈ i (B) Kinetex XB-C₁₈.

En el desenvolupament del mètode MRM, l'elevat nombre de compostos a determinar, així com la detecció simultània en ESI positiu i negatiu, ha obligat a definir diverses finestres d'adquisició basades en el temps de retenció dels anàlits. L'optimització dins de cada segment de temps ha requerit trobar el compromís entre el nombre de transicions a monitorar, la llargada dels *dwell times* i el nombre de punts al llarg dels diferents pics cromatogràfics, paràmetres que afecten a la repetibilitat i la sensibilitat del mètode. A tot això cal afegir el solapament inevitable de diferents finestres ja que, tot i els nombrosos gradients d'elució provats, una gran part dels anàlits (37 de 56) elueixen en un interval de temps relativament curt (2 min). Aquest fet resulta especialment crític quan es dona el solapament entre finestres de diferent polaritat de la font d'ionització ja que el canvi requereix un mínim de temps (*inter-scan time*) quatre vegades superior al necessari entre segments de la mateixa polaritat (0.02 s vs. 0.005 s). Com a conseqüència, l'establiment del mètode MRM ha requerit una optimització exhaustiva i una inversió de temps considerable. Finalment, aquest consta de 14 finestres d'adquisició, cadascuna de les quals inclou entre 2-20 transicions (Figura 3.18).

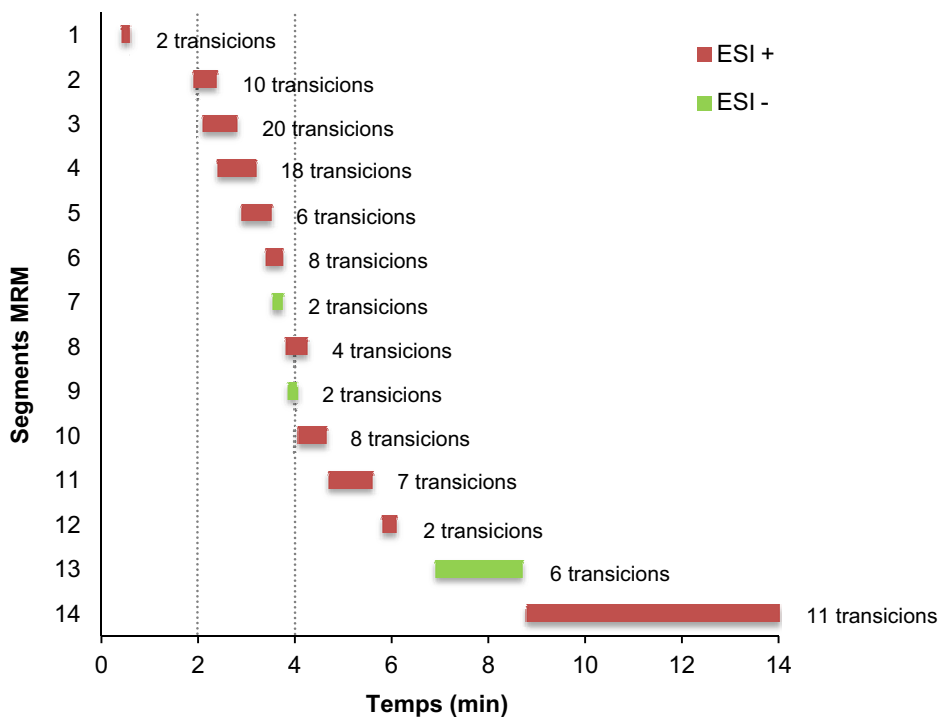


Figura 3.18. Mètode d'adquisició MRM programat.

3.3.2.4. Calibratge i quantificació

L'efecte matriu observat en la detecció per MS, més o menys significatiu en funció de l'anàlit, ha resultat el principal inconvenient per a una quantificació acurada de les mostres. Per tal de compensar-lo s'ha emprat el calibratge *matrix-fortified*. No obstant, l'estudi de diferents tipus de pinsos ha mostrat que per a certes combinacions d'anàlit/matriu la variabilitat en la seva composició dóna lloc a variacions significatives en l'efecte matriu, tant entre pinsos destinats a la mateixa com a diferents espècies animals (Taula 3.8). En aquests casos, no és possible emprar una matriu de pinso com a representativa en el calibratge *matrix-fortified* per a la quantificació d'altres tipus de pinso i, per tant, es proposa l'ús de l'addició estàndard per a la correcta quantificació de les mostres positives a aquests compostos. En comparació amb els altres dos mètodes desenvolupats basats en la LC-FL, l'acoblament LC-MS/MS proporciona LOD i LOQ significativament inferiors per a totes les sulfamides i fluoroquinolones (excepte CIP, DAN i SAR) (Taula 3.9).

Taula 3.8. Variació (RSD, de *relative standard deviation*) en el senyal mesurat entre pinsos destinats a la mateixa o a diferents espècies animals.

		RSD interespècie (%)						
		<10			<20		>20	
RSD intraespècie (%)	<10	CTC	OXO	SPD	DC	OTC		
		DIF	SAR	SPI	FEN	SQX		
		ERY	SDD	TIA	OXI	TC		
		FLU	SDM	TYL				
		FLUB	SDX	VAL				
		NIF	SMX					
	<20				CBX	SCP	BAC	MON
					CLOP	SDZ	CAP	SAL
					ENR	SMP	DCQ	
				NCZ	SMR	DCZ		
				NOR	STZ	FLOR		
>20						AMP	LIN	
						CIP	MAR	
						DAN	NAR	
						FTD	OLQ	
						LAS	TRI	

Taula 3.9. Sensibilitat per als anàlits en comú dels mètodes analítics desenvolupats en aquesta tesi.

Anàlits		LC-FL		LC-MS/MS	
		LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)
Sulfamides	SDZ	20	60	16	53
	SMP	40	130	3	10
	SCP	60	210	18	58
	SDX	40	130	7	23
	SMX	40	120	4	15
	SDM	30	90	3	9
	SQX	100	340	17	55
Fluoroquinolones	MAR	105	350	16	54
	CIP	45	150	50	168
	DAN	6	20	47	158
	ENR	25	80	5	17
	SAR	45	150	52	172
	DIF	25	80	4	12

D'acord amb la bibliografia revisada, a l'inici d'aquest treball únicament s'havien proposat tres mètodes multiclasse per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos [78, 118, 119]. Fins al moment, s'han publicat tres treballs més, fet que posa de manifest la necessitat existent en el camp de disposar de mètodes que cobreixin un gran nombre i diversitat d'anàlits [133, 134, 136]. Aquests es basen en la LC acoblada a la MS/MS o la HRMS i permeten el cribratge i/o la confirmació d'entre 11 i 81 agents antimicrobians ja sigui amb finalitat quantitativa o qualitativa (Taula 3.10). Tots els mètodes descriuen també un important efecte matriu, independentment de que duguin a terme o no una etapa de *clean-up*, el qual es compensa emprant el calibratge amb patrons *matrix-matched* o *matrix-fortified*. Tanmateix, en els pocs casos en que s'han analitzat diferents tipus de pinsos també s'ha observat variabilitat en l'efecte matriu i es planteja l'ús de l'addició estàndard [118, 134] o bé un calibratge *matrix-matched* específic per a cada tipus de pinso [133]. En aquest sentit, el present treball és el que ha considerat fins al moment una major diversitat de pinsos, tant intra com interespècie, en l'avaluació de l'efecte matriu.

Taula 3.10. Mètodes multiclasse basats en la cromatografia de líquids per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos.

Nombre d'agents antimicrobians	Mètode	ESI	Analitzador	Validació		LOD (ng g ⁻¹)	LOQ (ng g ⁻¹)	Ref.
				Pinso	Calibratge			
10	Confirmació (quantitatiu)	+/-	MS/MS	Porcs	<i>Matrix-fortified</i> (IS)	n.e.	n.e.	[119]
14	Confirmació (qualitatiu)	+/-	MS/MS	Aus	–	–	–	
27	Cribratge (qualitatiu)	+	Q-TOF	Peixos	–	20-100	–	[136]
33	Confirmació (quantitatiu)	+/- ^a	MS/MS	Porcs Bovins Ovins	<i>Matrix-matched</i> (IS)	n.e.	4-65	[118]
48	Confirmació (quantitatiu)	+/-	Orbitrap	Porcs	<i>Matrix-matched</i> (IS)	10	25-100	[134]
50	Confirmació (quantitatiu)	+/-	MS/MS	Porcs Aviram Bovins	<i>Matrix-fortified</i>	0.1-71	0.2-238	^b
62	Cribratge (quantitatiu)	+	MS/MS	Èquids	<i>Matrix-matched</i>	10-50	n.e.	[78]
	Cribratge (qualitatiu)	+	TOF		–	–	–	
81	Confirmació (quantitatiu)	+/-	Q-TOF	Aus Conills Èquids	<i>Matrix-matched</i>	n.e.	4-200	[133]

^a Una injecció diferent per cada polaritat.

^b Publicació IV.

n.e.: no especificat.

3.4. Correlació d'ions en espectrometria de masses d'alta resolució

A continuació es presenta el treball realitzat en el marc d'una estada al grup d'anàlisi de medicaments veterinaris de l'*Official Food Control Authority of the Canton of Zürich* (KLZH, de *Kantonales Labor Zürich*), sota la supervisió del Sr. Anton Kaufmann. El KLZH és l'organisme responsable de la inspecció dels aliments que es produeixen i comercialitzen al cantó de Zuric (Suïssa). Concretament, du a terme el control de la contaminació química i microbiològica dels aliments, productes derivats i materials en contacte amb els aliments. L'activitat principal del grup és la vigilància de residus de medicaments veterinaris en matrius alimentàries (carn, peix, mel, etc.). Aquest centre és, juntament amb l'*Official Food Control Authority of the canton of Genève*, el laboratori de referència de Suïssa pel que fa a l'anàlisi d'agents antimicrobians. Això inclou l'anàlisi de mostres preses dins el pla nacional de control de residus (productors locals i mercats de la ciutat) i el programa d'inspecció fronterer (Aeroport de Zuric). Els mètodes emprats es basen en la LC acoblada a la MS/MS (QqQ) i la HRMS (Orbitrap). Paral·lelament al treball de rutina i al desenvolupament i la constant millora dels mètodes analítics establerts, el grup es centra també en activitats d'investigació aplicada. Aquestes inclouen, entre d'altres, l'estudi i la interpretació dels processos d'ionització i fragmentació que tenen lloc en MS, el tractament i processament de dades d'espectres i estratègies per a l'elucidació estructural de compostos detectats per HRMS [203-205]. És en aquest últim camp en el qual s'ha centrat el treball realitzat.

Des de la seva primera descripció l'any 2000 i la seva introducció comercial al 2005, l'analitzador de masses d'alta resolució Orbitrap ha estat emprat principalment en el camp de la proteòmica i la metabolòmica [206]. No obstant, ateses les seves elevades prestacions de selectivitat i exactitud de massa, en els darrers anys ha esdevingut una tècnica emergent també en el camp de la seguretat alimentària, competint cada vegada més amb els instruments de QqQ en els laboratoris d'anàlisi de rutina. Un espectròmetre de masses *Exactive™*, que incorpora un analitzador Orbitrap, permet la fragmentació dels ions entrants (AIF, *all ion fragmentation*) i la detecció dels ions producte generats amb una major sensibilitat i selectivitat que la MS/MS (Figura 3.19). No obstant, a diferència d'aquesta, no permet la selecció d'ions precursors i com a conseqüència, els ions producte no poden ser assignats a l'ió precursor del qual deriven. L'obtenció d'aquesta informació permetria, al igual que l'escombratge d'ions precursors en MS/MS (*precursor ion scan*), la detecció de

famílies de compostos que en fragmentar-se generen ions producte característics. D'altra banda, atès que el nombre de composicions elementals possibles disminueix exponencialment amb la m/z , la localització de fragments podria facilitar l'elucidació de la composició elemental de compostos desconeguts per a la seva possible identificació. Tanmateix, l'elucidació de l'ió precursor que produeix un determinat fragment o la identificació d'ions producte generats per un mateix precursor és un procés complex ja que l'usuari ha de considerar centenars de possibles ions, la majoria d'ells relacionats amb compostos endògens provinents de la matriu.

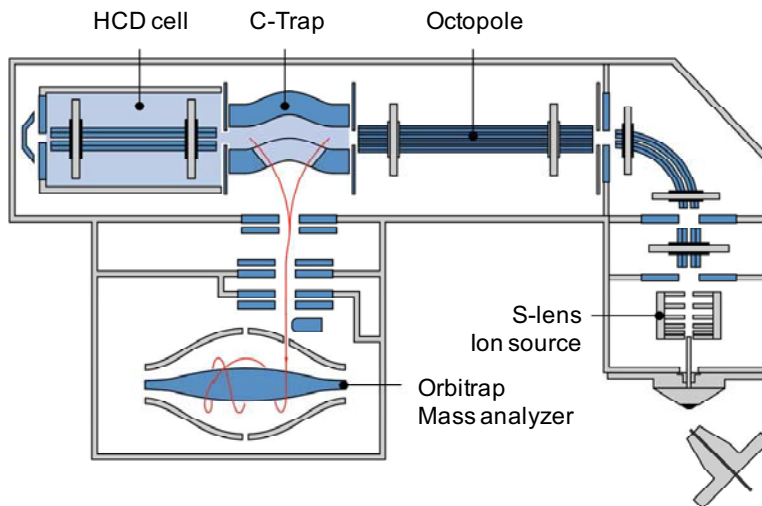


Figura 3.19. Esquema d'un espectròmetre de masses *Exactive™* (Thermo Scientific) [207].

En aquest context, l'objectiu del present treball ha estat el desenvolupament d'un algoritme basat en la correlació dels ions que permeti establir aquesta relació entre ions precursor i ions producte. Les instruccions per al processament de les dades s'han agrupat en una macro per a que puguin ser executades de manera automàtica i seqüencial mitjançant una sola ordre. El llenguatge de programació emprat ha estat el Visual Basic per a Aplicacions (VBA, *Visual Basic for Applications*) dins l'entorn de *Microsoft Office Excel*.

Els resultats d'aquest treball s'han recollit en la següent publicació: *Correlation of precursor and product ions in single-stage high resolution mass spectrometry. A tool for detecting diagnostic ions and improving the precursor elemental composition elucidation*. *Analytica Chimica Acta* 2013, 772(0), 47-58.

3.4.1. Publicació V. Correlation of precursor and product ions in single-stage high resolution mass spectrometry. A tool for detecting diagnostic ions and improving the precursor elemental composition elucidation

Analytica Chimica Acta 772 (2013) 47–58



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

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



Correlation of precursor and product ions in single-stage high resolution mass spectrometry. A tool for detecting diagnostic ions and improving the precursor elemental composition elucidation



S. Borràs^a, A. Kaufmann^{b,*}, R. Companyó^a

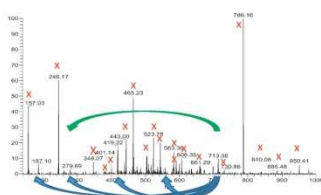
^a Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

^b Official Food Control Authority, Fehrenstrasse 15, 8032 Zürich, Switzerland

HIGHLIGHTS

- We are describing a technique to spot ions which are derived from each other.
- Single stage high resolution data is used.
- This "in silico" technique is compared to conventional precursor scan.
- Some applications for this technique are presented.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2012

Received in revised form 30 January 2013

Accepted 8 February 2013

Available online 18 February 2013

Keywords:

Diagnostic fragment
Elemental composition elucidation
High-resolution mass spectrometry
Ion correlation
Precursor location
Orbitrap

ABSTRACT

Monitoring of common diagnostic fragments is essential for recognizing molecules which are members of a particular compound class. Up to now, unit resolving tandem quadrupole mass spectrometers, operating in the precursor ion scan mode, have been typically used to perform such analysis. By means of high-resolution mass spectrometry (HRMS) a much more sensitive and selective detection can be achieved. However, using a single-stage HRMS instrument, there is no unequivocal link to the corresponding precursor ion, since such instrumentation does not permit a previous precursor selection. Thus, to address this limitation, an *in silico* approach to locate precursor ions, based on diagnostic fragments, was developed. Implemented as an Excel macro, the algorithm rapidly assembles and surveys exact mass data to provide a list of feasible precursor candidates according to the correlation of the chromatographic peak shape profile and other additional filtering criteria (e.g. neutral losses and isotopes). The macro was tested with two families of veterinary drugs, sulfonamides and penicillins, which are known to yield diagnostic product ions when fragmented. Data sets obtained from different food matrices (fish and liver), both at high and low concentration of the target compounds, were investigated in order to evaluate the capabilities and limitations of the reported approach. Finally, other possible applications of this technique, such as the elucidation of elemental compositions based on product ions and corresponding neutral losses, were also presented and discussed.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mass spectrometry (MS) is frequently used to detect residues of contaminants in a variety of matrices. The high awareness regarding our food and environment together with the enormously improved capabilities of MS instrumentation, resulted in the monitoring of hundreds of different compounds [1–3]. Chemists tend to produce long analysis reports which indicate the presence and the

* Corresponding author at: Kantonales Labor Zürich, Fehrenstrasse 15, 8032 Zürich, Switzerland. Tel.: +41 43 244 71 11; fax: +41 43 244 71 01.

E-mail address: anton.kaufmann@klzh.ch (A. Kaufmann).

probably much more frequent absence of each of these target compounds. Forensic reports which fail to list the presence of a lethal compound are of little value even if they show that hundreds of potential drugs were not detected. Likewise, politicians and consumers prefer the information that a particular group or type of contaminant is absent (e.g. free of veterinary drugs, pesticides, fungicides and radioactivity).

Hence, there is a need to detect not only a particular (targeted) analyte but rather molecules which belong to a certain class of compounds. This is not easy, since even a single pharmaceutical action (e.g. bacteriostatic effect), can be achieved by hundreds of compounds belonging to several chemically clearly different families (e.g. sulfonamides and tetracyclines). On the other hand, there are much closer similarities among compounds belonging to a particular family. As an example, there are hundreds of different sulfonamides which have been synthesized and probably several dozen of them have found some use in human and veterinary medicine. All the groups follow a common fragmentation pathway which leads to typical fragment ions that become visible as diagnostic product ions after inducing conditions capable in fragmenting the precursor ion [4]. As a result, such ions can be used to detect any potential members of that particular compound class. This is an important capability considering the fact that many drugs or even more, their metabolites are not commercially available as reference compounds. Thus, they might be detected at high concentrations by non-selective microbial inhibition tests but will most likely be overlooked by classical instrumental residue analysis techniques.

Diagnostic fragments have been reported for some veterinary drug classes [5,6]; for several classes of pesticides [7]; for a number of toxicologically relevant drugs [8,9]; for subgroups of androgenic and anabolic steroids [10]; for ginsenosides and lignans [11] and for a variety of general chemicals [12]. Diagnostic product ions were also proposed for the monitoring of unknown metabolites and degradation products of pesticides [13]. Therefore, at least for a number of compound families, there exists the chance to detect most or even all of its members by monitoring the corresponding diagnostic fragment. It is obvious that such a technique will provide a number of false positive findings. Hence, there should be a user defined intensity threshold and a confirmation of any located peak by isotopic ratio or possibly even by a further fragmentation step.

The typical analytical tool to perform such applications was the use of a unit resolving tandem quadrupole operated in the precursor ion scan mode [5,6,14]. However, this technique has its limitations when focusing on low concentration levels of analytes in complex matrices. The scanning mode of a quadrupole leads to a poor duty cycle and a correspondingly low sensitivity. Even more important is the fact that unit mass resolution is not sufficiently selective for the detection of a low intensity diagnostic fragment in a complex sample.

The use of high-resolution mass spectrometry (HRMS) permits the use of a narrow mass window for the detection of diagnostic fragments. This result in a dramatic improvement of selectivity and sensitivity compared to unit resolved precursor scans. The superior performance of a single-stage Orbitrap as compared with a tandem quadrupole was reported in an application where sulfonamide diagnostic fragments were detected in a honey matrix [6]. On the other hand, single-stage HRMS does not provide a clear link between the monitored diagnostic ion and the corresponding precursor ion. Proprietary mathematical approaches like MS^E have been proposed and commercialized. As a result, a number of algorithms like CAMERA and MaxQuant [15] have been developed and become freely available. There are several published data independent multiplexed peptide fragmentation algorithms [15–20] designed to improve the protein and proteome coverage. The strategy of these algorithms was intended to meet large molecule requirements and is therefore only partially suited for

small molecule applications. The algorithm discussed in this paper focuses on “fishing” low abundance small ions (at residue levels) from complex biological matrices.

Locating a diagnostic fragment ion and avoiding false positive findings related to the presence of interfering isobaric ions is then the first challenge to be solved. The next step is the location of the corresponding precursor.

This was attempted in the present paper by an Excel macro, which firstly searches the centroid raw data file to find masses which produce similar chromatographic peak profiles as the monitored diagnostic fragment (correlation among selected ion chromatograms). In addition a number of additional filters were successively applied. They involve neutral loss calculation between the diagnostic fragment and the postulated precursors and tests to ensure that the supposed precursor is indeed a monoisotopic ion and not an isotope or adduct. Once developed, the suggested strategy was tested for locating the precursors of 27 veterinary drugs of interest yielding diagnostic fragments. However, this approach has most likely a significantly broader field of application than the location of precursor ions based on diagnostic fragments. The macro was also successfully used to elucidate the elemental composition of an unknown metabolite which could otherwise (based on accurate mass and relative isotopic ratio) not be unambiguously identified.

2. Materials and methods

2.1. Solvents and reagents

Acetonitrile (LC–MS grade) was purchased from Roth GmbH (Karlsruhe, Germany) and formic acid (98%, pro analysis) from Merck (Darmstadt, Germany). Water was purified with an ELGA Labwater unit (Labtec, Wohlen, Switzerland). The veterinary drug standards were of the highest available purity and were obtained from Sigma–Aldrich (Buchs, Switzerland), Witega (Berlin, Germany), as well as received in the form of gifts from several sources.

2.2. Sample processing and spiking experiments

A blank calf liver and a blank pangasius fish sample, obtained from the local Swiss market, were processed according to a validated UPLC–HRMS veterinary drug multi-residue method published elsewhere [21]. Briefly, the samples were extracted with a mixture of an aqueous buffer and acetonitrile. The addition of a high concentration of ammonium sulfate caused a phase separation of the two solvents. After centrifugation, the organic layer was evaporated under vacuum and the remaining aqueous extract was processed by a polymeric reversed phase solid-phase extraction (SPE). The produced SPE eluates were concentrated in a heating block by a stream of nitrogen. Prior to injection, the obtained extracts were split into two different vials and spiked at two different concentration levels with a standard solution containing all the veterinary drugs. The resultant fortified extracts contained 20 µg L⁻¹ and 100 µg L⁻¹ of each compound.

2.3. UPLC conditions

Extracts were separated by an Acquity system from Waters (Milford, MA, USA). A Kinetex Core–Shell C18 column (150 mm × 2.1 mm, 2.6 µm) with installed pre-filter, both from Phenomenex (Torrance CA, USA), was used. The column was maintained at 25 °C and the injection volume was 10 µL. Mobile phase A consisted of water/formic acid/acetonitrile (947/3/50, v/v/v) while mobile phase B consisted of water/formic acid/acetonitrile (50/3/947, v/v/v). The following linear solvent gradient was

programmed: 0–2 min 0%B at 0.4 mL min⁻¹, 2–7 min 0–30%B at 0.4 mL min⁻¹, 7–11 min 30–100%B at 0.4 mL min⁻¹, 11–11.1 min 100%B at 0.4–0.8 mL min⁻¹, 11.1–12.5 min 100%B at 0.8 mL min⁻¹, 12.5–12.51 min 100–0%B at 0.8–0.4 mL min⁻¹ and 12.51–14 min 0%B at 0.4 mL min⁻¹.

2.4. Orbitrap parameters

The instrument used was a single-stage Exactive HCD Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) operated under Exactive Tune 1.1 and XCalibur 2.1 software. The capillary voltage of the ESI interface (HESI-II) was set to 3.60 kV. The heater temperature was adjusted to 350 °C and the capillary temperature to 200 °C. These conditions were sufficient to produce some source induced fragmentation. Sheath gas and auxiliary gas flow rates (nitrogen) were set to 50 and 12 units, respectively. The capillary voltage was 37.5 V and the tube lens voltage 125 V. The scan range covered from m/z 140 to 1000. A resolution of 50 000 full width at half maximum (FWHM), which provides two full scans (data points) per second, was used. The target capacity of the C-trap was always defined at 1 000 000 charges and the maximum injection time was set to 50 ms.

2.5. MS/MS parameters (product ion scan)

The tandem mass spectrometer was a TSQ Quantum Access Max (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany). Identical UPLC equipment and interface type were used as for the above described UPLC–HRMS instrument. Moreover, the same separation and interface conditions were also selected. Monitored sulfacetamide precursor mass was m/z 215 with 12 eV applied collision energy. The scan range covered from m/z 140 to 240. Scan time was set to 0.5 s in order to obtain the same number of data points as in the HRMS full scan.

2.6. MS/MS parameters (interlaboratory trial sample)

Triple quadrupole based full and product scans were recorded on a Quattro Micro mass spectrometer with an ESI interface from Waters (Milford, MA, USA). The same UPLC model, analytical column and separation gradient were used as with the above described UPLC–HRMS instrument. All experiments were performed in the positive ionization mode with the following settings: capillary voltage: 3.25 kV; source and desolvation temperature: 150 °C and 350 °C, respectively; cone and desolvation gas flow: 50 L h⁻¹ and 800 L h⁻¹, respectively.

2.7. Algorithm description

The proposed macro has been written in Excel's internal programming language, Visual Basic for Applications (VBA), within Microsoft Office 2010 (Redmond, WA, USA). Initially, a simple interface form in an Excel worksheet has been set up to allow the user to input some information required for running the application. The algorithm has been designed in two distinct steps: one to automate the access and importation of HRMS data sets and another for data processing. This allows the user to process the data with different interface information without the need to import the data each time.

Thus, in the first step, the macro imports the HRMS centroid raw data file (.raw), which must be previously converted to a text file (.txt). This can be rapidly and easily done by using the file converter available in the XCalibur software. The VBA code is then programmed to extract from the text file the exact masses and their corresponding abundances measured for each scan and put them into consecutive spreadsheet columns. In the second step,

the macro extracts all mass and abundance pairs within the user defined retention time range of the investigated ion (e.g. diagnostic fragment). This range commonly begins a few scans before the peak starts and ends a few scans after the peak ends. The macro determines the number of different ion traces present within this time range and assigns each m/z and abundance pair to a particular ion trace. An m/z and abundance pair belongs to a particular ion trace if the measured m/z value is located within a user defined mass deviation tolerance. The correctness of this process is important since a wrong assignment will result in wrong correlations between two related ion traces.

Subsequently, the macro writes a two-dimensional matrix where the masses of the detected ion traces are listed in the vertical axis (rows) and the abundances corresponding to each scan are listed in the horizontal axis (columns). The virtual absence of noise within high-resolution data results in chromatographic peaks which grow directly out of a noise free baseline. As a consequence, missing abundance values within this matrix are filled with the value zero. Once the data are set, the filters described below are successively applied to generate a list of precursor candidates for the investigated ion.

Filter A: Correlation > minimum correlation. The first filtering criterion is based on the assumption that precursor–fragment pairs will have identical chromatographic peak profiles. Such a premise is addressed by means of correlation. The squared Pearson correlation coefficient is then computed for the abundances of each investigated and detected ion traces pair in order to find the ion traces which produce chromatographic peaks of identical retention time, shape and width as the investigated ion. Based on the obtained results, ion trace masses are sorted in decreasing order of correlation. Masses with a correlation above the minimum user-specified correlation are deemed to be related with the investigated (diagnostic) ion and therefore, they are proposed as possible precursors.

Filter B: Plausible neutral loss. The neutral loss criterion involves calculating the mass difference between the investigated ion and each postulated precursor. The latter one survives as a candidate if the corresponding neutral loss is consistent with a possible theoretical combination of C_x H_x N_x O_x S_x Cl_x, otherwise it is excluded. The filter contains no “chemical intelligence”. Hence, it will not remove neutral losses which represent a chemically impossible molecule. The interface allows user-defined upper and lower limit of atoms of each element, as well as the maximum tolerable mass error. If desired, the macro also provides a list of all the plausible elemental compositions for each neutral loss together with the corresponding calculated mass error, from which they are sorted from the most likely (lowest mass error) to the less probable (highest mass error).

Filter C: Removal of isotope and adduct related ions. An additional test is also incorporated to ensure that the final precursor candidates do not derive from another ion (e.g. it is not an isotopic signal or an adduct of a monoisotopic ion). In this case, all masses exceeding the minimum correlation are tested, even if they do not show any plausible neutral loss, in order to gather the maximum information as possible. Hence, the algorithm computes the relative mass difference between each mass signal in order to locate isotopes (¹³C₁, ¹³C₂, ¹³C₃, ³⁴S₁ and ³⁷Cl₁) or adducts (Na, K, H₂O, NH₃, HCOOH, CH₃OH, CH₃CN and (CH₃)₂SO), again within a certain mass tolerance. The hits found are stated, together with the calculated mass errors, and sorted in the same way as the neutral losses. The corresponding masses are then removed as likely precursor ions. However, adducts with water or ammonia are not rejected as candidates as they are also typical neutral losses of many compounds. This is a limitation of the utilized strategy and would require dedicated experiments based on the variation of the interface voltage settings and the applied fragmentation energy.

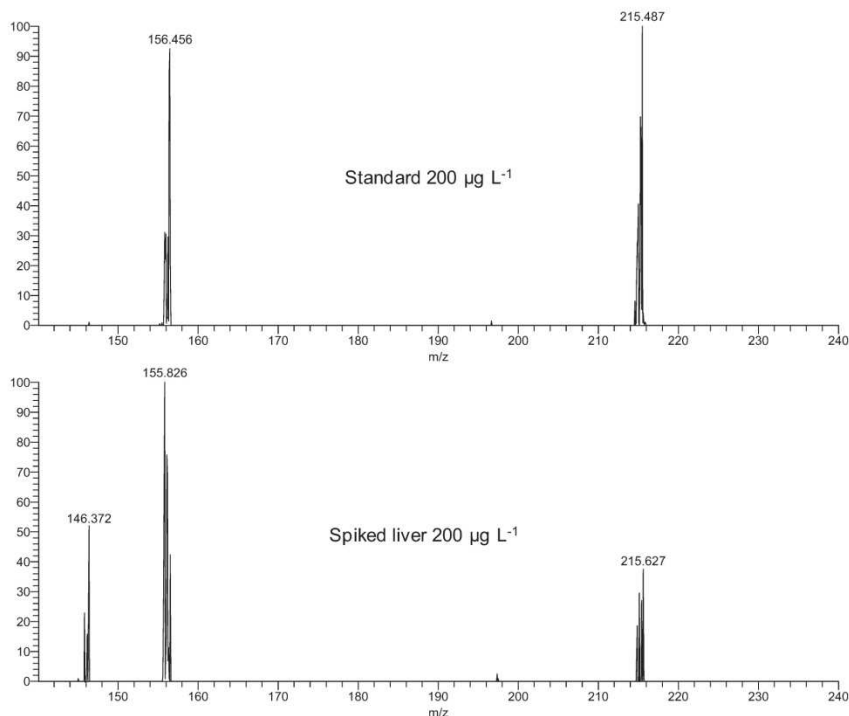


Fig. 1. Tandem quadrupole MS/MS averaged product ion spectra of sulfacetamide ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) in pure solvent (top) and in a liver extract (bottom).

Filter D: Removal of spurious peaks. The last precursor dismissal is based on the fact that the veritable precursor should have isotopes or adducts present. Masses fulfilling this criterion are sorted at the top list of feasible precursor ions.

Finally, the progress of the macro and the resulting list of all hypothetical precursors are recorded in several output worksheets, which permits a comprehensive review of all intermediate steps. Moreover, the algorithm can be run in the opposite direction, that is, from the precursor to fragments, to find product ions for which the possible elemental compositions of the corresponding neutral loss can be also calculated and sorted according to the mass deviation. This technique is very helpful for the structural elucidation of heavy ions and will be discussed in more detail in Section 3.3.1.

3. Results and discussion

3.1. Comparison between the proposed algorithm and conventional product ion scan

The following example was selected to illustrate the different performance of these two techniques. The rather challenging compound sulfacetamide was selected because of its polar nature, which leads to the elution within a section of the chromatogram highly populated with matrix related ions. Furthermore, the compound has unfavorable ionization and fragmentation properties. Sulfacetamide ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) was dissolved in pure solvent and also spiked at the same concentration into a liver extract and was

analyzed by a unit mass resolving LC–MS/MS instrument in the conventional product ion mode. The two injections were repeated in a single-stage Orbitrap where non-precursor selected fragmentation was executed in the HCD cell. Both instruments were operated with 2 Hz data acquisition cycles to facilitate such a comparison. The precursor selected product ion spectra recorded with the tandem quadrupole instrument are shown in Fig. 1. A rather poor spectra quality was obtained due to the low analyte concentration and the required scan speed. The comparison between the product ion scan obtained from the pure standard (top in Fig. 1) and the spiked matrix extract (bottom in Fig. 1) indicated the presence of a clearly matrix related ion with an m/z of 146. This ion must be a product ion of an unidentified matrix compound with the same precursor ion mass of m/z 215 as sulfacetamide. The injection of the unspiked liver extract confirmed this interpretation. This clearly demonstrates that not all mass peaks present in a conventional product ion scan are related to the analyte.

Fig. 2(top) shows the unit resolved mass traces corresponding to the three mass peaks present in Fig. 1 extracted from the product ion data set. Only mass m/z 156 produced a chromatographic peak which could be integrated. The signal at m/z 146 was not easy to distinguish from the surrounding noise. On the other hand, the precursor trace m/z 215 showed only an elevated baseline. In other words, the mass peak (m/z 215) in Fig. 1 did not represent the unfragmented precursor ion (sulfacetamide) but some unidentified isobaric compound.

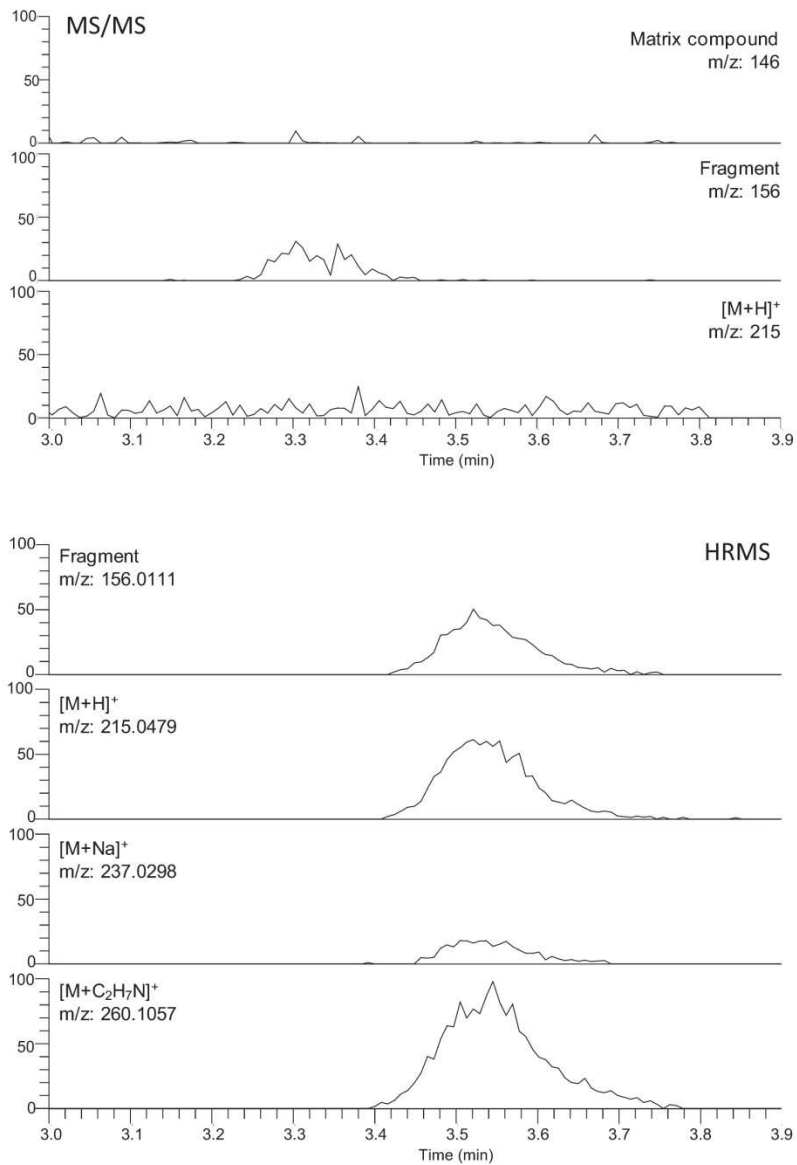


Fig. 2. Extracted ion traces for the masses observed in the unit resolved MS/MS product ion scan (tandem quadrupole) of sulfacetamide ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) in liver (top) and those obtained in HRMS and related according to the described algorithm defining a mass extraction window of 5 ppm (bottom).

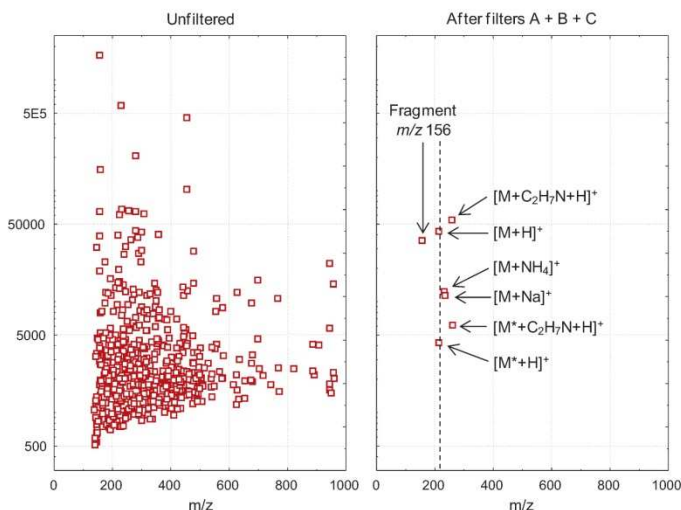


Fig. 3. Detected HRMS mass peaks before and after applying the proposed algorithm within the retention time range of sulfacetamide ($200 \mu\text{g L}^{-1}$) in liver extract. Note the powerful elimination of ions unrelated to sulfacetamide.

The same HRMS based data set (no precursor selection) was processed by the described algorithm. The spectrum corresponding to the apex of the investigated ion contained 593 mass peaks. However, only 6 mass peaks survived after applying the filtering steps and were proposed to be potentially related with sulfacetamide (they were adducts and isotopes of sulfacetamide). The extracted ion chromatograms corresponding to the three most intensive mass peaks are given in Fig. 2(bottom). It is clearly visible that HRMS full scan derived data are significantly more sensitive than a quadrupole based product ion scan. This comparison might be perceived to lack a certain degree of fairness, since a time proven confirmatory technology like tandem quadrupole is compared with HRMS, which is certainly more suited for such explorative tasks. Yet, it is a fact that the well-known superior tandem quadrupole sensitivity can only be obtained when exactly knowing the ion to be looked at (targeted MRM mode). Moreover, the obtained data show that the availability of HRMS data can provide a selectivity which equals at least the selectivity produced by a tandem quadrupole instrument operated in precursor mass selection.

The number of HRMS mass peaks before and after applying the proposed algorithm is shown in Fig. 3. All the surviving masses could be clearly linked to a fragment, isotope or adduct of sulfacetamide. Furthermore, the false positive signal obtained with the unit mass resolving product ion scan (m/z 146) was correctly eliminated by the discussed algorithm. It is interesting to note that the algorithm did not only find the expected isotopes and adducts (e.g. Na^+ or NH_4^+) but also a rather intense ion at m/z 260.1057. This signal was even more intensive than the $[\text{M}+\text{H}]^+$ (bottom in Fig. 2). It was not only present in the spiked liver extract but also in the standard solution. Investigations based on exact mass, isotopic ratio and even the isotopic fine structure obtained by measurements at 100 000 FWHM clearly pointed to a $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}$ adduct of sulfacetamide. However, ethylamine was neither present in the standard solvent, nor in the mobile phase. A literature research has led to a report of an electrochemical reaction occurring in the ESI interface, where acetonitrile is partially reduced into ethylamine [22]. Still it was

unclear why other sulfonamides did not show this adduct. This was explained by the fact that sulfacetamide contains an acidic hydrogen which is absent in most other sulfonamides. Among the investigated drugs, only sulfabenzamide also contains such acidic hydrogen. Indeed, the used macro located this adduct for sulfabenzamide but not for any other investigated sulfonamides. The loss of the acid hydrogen produces a zwitterion which can form an ion pair with the electrochemically reduced positively charged ethylamine.

3.2. Performance of the individual filtering steps

Full scan HRMS data sets containing compounds able to produce diagnostic fragments, were needed in order to evaluate the reported Excel macro. Two families of antimicrobials fulfilling this requirement, namely penicillins and sulfonamides, were chosen as test cases. Thus, a validated UPLC–HRMS multi-residue method [21] covering more than 100 veterinary drugs, including 6 penicillins and 21 sulfonamides, was used for the acquisition of such data sets. All the investigated amino-sulfonamides are known to share the same diagnostic fragment at m/z 156.0114, while for penicillins, the diagnostic product ion was proved to be at m/z 160.0427 [5,6]. The target analytes yielded diagnostic fragment ions in-source under the soft ionization conditions used without the need of applying any fragmentation by collision-induced dissociation (CID). Hence, these conditions ensured that unfragmented precursor ions would still be present at sufficient abundances. The applicability of the algorithm was tested with data sets obtained from two different food matrices, fish and liver, spiked with all the compounds at high ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) as well as at low concentration ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). The challenge of testing the macro with real matrix extracts spiked with more than 100 different compounds, instead of individual standards in solvent, aimed to point out possible practical limitations (it is obvious that the combined presence of so many residues is very unlikely to be observed in a routine sample). Therefore, a total of 4 data sets were recorded accounting for 108 diagnostic fragments to be investigated as simulated unknowns (2 matrices \times 2

Table 1
Number of false positive ions surviving the individual filtering steps for each matrix-concentration-analyte combination. Data refers to two matrices and two different spiking levels.

	Fish high conc. (100 µg L ⁻¹)						Fish low conc. (20 µg L ⁻¹)					
	Fragment abundance (×1000 a.u.)	Filter					None	Filter				
		None	A	B	C	D		None	A	B	C	D
PENICILLINS												
Ampicillin	30	574	25	19	9	0	585	6	6	2	0	
Cloxacillin	227	760	48	41	25	3	759	32	27	13	3	
Dicloxacillin	196	741	40	35	15	3	753	28	27	11	11	
Oxacillin	86	744	57	50	38	5	703	49	47	36	8	
Penicillin G	123	842	53	42	26	7	853	28	26	20	1	
Penicillin V	382	742	41	36	19	3	742	19	17	9	2	
SULFONAMIDES												
Sulfabenzamide	265	535	29	27	14	1	560	24	23	11	4	
Sulfacetamide	35	279	4	3	2	0	269	1	1	1	0 ^a	
Sulfachlorpyrazine	18	581	31	25	15	3	578	21	17	12	2	
Sulfachlorpyridazine	158	641	17	14	8	1	653	14	14	10	1	
Sulfadiazine	100	364	21	16	7	2	353	7	7	2	1	
Sulfadimethoxine	64	505	36	29	15	2	555	25	22	11	2	
Sulfadimidine	32	546	13	9	4	1	662	11	11	7	1	
Sulfadoxine	178	551	44	37	21	4	580	23	19	6	2	
Sulfaguandinine	86	481	3	3	1	0	512	3	1	1	0	
Sulfamerazine	65	519	26	16	5	2	511	5	4	1	0	
Sulfameter	159	786	19	14	3	1	725	10	7	3	0	
Sulfamethizole	248	721	34	32	14	4	761	22	17	11	0	
Sulfamethoxazole	92	589	30	23	15	1	608	14	13	7	0	
Sulfamethoxypyridazine	63	776	38	32	18	2	783	26	22	9	6	
Sulfamonomethoxine	84	689	33	23	13	4	705	41	34	21	8	
Sulfamoxole	29	621	10	9	5	1	668	9	8	6	0	
Sulfapyridine	97	481	13	8	3	0	472	7	6	3	0	
Sulfaquinoxaline	169	652	48	41	23	5	667	26	23	17	3	
Sulfathiazole	149	524	23	16	7	1	535	6	6	3	0	
Sulfisomidine	100	364	21	16	7	2	353	7	7	2	1	
Sulfisoxazole	150	515	33	29	16	2	516	9	7	3	0	
Liver high conc. (100 µg L⁻¹)												
	Fragment abundance (×1000 a.u.)	Filter					Filter					
		None	A	B	C	D	None	A	B	C	D	
PENICILLINS												
Ampicillin	15	1560	23	21	16	2	1555	32	26	24	0	
Cloxacillin	251	1456	76	69	38	10	1510	43	38	24	5	
Dicloxacillin	227	908	65	59	28	8	1120	41	41	25	6	
Oxacillin	78	1362	23	21	16	3	1329	37	35	32	3 ^a	
Penicillin G	79	352	12	11	10	1 ^a	531	19	18	16	2 ^a	
Penicillin V	360	1351	58	50	34	4	1462	45	42	30	5	
SULFONAMIDES												
Sulfabenzamide	232	1030	19	17	11	2	1147	9	7	5	0	
Sulfacetamide	22	535	9	8	7	1	522	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	
Sulfachlorpyrazine	17	1017	53 ^a	51 ^a	35 ^a	7 ^a	1154	121	110	93	10	
Sulfachlorpyridazine	106	1172	54	52	38	7	1167	35	32	19	7	
Sulfadiazine	37	1853	23	19	14	2	1847	14	11	7	1	
Sulfadimethoxine	58	1203	44	41	27	5	1271	44	38	23	5	
Sulfadimidine	20	1202	69	59	40	8	1452	71	58	41	8	
Sulfadoxine	116	1036	43	37	19	5	1164	18	16	9	2	
Sulfaguandinine	85	809	17	14	11	1	765	2	2	1	0	
Sulfamerazine	31	1210	40	34	26	5	1040	2 ^a	2 ^a	2 ^a	0 ^a	
Sulfameter	90	1797	68	54	39	7	1176	39	34	27	6	
Sulfamethizole	113	1499	8	5	3	0	1709	10	10	7 ^a	2 ^a	
Sulfamethoxazole	57	1105	31	28	22	2	1093	18	16	11	1	
Sulfamethoxypyridazine	29	1601	23	18	14	1	1386	8	7	7	0 ^a	
Sulfamonomethoxine	57	1157	58	46	34	6	1239	32	27	19	4	
Sulfamoxole	9	1647	65	57	51	5	1696	26 ^a	22 ^a	20 ^a	2 ^a	
Sulfapyridine	30	1645	27	23	19	2	1949	1 ^a	1 ^a	1 ^a	0 ^a	
Sulfaquinoxaline	121	1272	34	29	22	3	1378	23	20	13	3	
Sulfathiazole	49	1828	54	48	40	4	1868	17	14	13	2 ^a	
Sulfisomidine	37	1853	23	19	14	2	1847	14	11	7	1	
Sulfisoxazole	101	1091	29	26	19	2	1117	27	26	20	4	

^a Veritable precursor incorrectly rejected.

concentrations $\times 27$ analytes). In all cases, conservative mass tolerances of ± 5 mDa were set for the ion trace assignment, while a more restrictive mass deviation of ± 2 mDa was defined for neutral loss calculation and for the location of isotopes and adducts. These values were derived from the instrumental specification as well from our experience with the long-term mass stability of the instrument. The upper limits for the numbers of atoms of C, H, N, O, S and Cl in an elemental composition were set to 50, 80, 10, 20, 5 and 2, respectively. Table 1 summarizes the number of false positive findings (postulated precursors different from the veritable precursor) remaining after applying each filter for every matrix-concentration-analyte combination. Figs. 4 and 5 also illustrate two particular examples (oxacillin and sulfamethizole) to visually evaluate the increase in selectivity by the successive application of the various filters. A first inspection enables to conclude that the evaluation of the chromatographic peak similarity based on correlation (filter A), represents the most powerful criteria to remove ions which are not related to the diagnostic fragment. A correlation of 80% was successfully applied in most cases to reject about 89–99% of unrelated signals. However, the true precursor was incorrectly excluded (false negative) for 5 sulfonamides (indicated with an "a" in Table 1) when the more challenging liver matrix was considered, both at low and high concentration. In such cases, poor correlation coefficients lower than 80% were obtained due to the coelution of compounds showing identical diagnostic fragments (e.g. sulfachlorpyridazine which elutes after sulfabenzamide) or unexpected low abundance of one or several scans in the range considered (e.g. sulfamerazine and sulfapyridine). In contrast, no false negative were found in any case as a result of the plausible neutral loss calculation (filter B). The next candidate elimination process by assignment of isotopes or adducts (filter C) also produced successful results, except for the sulfamethizole precursor which was identified as a potassium adduct in liver at low concentration (Fig. 5). Finally, few erroneous rejections (one in fish matrix and five in liver) were obtained as well from the application of the last stringent criterion (filter D) because of the poorer correlations calculated for the located isotopes or adducts. Hence, the macro was able to postulate the veritable precursor for 67% of the investigated diagnostic fragments in liver at low concentration (worst case), whereas for fish at high concentration the correct precursor was postulated for all compounds (100%), either among a list of a few possible candidates or in some cases as the only surviving ion.

The proposed algorithm has only been used to process data obtained by an Orbitrap mass spectrometer. The underlying principles should equally work for time of flight based data. However, it has to be stressed that this refers to measurements where no peak abundance dependent mass shifts (detector saturation) are observed. In such cases, larger mass tolerances would have to be defined and consequently poorer filtration efficiency should be obtained. We never observed such ion abundance related mass shifts, when evaluating Orbitrap data. High ion abundances can theoretically overflow the C-trap which is an integral part of the current Orbitrap technology. However, an automatic gain control (AGC) feature prevents such a detrimental over-filling. This may have effects on the detected ion abundance but not on the mass accuracy. On the other hand, the limited C-trap capacity of a single-stage Orbitrap requires the definition of relatively high start masses (e.g. m/z 140) to prevent the filling of the trap with mobile phase related ions.

The major relevant disadvantage of the utilized macro is the fact that the user has to focus on a particular ion and define a narrow time range which begins a few scans before the peak starts and extends a few scans after the selected peak ends. Calculation time is acceptable. However, calculation times of more than a minute are observed when all possible elemental compositions for every theoretical possible neutral loss have to be calculated.

3.3. Examples of possible applications

3.3.1. Locating product ions for improved precursor elemental composition elucidation

HRMS generate extremely large data sets containing very helpful information for elemental composition elucidation. Several spectra deconvolution strategies have been published for such purpose [23–26]. Algorithms based on time of flight (TOF) mass spectrometers mainly use the exact mass of the monoisotopic peak combined with the relative isotopic abundances (RIA). However, the main difficulty lies in the fact that the number of possible compositions increases exponentially with the m/z value. To overcome this issue, a compound fragmentation has been proposed [24,25] due to the fewer possible elemental composition combinations for lighter ions compared to the heavier precursor ion. Then, the precursor elemental composition is calculated from the sum of those elucidated for product ions and the corresponding neutral losses. Another reported approach based on mass resolutions up to 100 000 FWHM, as provided by Orbitrap, relies on the use of the isotopic fine structure [7]. In this case, the number of candidates is further reduced by visually evaluating the fully or partially resolved peaks related to ^{34}S and ^{15}N isotopes. In such field, the presented macro can then provide not only additional isotopic information, as compared with TOF, but also additional product ions as well. Thus, the number of possible ion combinations can be greatly reduced by the combination of these two complementary properties, thereby aiding to facilitate the elucidation of the precursor elemental composition and its identification process. An example for such a successful elemental composition elucidation is given in Section 3.3.2.

3.3.2. Precursor location of a labile ion fragmenting in the interface

Locating a precursor is not an endeavor restricted to finding a particular compound belonging to a substance class, which contains an identical chemical substructure and therefore produces diagnostic fragmentations. Sometimes even soft ionization techniques, like ESI, produce extensive fragmentation of labile compounds. Hence, there may be a need to elucidate the precursor (e.g. $[\text{M}+\text{H}]^+$) ion. This can be illustrated by a practical example encountered while participating in a proficiency test.

Multi-residue veterinary drug proficiency tests are still rare due to the limited use of multi-residue and multi-class methods in this particular analytical field. Up to now, the most extensive multi-residue interlaboratory trial is annually organized by RIKILT (Wageningen, Holland). Participating laboratories receive three bovine meat samples which may contain drugs belonging to seven different chemical families (aminoglycosides, β -lactams, macrolides, quinolones, sulfonamides, tetracyclines and avermectins). A total of 69 compounds are listed as possible compounds in the Annex 1 of the participation form. However, participants are asked to report any other detected compounds belonging to the above mentioned drug families. There is currently no published multi-residue method available which covers all the 69 listed compounds. Hence, the individual participants report the use of 2–7 different analytical methods to attempt this task. Furthermore, some of the 69 listed compounds are difficult to obtain as commercial reference substance. Certainly, quantification is not possible if there is no reference substance available. Nonetheless, UPLC–HRMS based methods should be able to detect them when using a full scan based screening technique. Still, only a small minority of participants reports the presence of a suspected analyte in a proficiency test sample without having a physical access to a reference material.

The UPLC–HRMS method used in our laboratory [21] was validated to monitor all the drug families stated above with the

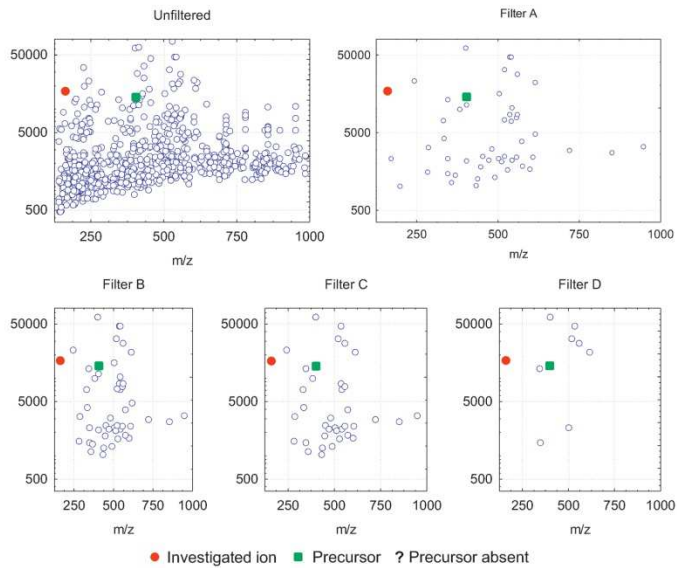


Fig. 4. HRMS mass peaks before and after applying each algorithm within the retention time range of oxacillin in fish extract at low concentration ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).

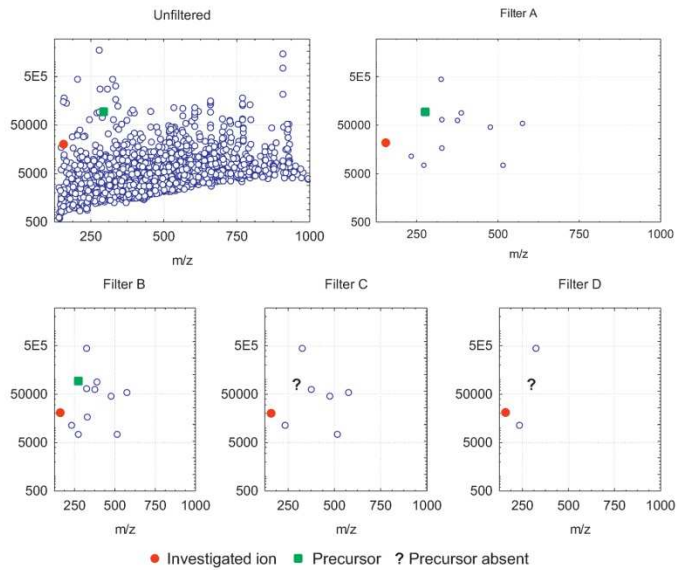
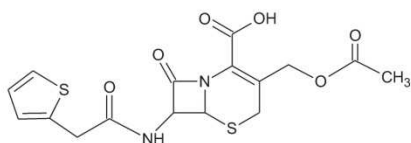
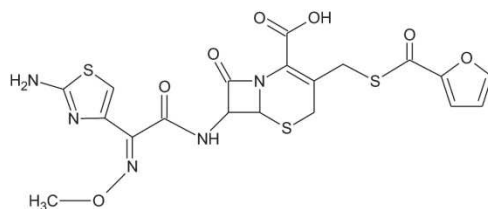
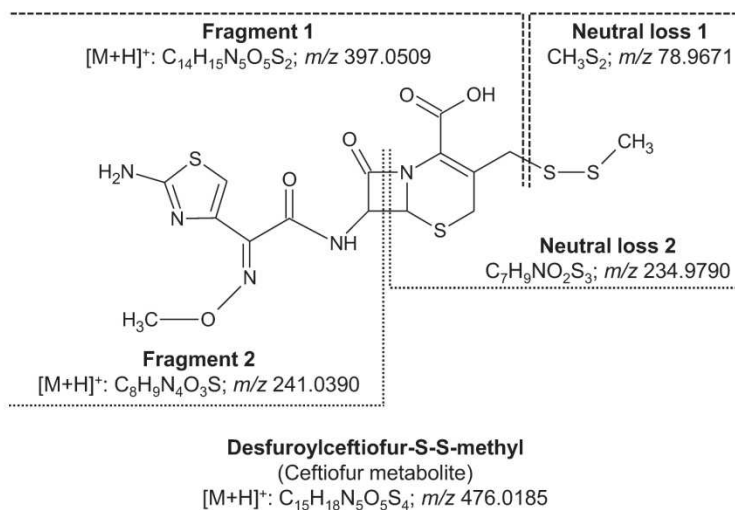


Fig. 5. HRMS mass peaks before and after applying each algorithm filter within the retention time range of sulfamethizole in liver extract at low concentration ($20 \mu\text{g L}^{-1}$).

**Cefalothin**[M+H]⁺: C₁₆H₁₇N₂O₆S₂; *m/z* 397.0523**Ceftiofur**[M+H]⁺: C₁₉H₁₈N₅O₇S₃; *m/z* 524.0363**Fig. 6.** Structures of cefalothin, ceftiofur and desfuroylceftiofur-S-S-methyl.

exception of the aminoglycosides. This included a number of β -lactams. However, cefalothin, cefquinome, cefradine, cefuroxime and ceftiofur were still not covered. While the method included cefapirin, it did not cover the main metabolite (desacetylcefapirin). Once analyzed, in one of the three proficiency test samples no residue could be identified. Thus, it was suspected that one of these abovementioned compounds would be present. Then, mass traces corresponding to the exact mass of these compounds ([M+H]⁺) were extracted. A sufficiently strong signal for ceftiofur (524.0363) and cefalothin (397.0523) could be obtained. The structures of these

compounds are given in Fig. 6. Accurate masses showed a very good fit with theoretical spectra of these two suspected analytes. However, an unambiguous confirmation was not possible due to the lack of reference substances. Ceftiofur could later be ordered to a reference material supplier, while cefalothin was out of stock at the sole known supplier. Therefore, only the presence of ceftiofur could be confirmed by the use of the reference compound, whereas this was not possible for the suspected cefalothin finding. Nevertheless, the suspected cefalothin spectrum fine structure showed some differences (intensity of the ³⁴S isotope abundance)

when compared to the calculated spectrum. On the other hand, ceftiofur is known to metabolize extensively [27–29]. Hence, it was suspected that the peak m/z 397.0509 tentatively identified as cefalothin could in fact represent a metabolite of ceftiofur. This could not be confirmed, since most of the ceftiofur metabolites are also not commercially available as reference substances. Moreover, to our best knowledge, $C_{16}H_{16}N_2O_6S_2$ (elemental composition corresponding to cefalothin) has never been described in the literature to be a ceftiofur metabolite. Consequently, the new postulated hypothesis was that the observed mass peak represents a fragment of a rather unstable ceftiofur metabolite ion. Such a labile precursor might undergo fragment in the electrospray interface. Then, the described macro was used to find a possible precursor ion for m/z 397.0509. The results obtained provided a single candidate with a measured mass of 476.0186. The chromatographic peak shape of both ions showed a good correlation of 99.2%. Furthermore, the heavier ion was significantly more intensive than the ion from which the search started, which further supported the hypothesis that it could be the veritable precursor. The mass difference between both ions (78.9677) clearly pointed to a neutral loss of CH_3S_2 . Moreover, the differences between the RIA of both ions unequivocally confirmed the loss of two sulfur atoms. Permitting a mass deviation of 5 ppm, still 52 different elemental compositions were produced for the postulated precursor. Therefore, additional steps were required to elucidate the correct elemental composition. First of all, the suspected precursor was considered to be the base ion (investigated ion) and the described software was used to find correlating lighter ions (moving toward lower instead of higher masses). The program located a number of possible fragments and calculated feasible elemental compositions for the corresponding neutral losses. This resulted in plausible losses such as CH_3S_2 , $C_2H_6OS_2$ and $C_7H_9NO_2S_3$. This hypothesis was tested by using a MS/MS quadrupole instrument in the product ion scan mode. Results showed that these located ions were indeed the product ions of the 476.0186 precursor ion. It has to be mentioned that the fragment ion traces derived from non-precursor selected HRMS signals were, as mentioned before, of superior quality compared to those derived from the unit mass resolving tandem quadrupole instrument. This fact is due to the low analyte concentration and the poor MS/MS duty cycle. An approach based on accurate masses of precursor, product and corresponding neutral loss was used to elucidate the elemental composition [24,26]. The knowledge that the ion with m/z 241.0389 was a product ion of the investigated precursor, was used as a basis for the elucidation of the precursor elemental composition. The relatively low mass and the presence of a sulfur atom in this product ion, permitted an unequivocal elucidation of its elemental composition: $C_8H_9N_4O_3S$. This product ion together with the previously calculated neutral loss ($C_7H_9NO_2S_3$) produced therefore a precursor ion with the elemental composition of $C_{15}H_{18}N_5O_5S_4$, corresponding to one of the 52 candidates previously proposed in the mass accuracy ranking hit list. A literature search [29] yielded a metabolite of ceftiofur corresponding to this elemental composition (desfuroylceftiofur-S-S-methyl). This metabolite was in silico fragmented by using Mass Frontier software. Although a variety of different settings were chosen, no neutral losses corresponding to CH_3S_2 , $C_2H_6OS_2$ or $C_7H_9NO_2S_3$ were proposed by the software. However, the convincing mass spectrometry data as well as the fact that neither ceftiofur nor the proposed metabolite were present in the other two samples led to the conclusion that the peak which was initially interpreted as cefalothin was in fact a product ion of a ceftiofur metabolite. Finally, this interpretation was used to submit the final proficiency test measurement data. The correctness of this decision (presence of the parent drug including metabolites) was later confirmed by the release of the final results.

4. Conclusions

The combination of full scan HRMS data with the described macro for the location of precursor ions was proved to be an alternative to the commonly used MS/MS precursor or product scans. Mainly based on the correlation of the precursor–diagnostic fragment pair, the algorithm is capable of powerfully removing most of the unrelated signals. Additional filtering criteria, such as calculation of neutral losses and location of isotopes and adducts, further aid to reject unlikely precursors to finally postulate a list of the most feasible candidates. Hence, if more than one possible precursor is proposed, it is up to the user to evaluate the likelihood of each candidate in order to point out the best fitting ion based on the available information. The tool has clearly been designed for small molecule applications. The peak shape correlation might be equally useful for peptide or protein spectra. However, the neutral loss and the isotope filter have been designed for small molecule applications.

Compared with the classical MS/MS approach, a single-stage HRMS instrument is incapable of producing an unequivocal link to the precursor since no physical precursor mass selection is possible. Yet, analysts must be aware that unreliable results can be also obtained by unit mass resolution MS/MS instruments due to unresolved isobaric ions. Both strategies allow to determine compounds belonging to families capable of yielding common fragments, as well as their metabolites, instead of focusing only on a particular analyte. Nevertheless, while precursor ion scan can focus only on one predefined product ion and thus to only one class of compounds, HRMS allows the unlimited untargeted screening from a single sample injection. Moreover, HRMS provides a better selectivity and sensitivity which can be essential when dealing with complex matrices or analytes present at low concentration. Last but not least, taking advantage of the exact mass measurements, the elemental composition of the unknown precursors can be often unequivocally elucidated. This is hardly possible when using unit resolution MS techniques. In such challenging tasks, the described algorithm contributes to find product ions and propose possible elemental compositions for them, as well as for the corresponding neutral loss. Regarding its use to the interlaboratory trial sample, it is relevant to notice that the rather intensive precursor m/z 476 of the investigated ion m/z 397 could have been found without the help of the proposed software tool. However, the very weak product ion m/z 241 was hidden among many other significantly more intensive peaks. This ion, which was the essential basis for the neutral loss based elemental composition elucidation, would hardly have been detected without the help of the described macro. The same statement is likely true for the unique ethylamine adduct. Applying the algorithm on a number of analytes often revealed the information that the $[M+H]^+$ ion was only one of several ions representing the analyte and that the summation of all analyte related mass peak abundances significantly exceeded the abundance of the $[M+H]^+$ ion. This is not only valuable information when the identity of a peak has to be confirmed. Detecting particular adducts or unique abundance ratio among adducts might provide valuable information regarding the chemical structure or properties of the unknown compound. This could be useful for the identification of unknowns or for non-targeted screening.

Finally, the authors are sure that additional applications, a part from the ones here presented, can be found in other fields since there is no specialized software that is required. VBA, operating within the widely available Excel software, has been successfully used to deal with the extremely large HRMS data files.

Acknowledgement

Sílvia Borràs acknowledged the Generalitat de Catalunya for an FI grant (Grant Number 2010FI.B00714).

References

- [1] H.G.J. Mol, P. Plaza-Bolaños, P. Zomer, T.C. de Rijk, A.A.M. Stolker, P.P.J. Mulder, *Anal. Chem.* 80 (2008) 9450.
- [2] M.L. Gómez-Pérez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, *J. Chromatogr. A* 1248 (2012) 130.
- [3] J. Zhan, X.-j. Yu, Y.-y. Zhong, Z.-t. Zhang, X.-m. Cui, J.-f. Peng, R. Feng, X.-t. Liu, Y. Zhu, *J. Chromatogr. B* 906 (2012) 48.
- [4] K. Klagkou, F. Pullen, M. Harrison, A. Organ, A. Firth, G.J. Langley, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 2373.
- [5] M.E. Dasenaki, N.S. Thomaidis, *Anal. Chim. Acta* 672 (2010) 93.
- [6] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, *Analyst* 136 (2011) 1898.
- [7] W.M.A. Niessen, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4061.
- [8] W.M.A. Niessen, *Mass Spectrom. Rev.* 30 (2011) 626.
- [9] W.M.A. Niessen, *Mass Spectrom. Rev.* 31 (2012) 626.
- [10] F. Guan, C.E. Uboh, L.R. Soma, Y. You, Y. Liu, X. Li, J. Mass Spectrom. 45 (2010) 1261.
- [11] C. Zheng, H. Hao, X. Wang, X. Wu, G. Wang, G. Sang, Y. Liang, L. Xie, C. Xia, X. Yao, *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 230.
- [12] M.N. Eberlin, *J. Mass Spectrom.* 41 (2006) 141.
- [13] L. Polgár, J.F. García-Reyes, P. Fodor, A. Gyepes, M. Dernovics, L. Abrankó, B. Gilbert-López, A. Molina-Díaz, *J. Chromatogr. A* 1249 (2012) 83.
- [14] C. Huang, B. Guo, X. Wang, J. Li, W. Zhu, B. Chen, S. Ouyang, S. Yao, *Anal. Chim. Acta* 737 (2012) 83.
- [15] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* 26 (2008) 1367.
- [16] S.J. Geromanos, J.P.C. Vissers, J.C. Silva, C.A. Dorschel, G.-Z. Li, M.V. Gorenstein, R.H. Bateman, J.J. Langridge, *Proteomics* 9 (2009) 1683.
- [17] C.R. Weisbrod, J.K. Eng, M.R. Hoopmann, T. Baker, J.E. Bruce, *J. Proteome Res.* 11 (2012) 1621.
- [18] G.-Z. Li, J.P.C. Vissers, J.C. Silva, D. Golick, M.V. Gorenstein, S.J. Geromanos, *Proteomics* 9 (2009) 1696.
- [19] K. Blackburn, F. Mbeunkui, S.K. Mitra, T. Mentzel, M.B. Goshe, *J. Proteome Res.* 9 (2010) 3621.
- [20] T. Geiger, J. Cox, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* 9 (2010) 2252.
- [21] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, S. Walker, M. Widmer, *Anal. Chim. Acta* 700 (2011) 86.
- [22] Z.-m. Gu, J. Ma, X.-g. Zhao, J. Wu, D. Zhang, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2969.
- [23] A. Kaufmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2003.
- [24] A.H. Grange, G.W. Sovocool, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2375.
- [25] S. Suzuki, T. Ishii, A. Yasuhara, S. Sakai, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19 (2005) 3500.
- [26] A. Kaufmann, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 2035.
- [27] M.G. Beconi-Barker, R.D. Roof, L. Millerioux, F.M. Kausche, T.J. Vidmar, E.B. Smith, J.K. Callahan, V.L. Hubbard, G.A. Smith, T.J. Gilbertson, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 673 (1995) 231.
- [28] B.J.A. Berendsen, M.L. Essers, P.P.J. Mulder, G.D. van Bruchem, A. Lommen, W.M. van Overbeek, L.A.M. Stolker, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8177.
- [29] M.G. Beconi-Barker, K.L. Davison, R.E. Hornish, T.S. Arnold, A.L. Craigmill, T.J. Gilbertson, E.B. Smith, T.J. Vidmar, G.A. Hoffman, C.L. Gatchell, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 1589.

3.4.2. Discussió dels resultats

3.4.2.1. Descripció de l'algoritme

La correlació d'ions es basa en el fet que un ió precursor i els seus ions producte presenten pics cromatogràfics amb el mateix temps de retenció, perfil i amplada. Aquests criteris, en els quals s'ha basat l'algoritme proposat, han estat també utilitzats en d'altres treballs per a l'establiment de la relació entre ions precursors i els seus fragments [208-210]. En la Figura 3.20 es mostra un esquema de la macro. Per al seu desenvolupament i avaluació s'han emprat els ions producte característics generats per les sulfamides i les penicil·lines, les quals experimenten fragmentació a la font d'ionització (ESI) (Figura 3.21).

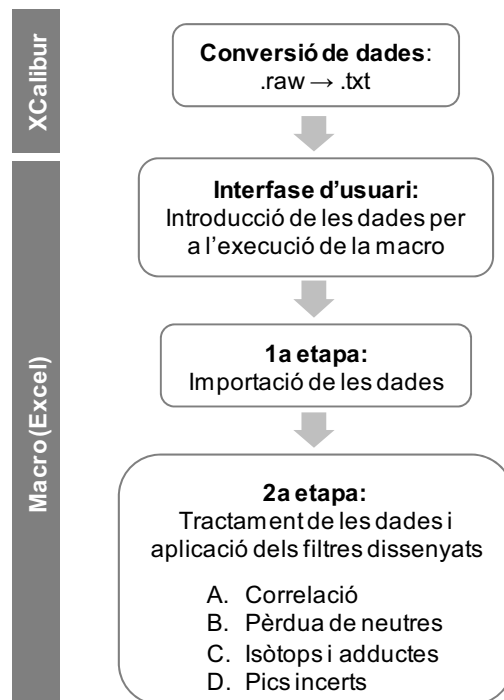


Figura 3.20. Diagrama de flux del funcionament de la macro.

A continuació, es descriuen les etapes i les instruccions de l'algoritme a partir de l'exemple corresponent a la identificació de l'ió precursor del fragment diagnòstic d'una de les 21 sulfamides (ió investigat m/z 156.01205) presents en una mostra de peix (Figura 3.22):

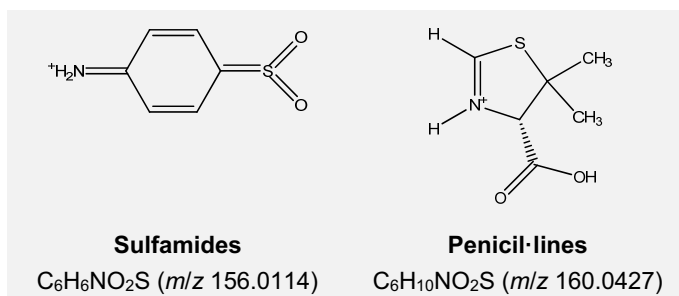


Figura 3.21. Ions fragment característics de dues famílies d'agents antimicrobians.

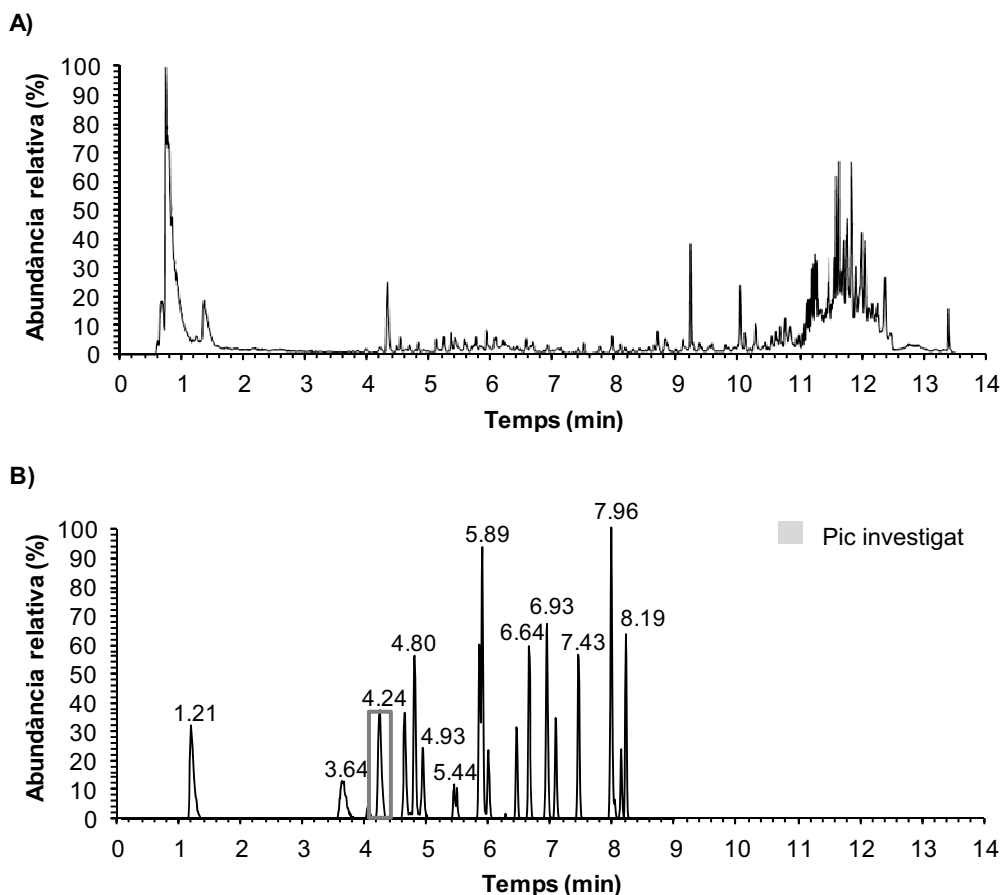


Figura 3.22. Mostra de peix dopada a $100 \mu\text{g L}^{-1}$: (A) cromatograma d'ions totals i (B) cromatograma d'ions extrets corresponent a la massa exacta del fragment característic de les sulfamides (amplada de finestra: 5 ppm).

XCalibur

Dades

1. Conversió de l'arxiu de dades enregistrades sense tractar de la mostra problema (.raw → .txt) emprant el programari de l'instrument (XCalibur). Aquest pas previ és inevitable atès que la macro no pot interpretar les dades generades per l'Orbitrap en el seu format original.
2. Introducció en la interfase d'usuari de les dades necessàries per a l'execució, de manera independent, de les dues etapes de la macro: (1) importació de les dades i (2) processament de les dades (Figura 3.23).

Macro (Excel)

Interfase d'usuari

Importació de dades

	A	B	C	D	E
1	Data text file name	12_06_06_14.txt		Mass deviation for mass assignment (mDa)	5
2	Data text file location	C:\Macro\Data_precursor_fragment		Mass deviation for isotopes/adducts assignment (mDa)	2
3	Data set first scan	1		Minimum correlation (%)	80
4	Data set last scan	1690		Elemental compositions (no/yes)	na
5	Peak first scan	521			
6	Peak maximum scan	531			
7	Peak last scan	545			
8	Correlated mass	156.01205			
9	Search for (P=precursor/F=fragments)	P			

	Minimum	Maximum
Number of C	0	50
Number of H	0	80
Number of N	0	10
Number of O	0	20
Number of S	0	5
Number of Cl	0	2

INSTRUCTIONS:

A. DATA FILE GENERATION

1. Open the Thermo XCalibur <Tools < File converter
2. Convert the XCalibur File (*.raw) into a Text File (*.txt):
XCalibur File (*.raw) → ICIS File (*.dat) → XCalibur File (*.raw) → Text File (*.txt)
3. Save the Text File (*.txt)

B. RUN MACRO

1. Fill in the required fields in the "Input" sheet:
 - Text file name of the investigated data set (e.g. 12_06_06_13.txt)
 - Path text file where has been saved (e.g. C:\macro\data)
 - First scan number of the whole data set
 - Last scan number of the whole data set
 - First scan number of the investigated peak
 - Scan number corresponding to the maximum of the investigated peak
 - Last scan number of the investigated peak
 - Mass for which correlation is being done (corresponding to the maximum scan)
 - Search for possible precursors (P) or fragments (F) of the correlated mass
 - Mass deviation for mass assignment
 - Mass deviation for isotopes/adducts assignment
 - Minimum correlation applied (%)
 - Elemental composition calculation (no/yes)
 - Minimum and maximum number of each atom to be considered
2. Press the button "Import Data"
3. Press the button "Correlation"
4. Save the Excel file

Figura 3.23. Interfase d'usuari de la macro (full de càlcul "Input").

3. Execució de la primera etapa de la macro. Per a la correlació de l'ió investigat és necessari disposar dels diferents *full scans* (m/z detectades i abundància relativa) que defineixen el pic cromatogràfic corresponent. Aquesta etapa ha estat dissenyada per obtenir les dades de tots els *full scans* de la mostra problema de manera automatitzada ja que el programari de l'instrument (XCalibur) únicament permet fer-ho manualment, fet que resulta poc pràctic. Tenint en compte que en funció del poder de resolució de treball seleccionat i la durada del cromatograma el nombre de *full scans* enregistrats per mostra pot ser elevat (2 *full scans*/s a 50 000 FWHM), aquesta etapa ha requerit una optimització exhaustiva per tal de minimitzar el temps d'execució (transferència d'aproximadament 50 *full scans*/s).

La macro executa les següents instruccions (Figura 3.24):

- 3.1. Accedir a l'arxiu de text de les dades sense tractar.
- 3.2. Escanejar-lo i copiar únicament les dades de m/z i abundància relativa de cada *full scan* (Figura 3.25).
- 3.3. Importar les dades a l'Excel (Figura 3.26).

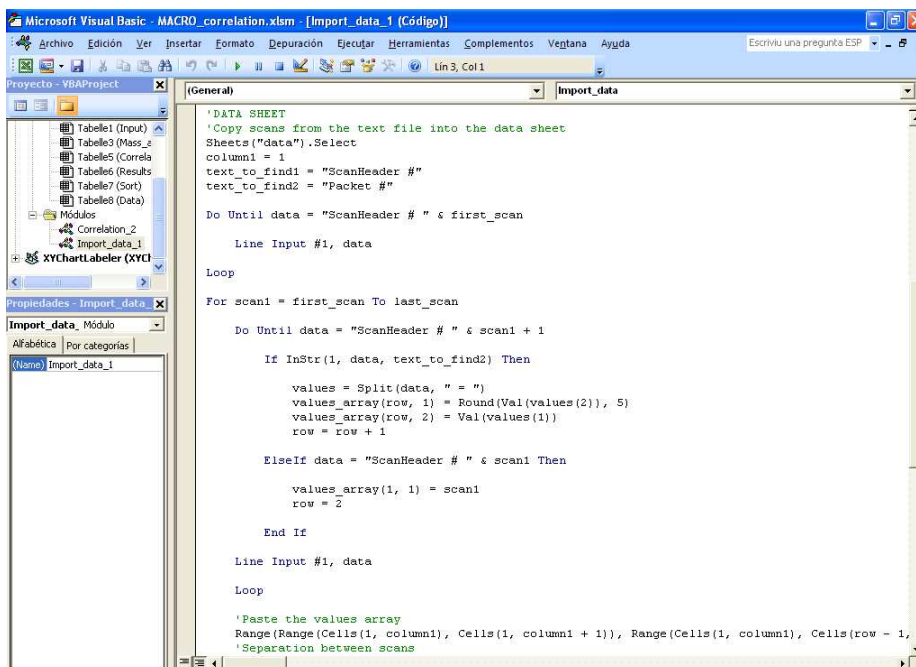


Figura 3.24. Fragment d'instruccions de la macro en codi de programació VBA.

```

ScanHeader #1
position = 1, start_mass= 140.000000, end_mass = 1000.000000
start_time = 0.002243, end_time = 0.000000, packet_type = 1
num_readings = 255, integ_intens = 1192700.000000, data packet pos = 0
uscancount = 0, PeakIntensity = 134762.000000, PeakMass = 157.035690
Scan Segment = ffff, Scan Event = ffff
Precursor Mass
Collision Energy
Isolation width
Polarity positive, Centroid Data, Full Scan Type, MS Scan
SourceFragmentation Off, Type Ramp, Values = 0, Mass Ranges = 0
Turbo Scan off, IonizationMode Electrospray, Corona Any
Detector Any, Value = 0.00, ScanTypeIndex = -1
DataPeaks

Packet # 0, intensity = 1195.000000, mass/position = 140.019882
saturated = 0, fragmented = 0, merged = 0

Packet # 1, intensity = 7706.000000, mass/position = 141.000916
saturated = 0, fragmented = 0, merged = 0

Packet # 2, intensity = 615.000000, mass/position = 141.041412
saturated = 0, fragmented = 0, merged = 0

Packet # 3, intensity = 990.000000, mass/position = 141.091476
saturated = 0, fragmented = 0, merged = 0

Packet # 4, intensity = 2932.000000, mass/position = 141.959244
saturated = 0, fragmented = 0, merged = 0

```

Figura 3.25. Fragment de l'arxiu de text (.txt) de les dades sense tractar.

Macro (Excel)

Importació de dades

Processament de dades

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1 Scan			2 Scan			3 Scan	
2	140.01988	1195		140.01967	1010		141.0009	6975
3	141.00092	7706		140.03429	713		141.09166	1711
4	141.04141	615		141.00087	7066		141.95911	2251
5	141.09148	990		141.01793	556		142.12288	721
6	141.95924	2932		141.0414	983		144.04819	2656
7	143.03424	803		141.09152	1233		144.06572	658
8	143.07077	1257		141.95902	2291		144.10272	491
9	144.04823	2868		142.86221	508		145.05005	1298
10	145.93036	822		143.07103	727		147.08414	529
11	146.08164	717		143.10709	756		148.13843	531
12	146.99646	644		144.04828	1685		148.6843	508
13	148.03926	439		144.0661	843		149.02388	17669
14	148.06074	900		145.08649	590		150.02728	1014
15	149.02388	16557		145.92992	966		150.95149	2551
16	150.02716	1242		146.08173	654		151.0358	1759
17	150.69141	427		146.96205	1161		151.07596	596
18	150.95151	2467		147.00803	1464		151.09665	795
19	151.03593	1147		148.30487	441		151.95944	1958
20	151.09705	1450		149.02383	21188		152.11208	583
21	151.95927	2235		150.02727	1834		152.96701	967
22	152.96716	1916		150.95158	3711		152.99808	1484
23	152.99847	744		151.03584	1514		153.9565	2163
24	153.95645	1595		151.07619	986		154.99075	2286
25	154.99086	2896		151.09694	2992		155.10745	1079
26	155.071	1057		151.95934	1307		155.97517	1264
27	155.10724	1038		152.01694	1007		157.03571	207340
28	156.46748	516		152.96716	1205		157.51543	7580
29	157.03569	134762		152.99814	1132		158.00334	5525
30	157.12289	1202		153.95648	2662		158.01665	636

Figura 3.26. Importació dels *full scans* (full de càlcul "Data").

4. Execució de la segona etapa de la macro. La localització de possibles ions precursors es basa en la correlació dels perfils dels pics cromatogràfics i de l'aplicació dels diferents filtres creats.

La macro executa les següents ordres:

- 4.1. Extreure les dades dels *full scans* corresponents a l'interval de temps d'elució del pic investigat (definit per l'usuari en la interfase).
- 4.2. Ordenar les dades en ordre creixent de *m/z*.
- 4.3. Assignar cada *m/z* a una *m/z* corresponent al *full scan* del màxim del pic investigat (*m/z* esperada) si la diferència de *m/z* < valor establert per l'usuari en la interfase (Figura 3.27).

- 4.4. Ordenar les dades en ordre creixent de *m/z* esperada i de *full scan*.

4.5. Filtre A. Correlació:

- 4.5.1. Transposar les dades.
- 4.5.2. Calcular la correlació (r^2) entre les abundàncies relatives al llarg dels perfils cromatogràfics dels pics corresponents a cada ió detectat i l'ió investigat (Figura 3.28 i Figura 3.29).

4.5.3. Ordenar les dades en ordre decreixent de correlació.

4.5.4. Descartar com a possibles precursors aquells ions amb una r^2 < mínima correlació establerta per l'usuari en la interfase.

	A	B	C	D	E	F
1	m/z	Abundance	Scan	Expected m/z		
2	140.01984	2148	521	140.01956		
3	140.01974	2781	522	140.01956		
4	140.01981	1105	523	140.01956		
5	140.01978	1185	524	140.01956		
6	140.0197	1649	525	140.01956		
7	140.0197	2351	526	140.01956		
8	140.01984	1643	527	140.01956		
9	140.01952	1913	528	140.01956		
10	140.0197	2721	529	140.01956		
11	140.01996	1885	530	140.01956		
12	140.01956	944	531	140.01956		
13	140.01953	1827	532	140.01956		
14	140.01964	1750	533	140.01956		
15	140.01959	1586	534	140.01956		
16	140.0199	2377	535	140.01956		
17	140.0197	3299	536	140.01956		
18	140.01971	3266	537	140.01956		
19	140.01979	2433	538	140.01956		
20	140.01978	2890	539	140.01956		
21	140.01959	1804	540	140.01956		
22	140.01981	2201	541	140.01956		
23	140.01985	617	542	140.01956		
24	141.00101	939	521	141.00105		
25	141.00113	1519	523	141.00105		
26	141.00105	886	524	141.00105		
27	141.00096	793	525	141.00105		
28	141.00095	1176	526	141.00105		
29	141.00098	855	527	141.00105		
30	141.00085	720	528	141.00105		

Figura 3.27. Assignació i ordenació de les m/z (full de càlcul "Mass_assignment").

	A	B	C	D	E	F	X	Y	Z	AA
1	Expected m/z	521	522	523	524	525	543	544	545	Correlation
2	156.01205	0	802	1250	1942	7862	2423	0	0	100.00
3	252.0641	0	0	2449	5061	0	0	0	0	98.69
4	251.06084	0	1537	5072	20197	58964	29044	21082	17647	98.31
5	273.043	0	0	0	0	1466	1920	0	0	97.70
6	253.05655	0	0	0	1390	2262	0	0	0	94.58
7	204.04463	0	0	0	0	2400	0	0	0	92.03
8	174.02274	0	0	0	0	0	0	0	0	91.98
9	279.09222	1990	3229	1091	10592	65312	25530	15867	16654	91.72
10	281.08804	0	0	0	0	2343	0	0	0	91.06
11	280.09552	0	0	0	1863	5712	3390	0	0	90.39
12	185.08301	0	0	0	0	0	0	0	0	89.90
13	187.09868	0	805	0	692	0	0	0	0	89.67
14	186.03397	0	0	0	0	0	0	0	0	88.14
15	252.0574	0	0	0	0	0	0	0	0	87.50
16	274.04617	0	0	0	0	0	0	0	0	86.89
17	523.0968	0	1268	0	0	0	0	0	0	85.07
18	289.0162	0	0	0	0	0	0	0	0	81.77
19	209.67691	0	0	0	0	0	0	0	0	81.42
20	282.09152	0	0	0	0	0	0	0	0	81.09
21	205.04816	0	0	0	0	0	0	0	0	81.01
22	279.47751	0	0	0	0	0	0	0	0	80.49
23	314.06976	0	0	0	0	0	0	0	0	80.30
24	278.70743	0	0	0	0	0	0	0	0	80.22
25	281.10037	0	0	0	0	0	0	0	0	79.78
26	253.07696	0	0	0	0	0	0	0	0	78.86
27	301.07419	0	0	0	0	0	0	0	0	73.96
28	589.3219	0	0	0	0	0	0	0	0	73.72
29	254.05949	0	0	0	0	0	0	0	0	73.65
30	245.10071	0	0	0	0	0	0	0	0	73.11

Figura 3.28. Correlació dels pics cromatogràfics (full de càlcul "Correlation").

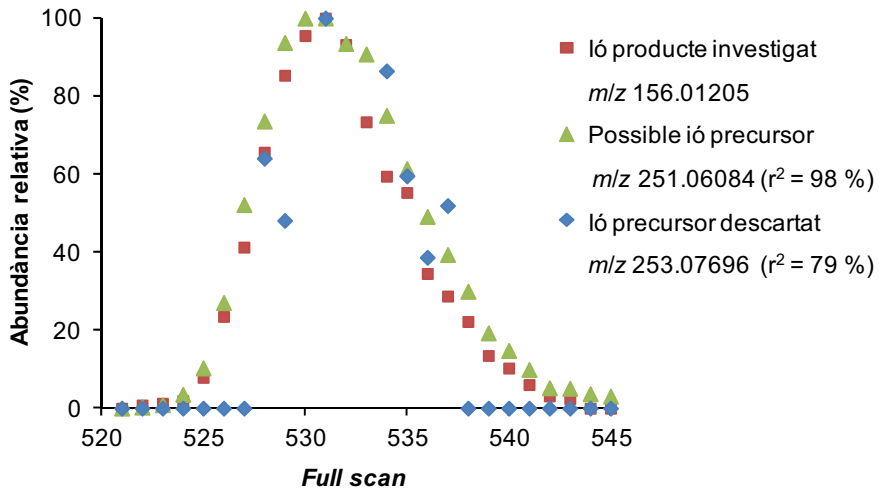


Figura 3.29. Comparació gràfica dels pics cromatogràfics.

4.6. Filtre B. Pèrdua de neutres:

- 4.6.1. Calcular la diferència de m/z entre l'ió investigat i cada possible ió precursor.
- 4.6.2. Descartar com a possibles precursors aquells ions amb una diferència de m/z no atribuïble a una composició elemental teòrica (amb un error $<$ valor establert per l'usuari en la interfase).

4.7. Filtre C. Isòtops i adductes:

- 4.7.1. Descartar com a possibles precursors aquells ions amb una diferència de m/z atribuïble a l'isòtop d'un element o a un adducte (amb un error $<$ valor establert per l'usuari en la interfase).

4.8. Filtre D. Eliminació de pics incerts:

- 4.8.1. Descartar com a possibles precursors aquells ions sense isòtops o adductes presents.

4.9. Generar la llista de possibles ions precursors després de l'aplicació dels diferents filtres, de dalt a baix es mostra (Figura 3.30):

Ió investigat

Possibles ions precursors

Ions descartats pel filtre D

Ions descartats pel filtre C

Ions descartats pel filtre B

Ions descartats pel filtre A

Macro (Excel)
Processament de dades

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1		m/z	Neutral loss	Correlation	Abundance				
2		156.01205		100	99502				
3		251.06084	95.04879	98.31	570939				
4		204.04463	48.03258	92.03	93134	13 + H2O	0.000095		
5		279.09222	123.08017	91.72	1703946				
6		174.02274	18.01069	91.98	4669	1 + H2O	0.000125		
7		186.03397	30.02192	88.14	4521				
8		252.0574	96.04535	87.5	7731				
9		523.0968	367.08475	85.07	11325				
10		279.47751	123.46546	80.49	4327				
11		252.0641	96.05205	98.69	57115	3 + C13	-0.000095		
12		273.043	117.03095	97.7	38308	3 + Na	0.000215		
13		253.05655	97.0445	94.58	25545	3 + S34	-0.000085	3 + Cl37	-0.00134
14		281.08804	125.07599	91.06	65554	8 + S34	0.000025	8 + Cl37	-0.00123
15		280.09552	124.08347	90.39	220227	8 + C13	-0.000055		
16		274.04617	118.03412	86.89	4787	2 + Na	0.000125	4 + C13	-0.000185
17		289.0162	133.00415	81.77	2455	3 + K	-0.000523		
18		282.09152	126.07947	81.09	8280	9 + C13	0.000125	10 + S34	0.000205
19		314.06976	158.05771	80.3	6868	4 + ACN	0.000211		
20		185.08301		89.9	4634				
21		187.09868		89.67	10602				
22		209.67691		81.42	5082				
23		205.04816		81.01	4681	6 + C13	0.000175		
24		278.70743		80.22	3629				
25		281.10037		79.78	6796				
26		253.07696		78.86	2277				
27		301.07419		73.96	6893				
28		589.3219		73.72	56162				
29		254.05949		73.65	2656				
30		245.10071		73.11	29049				

Figura 3.30. Resultats generats per la macro (full de càlcul "Results").

- Avaluació per part de l'usuari de la idoneïtat de cada candidat: l'ió precursor proposat amb una m/z més elevada (m/z 251.06084) correspon a la massa exacta de l'ió molecular de la SDZ ($[M+H]^+$ $C_{10}H_{11}N_4O_2S$, m/z 251.05970).

3.4.2.2. Exemple d'aplicació: assaig d'aptitud

Una de les tres mostres provinents de l'assaig d'aptitud, negativa als agents antimicrobians considerats en el mètode d'anàlisi, ha resultat finalment positiva a ceftiofur i a un dels seus metabòlits, el metil-S-S-desfuroilceftiofur. La presència de ceftiofur ha estat confirmada (temps de retenció i patró isotòpic) per comparació amb el patró de l'anàlit (Figura 3.31 i Figura 3.32). Pel que fa al seu metabòlit, inicialment identificat com a cefalotina, l'aplicació de la macro ha proporcionat informació fonamental per a l'elucidació de la seva composició elemental. A continuació, es resumeix el procediment seguit que ha permès la identificació del compost:

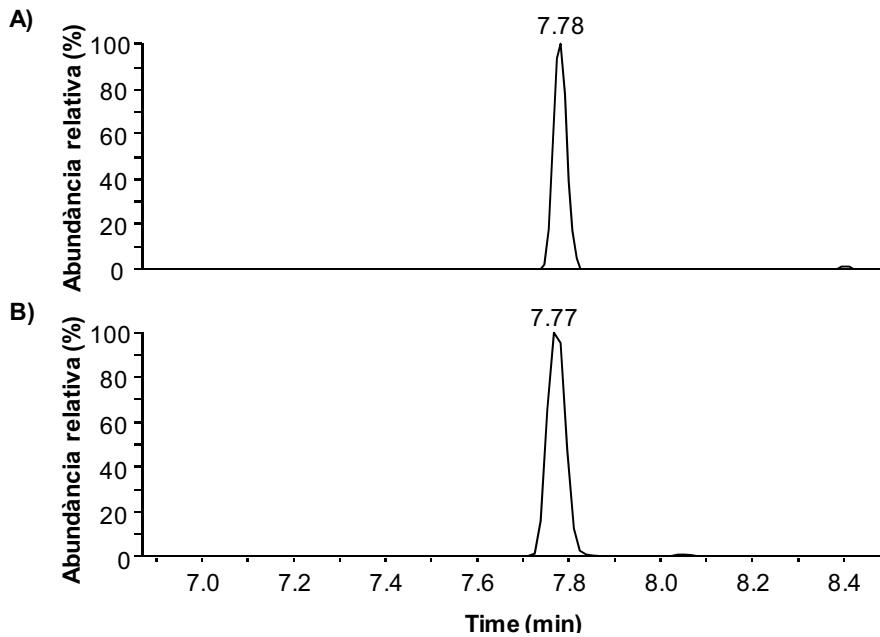


Figura 3.31. Cromatograma d'ions extrets a la massa exacta del ceftiofur ($[M+H]^+$ $C_{19}H_{18}N_5O_7S_3$, m/z 524.03629): (A) mostra d'assaig d'aptitud i (B) substància patró.

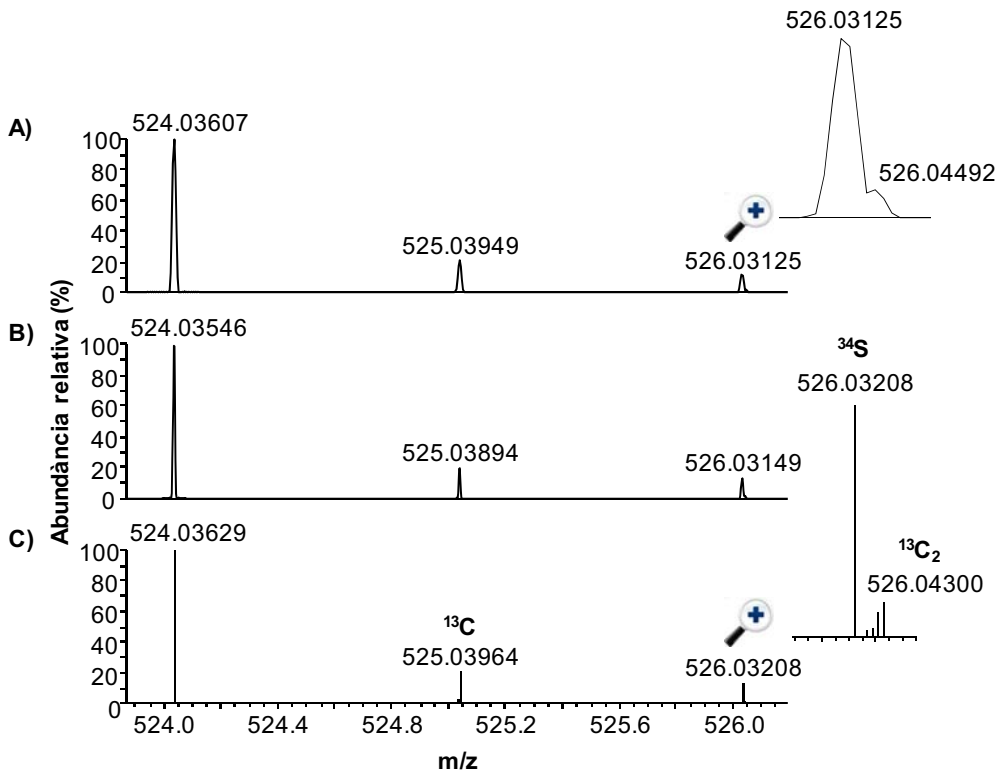


Figura 3.32. Patró isotòpic del ceftiofur ($[M+H]^+$ $C_{19}H_{18}N_5O_7S_3$): (A) mostra d'assaig d'aptitud, (B) substància patró i (C) simulació a partir de la composició elemental (XCalibur).

1. Metabòlit del ceftiofur amb massa exacta similar a la de la cefalotina ($[M+H]^+$ $C_{16}H_{17}N_2O_6S_2$, m/z 397.0523)?
 - 1.1. Cerca bibliogràfica: cap metabòlit del ceftiofur descrit amb massa 396.
 - 1.2. Hipòtesi descartada.
2. Fragment d'un metabòlit del ceftiofur que experimenta fragmentació a la font d'ionització?
 - 2.1. Aplicació de la macro per localitzar possibles precursors: un únic candidat proposat amb m/z 476 d'entre un total de 695 possibles (Figura 3.33).

	A	B	C	D	E	F	G
		m/z	Neutral loss	Correlation	Abundance		
1							
2	1	397.0509		100	53421		
3	2	476.01856	78.96766	99.23	620987		
4	19	700.4231	303.3722	82.39	6571		
5	3	478.01425	80.96335	98.74	95734	2 + S34	-0.000105
6	4	477.02222	79.97132	98.28	88336	2 + C13	0.000305
7	11	480.00983	82.95893	87.1	6288	3 + S34	-0.000215
8	5	366.03265		96.52	38583		
9	6	213.10959		92.66	33987		
10	7	241.03892		90.84	15570		
11	8	498.00046		90.33	13895	2 + Na	-0.000045
12	9	331.10736		89.39	5062		
13	10	479.01804		87.66	9193	4 + S34	0.000025
14	12	331.23086		85.38	52711	14 + C13	0.000085
15	13	428.31564		85.14	19996		
16	14	330.22742		84.98	255087		
17	15	398.05444		84.79	5817	1 + C13	0.000185
18	16	416.31601		84.49	11466		
19	17	182.02548		83.56	4183		
20	18	271.15402		83.35	7276		
21	20	367.03622		81.87	3697	5 + C13	0.000215
22	21	304.15765		80.68	61706		
23	22	429.3194		80.41	6237	13 + C13	0.000405
24		619.28955		79.06	12400		
25		285.01025		79.01	2969		
26		719.36133		78.27	12914		
27		201.04402		78.06	1863		
28		191.12784		77.97	7260		
29		720.36328		75.15	3521		
30		399.04611		74.96	3506		

Figura 3.33. Resultats generats per la macro: ions precursors.

- 2.2. Cerca bibliogràfica: cap metabòlit del ceftiofur descrit amb massa 475.
- 2.3. XCalibur: 52 composicions elementals calculades pel precursor proposat.
- 2.4. Aplicació de la macro per localitzar més fragments del precursor: quatre ions producte suggerits amb una $r^2 > 90\%$ (Figura 3.34).

	A	B	C	D	E	F	G
1		m/z	Neutral loss	Correlation	Abundance		
2	1	476.01856		100	620987		
3	2	397.0509	78.96766	99.23	53421		
4	5	366.03265	109.98591	96.8	38583		
5	6	213.10959	262.90897	94.45	33987		
6	7	241.03892	234.97964	92.56	15570		
7	15	271.15402	204.86454	85.8	7276		
8	18	182.02548	293.99308	84.45	4183		
9	17	398.05444	77.96412	85.11	5817	2 + C13	0.000185
10	20	367.03622	108.98234	82.28	3697	5 + C13	0.000215
11	3	478.01425		99.04	95734	1 + S34	-0.000105
12	4	477.02222		98.91	88336	1 + C13	0.000305
13	8	498.00046		91.33	13895	1 + Na	-0.000045
14	9	331.10736		90	5062		
15	10	479.01804		88.7	9193	4 + S34	0.000025
16	11	480.00983		88.49	6288	3 + S34	-0.000215
17	12	330.22742		88.02	255087		
18	13	331.23086		87.92	52711	12 + C13	0.000085
19	14	428.31564		86.82	19996		
20	16	700.4231		85.21	6571		
21	19	429.3194		82.92	6237	14 + C13	0.000405
22	21	619.28955		82.09	12400		
23	22	416.31601		81.77	11466		
24		719.36133		79.95	12914		
25		191.12784		79.06	7260		
26		285.01025		79.05	2969		
27		201.04402		78.27	1863		
28		304.15765		78.27	61706		
29		720.36328		77.61	3521		
30		291.24316		77.36	2521		

Figura 3.34. Resultats generats per la macro: ions producte.

2.5. Escombratge d'ions producte (*product ion scan*) mitjançant UPLC-MS/MS: confirmació de tres del quatre ions producte proposats per la macro (Figura 3.35).

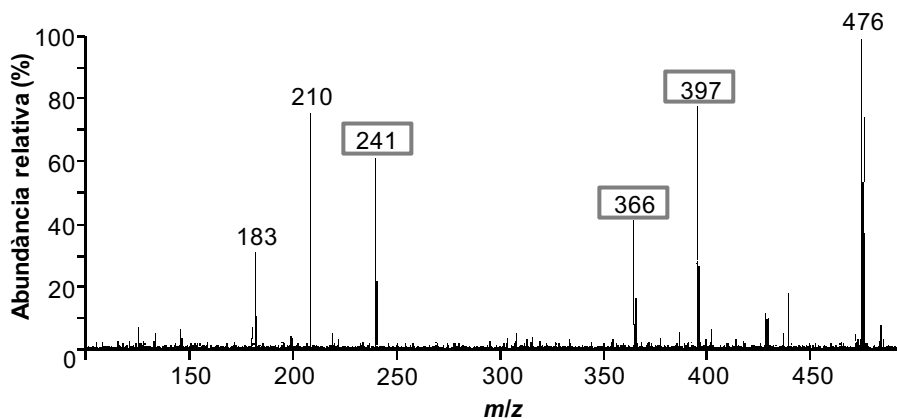


Figura 3.35. Espectre de masses d'ions producte de l'ió de m/z 476.

- 2.6. Elucidació de la composició elemental del precursor a partir de la composició elemental de l'ió producte de m/z inferior (241.03892) i de la corresponent pèrdua neutra (Figura 3.36).

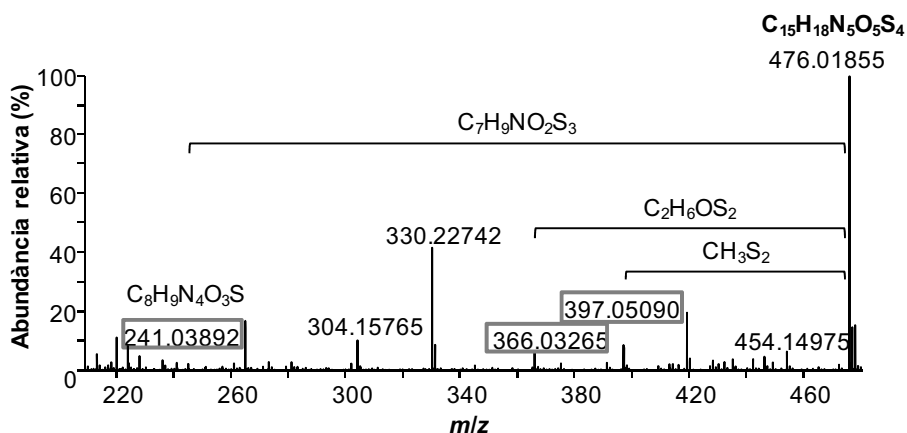


Figura 3.36. Espectre de masses *full scan* de la mostra problema.

- 2.7. Nova cerca bibliogràfica: metil-S-S-desfuroilceftiofur descrit com a metabòlit del ceftiofur amb composició elemental $C_{15}H_{18}N_5O_5S_4$ i massa 475 [211].
3. Hipòtesi confirmada: el pic cromatogràfic inicialment identificat com a cefalotina correspon a un fragment d'un metabòlit del ceftiofur (metil-S-S-desfuroilceftiofur) que experimenta fragmentació a l'electrosprai.

Estratègies per al processament automatitzat de les dades similars a la que aquí es proposa es podrien desenvolupar també per a d'altres aplicacions, com ara per a la detecció de la presència en la mostra de: compostos que contenen àtoms amb clústers isotòpics característics (Cl, S, etc.), anàlits que donen lloc a determinades pèrdues de molècules neutres (H_2O , NH_3 , etc.) o compostos desconeguts en aplicacions *non-targeted*.

CONCLUSIONS

Capítol 4

Del treball realitzat en aquesta tesi doctoral es poden extreure les conclusions següents:

a) Mètodes multiresidu per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos:

- Els dos mètodes multiresidu basats en la LC-FL permeten la determinació de 8 sulfamides en pinsos, prèvia derivatització amb fluorescamina, i de 6 fluoroquinolones amb una bona sensibilitat i selectivitat, sense necessitat de dur a terme una etapa de purificació dels extractes.
- L'agitació manual emprant mescles hidroorgàniques ha resultat una tècnica simple, ràpida i eficient per a l'extracció dels anàlits. Les recuperacions obtingudes oscil·len entre 73-99 % i 80-105 % per a les sulfamides i les fluoroquinolones, respectivament. Altres tècniques, com ara l'agitació mecànica, no milloren significativament els rendiments d'extracció i comporten un increment del temps d'anàlisi.
- Per a l'extracció de les sulfamides, l'ús d'acetat d'etil, menys polar que l'acetonitril, i la disminució del percentatge d'aigua del 5 % a l'1 % proporciona extractes amb un contingut menor d'interferències sense afectar negativament la recuperació dels anàlits. En el cas de les fluoroquinolones, l'eficiència de l'extracció amb mescles hidroorgàniques àcides és superior a l'obtinguda en condicions neutres o bàsiques.
- Per a la separació cromatogràfica dels derivats de les sulfamides, l'ús de la columna de llargada inferior i de partícules C_{18} de diàmetre més petit i de nucli sòlid proporciona una millor resolució i sensibilitat que la columna C_{18} de rebliment totalment porós en un sistema d'HPLC convencional. Per a la majoria de les sulfamides, la sensibilitat augmenta entre un 20-80 % en les diferents matrius de pinso estudiades. Aquesta columna també permet reduir el temps d'anàlisi i estalviar en el consum de dissolvents, amb el consegüent augment de la productivitat del laboratori i la reducció dels costos.
- Els LOD i LOQ per a les sulfamides emprant la columna convencional són inferiors a 230 i 760 ng g⁻¹, respectivament, i disminueixen fins a 100 i 340 ng g⁻¹ amb la columna de partícules de nucli sòlid. En el cas de les

fluoroquinolones, els LOD i LOQ són inferiors a 105 i 350 ng g⁻¹, respectivament.

- L'ús d'un detector convencional de FL constitueix una alternativa econòmica a la MS i permet l'aplicació dels mètodes en qualsevol laboratori de rutina. No obstant, a diferència de la LC-MS/MS no permet la confirmació dels anàlits.

b) Mètode multiclasse per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos:

- El mètode multiclasse establert basat en la LC-MS/MS cobreix de manera simultània el cribatge, la confirmació i la quantificació en pinsos de 50 agents antimicrobians pertanyents a 13 famílies diferents.
- L'extracció assistida per ultrasons emprant una mescla hidroorgànica (ACN:MeOH:tampó McIlvaine-EDTA) ha resultat una tècnica simple, ràpida i eficient per a l'extracció simultània d'un elevat nombre d'agents antimicrobians amb propietats fisicoquímiques diverses. En aquestes condicions, les recuperacions oscil·len entre 78-114 %.
- Per a la majoria dels compostos, l'ús de la columna cromatogràfica C₁₈ de partícules de nucli sòlid proporciona una major resolució i sensibilitat que la columna convencional d'UHPLC. L'elució de tots dels 50 anàlits té lloc en 16 minuts.
- L'estudi de diferents tipus de pinsos ha mostrat que la quantificació en la detecció per MS/MS es veu afectada per l'existència d'efecte matriu. En funció de l'anàlit, aquest és més o menys significatiu i variable, tant entre pinsos destinats a la mateixa com a diferents espècies animals. Aquest fet és atribuïble a la gran complexitat i variabilitat en les composicions dels pinsos.
- Les estratègies de *clean-up* avaluades basades en la SPE i la d-SPE proporcionen baixes recuperacions per a algunes de les famílies d'agents antimicrobians i no han resultat més efectives per a la reducció de l'efecte matriu que una simple dilució dels extractes abans d'injectar.

- Per a la quantificació del anàlits que presenten variacions en l'efecte matriu inferiors al 20 %, tant intra com interespècie (66 %), pot emprar-se el calibratge *matrix-fortified* emprant una matriu de pinso com a representativa. Per al 34 % restant que mostren variacions superiors al 20 %, la quantificació acurada de les mostres positives a aquests compostos requereix l'ús de l'addició estàndard.
 - La detecció per MS/MS emprant un analitzador de QqQ ofereix una elevada selectivitat i sensibilitat. Els LOD i LOQ obtinguts oscil·len entre 0.1-71 i 0.2-238 ng g⁻¹, respectivament. En el cas dels coccidiostàtics, els límits assolits permeten la seva quantificació i confirmació als nivells màxims permesos de contaminació creuada establerts en la legislació europea (1 % del contingut màxim autoritzat).
 - El desenvolupament d'aquest mètode ha permès unificar i simplificar els 12 mètodes emprats al LAC, així com duplicar el nombre d'agents antimicrobians que poden ser analitzats en els controls oficials de mostres de pinsos. La seva aplicació comporta una disminució considerable del temps d'anàlisi, un augment de l'eficiència del laboratori i una reducció del cost d'anàlisi.
- c) Correlació d'ions en espectrometria de masses d'alta resolució:
- L'adquisició d'espectres de masses d'escombratge complet (*full scan*) en HRMS (Orbitrap) en combinació amb la macro desenvolupada ha demostrat ser una alternativa als escombratges d'ions precursor i d'ions producte basats en la MS/MS. La major sensibilitat i selectivitat de la HRMS poden resultar especialment beneficioses per a la detecció d'aquests ions en matrius complexes i/o presents a baixes concentracions.
 - L'establiment de la relació ió precursor/ió producte basada principalment en la correlació dels pics cromatogràfics permet eliminar la major part dels ions no relacionats amb l'ió investigat.

- L'aplicació de la macro juntament amb l'exactitud de massa de la HRMS permet l'elucidació de la composició elemental de compostos desconeguts a partir de les composicions elementals dels ions producte localitzats i de les corresponents pèrdues neutres.

La contribució d'aquesta tesi al desenvolupament de metodologies per a l'anàlisi de baixes concentracions d'agents antimicrobians en pinsos s'ha recollit en la Taula 4.1. Els diferents mètodes són adequats per al seguiment de la qualitat dels pinsos i el control de la contaminació creuada, tant en laboratoris de control oficial com a les fàbriques de pinsos, garantint així la seguretat del pinsos i, per tant, de la primera etapa de la cadena alimentària.

Taula 4.1. Mètodes establerts en aquesta tesi per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos.

Table 3. (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
<i>QUINOLONES</i>								
Marbofloxacin	Cow	<i>Technique:</i> manual	Dilution	LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 2.6 μm) at 25°C	80-105	<i>LOD:</i> 6-105	(a)
Ciprofloxacin	Lamb	shaking					<i>LOQ:</i> 20-350	
Danofloxacin	Pig	<i>Time:</i> 2 min			<i>Mobile phase A:</i> pH 4.0 buffer		<i>CCα:</i> 10-1400	
Enrofloxacin	Poultry	<i>Solvent:</i> 0.05 M HCl:ACN (50:50)			<i>Mobile phase B:</i> ACN		<i>CCβ:</i> 60-1600	
Sarafloxacin					<i>Elution:</i> gradient			
Difloxacin								
<i>SULFONAMIDES</i>								
Sulfadiazine	Chicken	<i>Technique:</i> manual	Dilution	LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (250 x 4 mm, 5 μm) at 25°C	60-114	<i>LOD:</i> 10-230	(b)
Sulfadimidine	Cow	shaking					<i>LOQ:</i> 20-760	
Sulfamethoxy-pyridazine	Hen	<i>Time:</i> 1 min			<i>Mobile phase A:</i> pH 3.4 buffer			
Sulfachloropyridazine	Pig	<i>Solvent:</i> ethyl acetate:H ₂ O (99:1)			<i>Mobile phase B:</i> ACN			
Sulfadoxine	Piglet				<i>Elution:</i> gradient			
Sulfamethoxazole	Rabbit				Pre-column derivatization with 0.2% fluorescamine in ACN (2 h)			
Sulfadimethoxine					<i>Internal standard:</i> sulfamethoxydiazine			
Sulfaquinoxaline				LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 2.6 μm) at 25°C	61-111	<i>LOD:</i> 10-100	
							<i>LOQ:</i> 20-340	
					<i>Mobile phase A:</i> pH 3.4 buffer			
					<i>Mobile phase B:</i> ACN			
					<i>Elution:</i> gradient			
					Pre-column derivatization with 0.2% fluorescamine in ACN (2 h)			
					<i>Internal standard:</i> sulfamethoxydiazine			

Taula 4.1. Mètodes establerts en aquesta tesi per a l'anàlisi d'agents antimicrobians en pinsos.**Table 3.** (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
<i>MULTICLASS</i>								
50 antimicrobials	Cattle Pig Poultry	<i>Technique:</i> sonication <i>Time:</i> 15 min <i>Solvent:</i> MeOH:ACN: pH 4.6 McIlvaine buffer (37.5:37.5:25) with 0.3% of 0.5 M Na ₂ EDTA	Dilution	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 μm) at 35°C <i>Mobile phase A:</i> 5 mM acid formic <i>Mobile phase B:</i> 50 mM acid formic in ACN <i>Elution:</i> gradient <i>Surrogate standards:</i> nigericin, roxitromycin, demeclocycline, phenylsulfadimidine- ¹³ C ₆ , norfloxacin-d ₅ , ronidazole-d ₃	78-116	<i>LOD:</i> 0.1-71 <i>LOQ:</i> 0.2-238 <i>CCα:</i> 7.8-1303 <i>CCβ:</i> 8.2-1356	(c)

(a) Publicació III. Borràs, S.; Ríos-Kristjánsson, J.G.; Companyó, R.; Prat, M.D., *Analysis of fluoroquinolones in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Separation Science **2012**, 35(16), 2048-2053.

(b) Publicació II. Borràs, S.; Companyó, R.; Guiteras, J., *Analysis of sulfonamides in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **2011**, 59(10), 5240-5247.

(c) Publicació IV. Borràs, S.; Companyó, R.; Guiteras, J.; Bosch, J.; Medina, M.; Termes, S., *Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **2013**, 405(26), 8475-8486.

From the work carried throughout this doctoral thesis, the following conclusions can be drawn:

a) Multiresidue methods for the analysis of antimicrobial agents in animal feeds:

- The two multiresidue methods based on LC-FL allow the sensitive and selective determination of 8 sulfonamides in feeds, after derivatization with fluorescamine, and of 6 fluoroquinolones, without the need of sample clean-up.
- Manual shaking using hydro-organic mixtures has proved to be a simple, rapid, and efficient technique for the extraction of analytes. The mean recoveries obtained range from 73-99 % and 80-105 % for sulfonamides and fluoroquinolones, respectively. Other techniques, such as mechanical shaking, do not improve significantly the recovery yields and also lead to an increase in the analysis time.
- For the extraction of sulfonamides, the use of ethyl acetate, less polar than acetonitrile, and the decrease in the percentage of water from 5 % to 1 % provide extracts containing less interferences, without negatively affecting the recovery of the analytes. In the case of fluoroquinolones, the extraction efficiency using acid hydro-organic mixtures is higher than that obtained in neutral or basic conditions.
- For the separation of the sulfonamide derivatives, the use of the shorter chromatographic column of C₁₈ solid core particles of smaller size provides better resolution and sensitivity than the totally porous C₁₈ column. For most of the sulfonamides, the sensitivity increases between 20-80 % in the different feed matrices tested. This column also allowed the reduction of the analysis time and to save on the amount of solvent used, increasing the laboratory productivity and decreasing the costs.
- The LOD and LOQ for sulfonamides using the conventional column are below 230 and 760 ng g⁻¹, respectively, and decreased to 100 and 340 ng g⁻¹ when using the solid core particles column. In the case of fluoroquinolones, the LOD and LOQ are below 105 and 350 ng g⁻¹, respectively.

- The use of a conventional FL detector does not allow the confirmation of the analytes, but it allows the methods to be used in any routine laboratory, as it avoids the costs of acquisition and maintenance of LC-MS/MS instruments.

b) Multiclass method for the analysis of antimicrobial agents in animal feeds:

- The multiclass method developed based on LC-MS/MS covers simultaneously the screening, confirmation and quantification in feed of 50 antimicrobial agents belonging to 13 different families.
- The ultrasonic assisted extraction using a hydro-organic mixture (ACN: MeOH: McIlvaine-EDTA buffer) has proved to be a simple, fast and efficient technique for the simultaneous extraction of a large number of antimicrobial agents with different physicochemical properties. Under these conditions, the mean recoveries ranged from 78-114 %.
- For most compounds, the use of the chromatographic column of solid core C₁₈ particles provides higher resolution and sensitivity than a conventional UHPLC column. All 50 analytes eluted in 16 minutes.
- The study of different types of feeds has shown that the quantification by MS/MS is affected by matrix effects. Depending on the analyte, these effects are significant and can vary between feeds intended for the same or different animal species. This can be due to the high complexity and variability of feed composition.
- The SPE and d-SPE based clean-up strategies evaluated showed low recoveries for some families of antimicrobials, and were ineffective in reducing the matrix effects, when comparing with a simple dilution of the extracts before injection.
- For the quantification of the analytes showing matrix effects variation below 20 %, both intra- and interspecies (66 %), matrix-fortified calibration curves can be used, prepared with a representative feed matrix. For compounds showing a difference in matrix effects higher than 20 % (34 %), the standard addition method must be applied for the accurate quantification of positive samples.

- MS/MS detection using a QqQ mass analyzer provides high selectivity and sensitivity. LOD and LOQ ranged from 0.1-71 and 0.2-238 ng g⁻¹, respectively. Limits obtained for the coccidiostats allow their quantification and confirmation, at the maximum permitted levels of cross-contamination set in the European legislation (1 % of the authorised maximum content).
- The method developed allowed to cover and simplify the 12 methods implemented in the LAC, as well as to analyse an increased number of antimicrobials in the official feed controls. Its application entails a significant reduction of analysis time and cost, and increases the laboratory efficiency.

c) Correlation of ions in high-resolution mass spectrometry:

- The acquisition of full scan HRMS mass spectra, in combination with the developed macro, has proved to be a selective and sensitive alternative to the commonly used MS/MS precursor or product scans. The superior performance of a single-stage Orbitrap can be essential when dealing with small molecules (e.g. antimicrobials) present at low concentrations or in complex matrices.
- The link between a precursor ion and the corresponding product ion, based on the correlation of the chromatographic peak profiles, represents the most powerful criteria to remove ions that are not related with the investigated ion.
- Taking advantage of the HRMS exact mass measurements, the described macro is also a tool for improving the elucidation of elemental composition of unknown compounds, based on the elemental composition of the located product ions and the corresponding neutral losses.

The contribution of the present thesis to the development of methodologies for the analysis of low concentrations of antimicrobials in animal feeds is shown in Table 4.1. The proposed methods are suitable for controlling cross-contamination and for monitoring the quality of feeds, both in official control laboratories and feed mills, ensuring safety in the first stage of the food chain.

Table 4.1. Methods developed in this thesis for the analysis of antimicrobial agents in animal feeds.**Table 3.** (continued)

Compounds	Target species for feed use	Sample treatment		Analytical technique		Method performance		Ref.
		Extraction procedure	Clean-up	Detection system	Separative conditions	Recovery (%)	Limits (ng/g)	
<i>QUINOLONES</i>								
Marbofloxacin	Cow	<i>Technique:</i> manual	Dilution	LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 2.6 μm) at 25°C	80-105	<i>LOD:</i> 6-105	(a)
Ciprofloxacin	Lamb	shaking					<i>LOQ:</i> 20-350	
Danofloxacin	Pig	<i>Time:</i> 2 min			<i>Mobile phase A:</i> pH 4.0 buffer		<i>CCα:</i> 10-1400	
Enrofloxacin	Poultry	<i>Solvent:</i> 0.05 M HCl:ACN (50:50)			<i>Mobile phase B:</i> ACN		<i>CCβ:</i> 60-1600	
Sarafloxacin					<i>Elution:</i> gradient			
Difloxacin								
<i>SULFONAMIDES</i>								
Sulfadiazine	Chicken	<i>Technique:</i> manual	Dilution	LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (250 x 4 mm, 5 μm) at 25°C	60-114	<i>LOD:</i> 10-230	(b)
Sulfadimidine	Cow	shaking					<i>LOQ:</i> 20-760	
Sulfamethoxypyridazine	Hen	<i>Time:</i> 1 min			<i>Mobile phase A:</i> pH 3.4 buffer			
Sulfachloropyridazine	Pig	<i>Solvent:</i> ethyl acetate:H ₂ O (99:1)			<i>Mobile phase B:</i> ACN			
Sulfadoxine	Piglet				<i>Elution:</i> gradient			
Sulfamethoxazole	Rabbit				Pre-column derivatization with 0.2% fluorescamine in ACN (2 h)			
Sulfadimethoxine					<i>Internal standard:</i> sulfamethoxydiazine			
Sulfaquinoxaline				LC-FL	<i>Column:</i> C ₁₈ (150 x 4.6 mm, 2.6 μm) at 25°C	61-111	<i>LOD:</i> 10-100	
							<i>LOQ:</i> 20-340	
					<i>Mobile phase A:</i> pH 3.4 buffer			
					<i>Mobile phase B:</i> ACN			
					<i>Elution:</i> gradient			
					Pre-column derivatization with 0.2% fluorescamine in ACN (2 h)			
					<i>Internal standard:</i> sulfamethoxydiazine			

MULTICLASS

50 antimicrobials	Cattle Pig Poultry	<i>Technique:</i> sonication <i>Time:</i> 15 min <i>Solvent:</i> MeOH:ACN: pH 4.6 McIlvaine buffer (37.5:37.5:25) with 0.3% of 0.5 M Na ₂ EDTA	Dilution	LC-MS/MS	<i>Column:</i> C ₁₈ (100 x 2.1 mm, 1.7 µm) at 35°C <i>Mobile phase A:</i> 5 mM acid formic <i>Mobile phase B:</i> 50 mM acid formic in ACN <i>Elution:</i> gradient <i>Surrogate standards:</i> nigericin, roxitromycin, demeclocycline, phenylsulfadimidine- ¹³ C ₆ , norfloxacin-d ₅ , ronidazole-d ₃	78-116	<i>LOD:</i> 0.1-71 <i>LOQ:</i> 0.2-238 <i>CCα:</i> 7.8-1303 <i>CCβ:</i> 8.2-1356	(c)
-------------------	--------------------------	--	----------	----------	---	--------	---	-----

-
- (a) Publicació III. Borràs, S.; Ríos-Kristjánsson, J.G.; Companyó, R.; Prat, M.D., *Analysis of fluoroquinolones in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection*. *Journal of Separation Science* **2012**, 35(16), 2048-2053.
- (b) Publicació II. Borràs, S.; Companyó, R.; Guiteras, J., *Analysis of sulfonamides in animal feeds by liquid chromatography with fluorescence detection*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, 59(10), 5240-5247.
- (c) Publicació IV. Borràs, S.; Companyó, R.; Guiteras, J.; Bosch, J.; Medina, M.; Termes, S., *Multiclass method for antimicrobial analysis in animal feeds by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2013**, 405(26), 8475-8486.
-

REFERÈNCIES

1. Feed & food. Statistical yearbook 2012. Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés (FEFAC) 2013.
2. Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2001, L 311, 1-66.
3. Evaluation of the EU legislative framework in the field of medicated feed. Final report. Directorate General for Health & Consumers (DG SANCO). European Commission 2010.
4. Cancho Grande, B.; García Falcón, M.S.; Simal Gándara, J., El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. Ciencia y Tecnología Alimentaria. Sociedad Mexicana de Nutrición y Tecnología de Alimentos 2000, 3(1), 39-47.
5. Torres, C.; Zarazaga, M., Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? Gaceta Sanitaria 2002, 16(2), 190-112.
6. Reglamento (CE) Nº 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2003, sobre los aditivos en la alimentación animal. Diario Oficial de la Unión Europea 2003, L 286, 29-43.
7. Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011. Third European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) report. European Medicines Agency (EMA) 2013.
8. Martínez, J.A.; Sánchez, F., Mecanismo de acción de los antibióticos. Jano, Medicina y Humanidades 2007, 1660, 28-34.
9. Núñez, B., Mecanismos de acción de los antibióticos. Uso racional de antibióticos (Programa Merck) 2010, 2-5.
10. Calvo, J.; Martínez, L., Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2009, 27(1), 44-52.
11. Vidal, C.; Segura, M.; Santos, C., Altres antibacterians. Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia 2004, 55, 165-174.
12. Vicente, D.; Pérez-Trallero, E., Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2010, 28(2), 122-130.

13. Ruiz, J., Quinolones: acció i resistència. Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia 2004, 55, 135-142.
14. Alós, J.I., Quinolonas. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2009, 27(5), 290-297.
15. Mella, S.; Acuña, G.; Muñoz, M.; Perez, C.; Labarca, J.; Gonzalez, G.; Bello, H.; Dominguez, M.; Zemelman, R., Quinolonas: aspectos generales sobre su estructura y clasificación. Revista chilena de infectología 2000, 17(1), 53-66.
16. Reflection paper on the use of fluoroquinolones in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP) 2006.
17. Ribera, A., Tetraciclins. Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia 2004, 55, 121-134.
18. Bogialli, S.; Di Corcia, A., Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2009, 395(4), 947-966.
19. Miró, E.; Rivera, A.; Mesa, R.-J., Els β -lactàmics. Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia 2004, 55, 91-106.
20. Torres, C.; Sáenz, Y.; Portillo, A., Macròlids: mecanismes d'acció i de resistència. Antimicrobians. Treballs de la Societat Catalana de Biologia 2004, 55, 151-163.
21. Cobos-Trigueros, N.; Ateka, O.; Pitart, C.; Vila, J., Macrólidos y cetólidos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2009, 27(7), 412-418.
22. Reglamento (CE) N° 2821/98 del Consejo, de 17 de diciembre de 1998, por el que se modifica la Directiva 70/524/CEE sobre los aditivos en la alimentación animal, en lo que respecta a la revocación de la autorización de determinados antibióticos. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 1998, L 351 4-8.
23. Reflection paper on the use of macrolides, lincosamides and streptogramins (MLS) in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP) 2011.
24. Wang, J.; MacNeil, J.D.; Kay, J.F., Chemical analysis of antibiotic residues in food. John Wiley & Sons, Inc. 2011.

25. Reglamento (CE) N° 1756/2002 del Consejo, de 23 de septiembre de 2002, por el que se modifica la Directiva 70/524/CEE del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal en lo que respecta a la retirada de la autorización de un aditivo y el Reglamento (CE) N° 2430/1999 de la Comisión Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002, L 265 1-2.
26. Li, J.; Liu, J.X.; Wang, J.P., Multidetermination of four nitrofurans in animal feeds by a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009, 57(6), 2181-2185.
27. Reglamento (CE) N° 2788/98 de la Comisión, de 22 de diciembre de 1998, por el que se modifica la Directiva 70/524/CEE del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal, en lo que respecta a la revocación de la autorización de determinados factores de crecimiento. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 1998, L 347 31-32.
28. Reflection paper on the use of pleuromutilins in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for veterinary use (CVMP) 2012.
29. Oliveira, I.M., Terapèutica antiparasitària. Antimicrobians. *Treballs de la Societat Catalana de Biologia* 2004, 55, 213-229.
30. Anadón, A.; Martínez-Larrañaga, M.R., Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science* 1999, 59(2-3), 183-198.
31. Report COM(2008)233 final on the use of coccidiostats and histomonostats as feed additives. Commission of the European Communities 2008.
32. European Union register of feed additives. Directorate General for Health & Consumers (DG SANCO). European Commission 2013.
33. UK-VARSS 2012. UK veterinary antibiotic resistance and sales surveillance: Sales of antimicrobial products authorised for use as veterinary medicines in the UK in 2012. Veterinary Medicines Directorate (VMD) 2013.
34. NORM/NORM-VET 2012. Usage of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway Norwegian Veterinary Institute 2013.
35. SWEDRES-SVARM 2012. Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance in Sweden. Swedish Institute for Communicable Disease Control (Smi) i National Veterinary Institute (SVA) 2013.

36. Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Walsh, T.R., Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2001, 17(6), 431-437.
37. Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2009, L 152, 11-22.
38. Reglamento (UE) N° 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 los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2010, L 15, 1-72.
39. From farm to table. Key figures 2012. *Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés (FEFAC)* 2013.
40. Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 7 de mayo de 2002, sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2002, L 140 10-21.
41. Federació Europea de Fabricants d'Aliments Compostos (*Fédération Européenne des Fabricants d'Aliments Composés, FEFAC*). Disponible a: <http://www.fefac.eu> (darrera consulta: abril 2014).
42. Confederación Española de Fabricantes de Alimentos Compuestos para Animales (*CESFAC*). Disponible a: <http://www.cesfac.es> (darrera consulta: abril 2014).
43. Datos de producción de piensos 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (*MAGRAMA*) 2013.
44. Associació Catalana de Fabricants de Pensos (*ASFAC*). Disponible a: <http://www.asfac.org> (darrera consulta: abril 2014).
45. Producció de pinsos compostos a Catalunya 2012. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya 2013.
46. *Global Feed Summary*. Alltech 2013.

47. Reglamento (UE) N° 68/2013 de la Comisión, de 16 de enero de 2013, relativo al Catálogo de materias primas para piensos. Diario Oficial de la Unión Europea 2013, L 29, 1-64.
48. Feed materials register. Disponible a: <http://www.feedmaterialsregister.eu> (darrera consulta: abril 2014).
49. Matèries primeres utilitzades en l'elaboració de pinso 2012. Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya 2013.
50. Huyghebaert, G.; Ducatelle, R.; van Immerseel, F., An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal* 2011, 187(2), 182-188.
51. Falcão-e-Cunha, L.; Castro-Solla, L.; Maertens, L.; Marounek, M.; Pinheiro, V.; Freire, J.; Mourão, J.L., Alternatives to antibiotic growth promoters in rabbit feeding: a review. *World Rabbit Science* 2007, 15, 127-140.
52. Directiva 90/167/CEE del Consejo, de 26 de marzo de 1990, por la que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos en la Comunidad. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 1990, L 92, 42-48.
53. Reglamento (CE) N° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 31 de marzo de 2004, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. Diario Oficial de la Unión Europea 2004, L 136 1-33.
54. Base electrónica de medicamentos veterinarios autorizados. Disponible a: <https://sinaem4.agemed.es/consavetPub/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm> (darrera consulta: març 2014).
55. La vigilància i el control de medicaments veterinaris i els seus residus en animals i aliments d'origen animal a Catalunya. Anys 2011-2012. Agència Catalana de Seguretat Alimentària. Generalitat de Catalunya 2013.
56. Libro blanco sobre seguridad alimentaria COM(1999)719 final Comisión de las Comunidades Europeas 2000.
57. Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de

- Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 2002, L 31 1-24.
58. Reglamento (CE) N° 183/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de enero de 2005, por el que se fijan requisitos en materia de higiene de los piensos. Diario Oficial de la Unión Europea 2005, L 35, 1-22.
 59. El impacto de los piensos en la inocuidad de los alimentos. Informe de la Reunión Conjunta FAO/OMS de Expertos (FAO, Roma, 8-12 de octubre de 2007). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) 2008.
 60. Reglamento (UE) N° 574/2011 de la Comisión, de 16 de junio de 2011, por el que se modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo con respecto a los contenidos máximos de nitritos, melamina y *Ambrosia spp.*, y a la transferencia de determinados coccidiostáticos e histomonóstatos, y por la que se consolidan sus anexos I y II. Diario Oficial de la Unión Europea 2011, L 159, 7-24.
 61. Stolker, A.A.M.; Manti, V.; Zuidema, T.; van Egmond, H.; Deckers, E.R.; Herbes, R.; Hooglugt, J.; Olde Heuvel, E.; de Jong, J., Carry-over of veterinary drugs from medicated to non-medicated feeds in commercial feed manufacturing plants. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2013, 30(6), 1100-1107.
 62. Directiva 2009/8/CE de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que modifica el anexo I de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los contenidos máximos de coccidiostáticos o histomonóstatos presentes, como resultado de una transferencia inevitable, en los piensos a los que no están destinadas dichas sustancias. Diario Oficial de la Unión Europea 2009, L 40, 19-25.
 63. McEvoy, J.D.G., Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta* 2002, 473(1-2), 3-26.
 64. Vandenberghe, V.; Delezie, E.; Huyghebaert, G.; Delahaut, P.; Daeseleire, E.; Croubels, S., Residues of sulfadiazine and doxycycline in broiler liver and muscle tissue due to cross-contamination of feed. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2011, 29(2), 180-188.

65. Vandenberghe, V.; Delezie, E.; Huyghebaert, G.; Delahaut, P.; De Backer, P.; Daeseleire, E.; Croubels, S., Residues of sulfadiazine and doxycycline in egg matrices due to cross-contamination in the feed of laying hens and the possible correlation with physicochemical, pharmacokinetic and physiological parameters. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012, 29(6), 908-917.
66. Vandenberghe, V.; Delezie, E.; Huyghebaert, G.; Delahaut, P.; Pierret, G.; De Backer, P.; Croubels, S.; Daeseleire, E., Transfer of the coccidiostats monensin and lasalocid from feed at cross-contamination levels to whole egg, egg white and egg yolk. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2012, 29(12), 1881-1892.
67. Reglamento (CE) N° 124/2009 de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que establece los contenidos máximos de coccidiostáticos e histomonóstatos presentes en los alimentos como resultado de la transferencia inevitable de estas sustancias en los piensos a los que no están destinadas. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2009, L 40, 7-11.
68. Reglamento (UE) N° 610/2012 de la Comisión, de 9 de julio de 2012, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 124/2009 de la Comisión, de 10 de febrero de 2009, que establece los contenidos máximos de coccidiostáticos e histomonóstatos presentes en los alimentos como resultado de la transferencia inevitable de estas sustancias en los piensos a los que no están destinadas. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2012, L 178, 1-3.
69. Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. *Diario Oficial de la Unión Europea* 2004, L 165.
70. ISO/IEC 17025:2005 standard. Conformity assessment. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organisation for Standardization 2005.
71. ISO 9001:2008 standard. Quality management systems - Requirements. International Organisation for Standardization 2008.
72. Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). Disponible a: <http://www.enac.es/> (darrera consulta: abril 2014).

73. Directiva 96/23/CE del Consejo, 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. Diario Oficial de las Comunidades Europeas 1996, L 125, 10-32.
74. La vigilància i el control de medicaments veterinaris i els seus residus en animals i aliments d'origen animal a Catalunya. Any 2010. Agència Catalana de Seguretat Alimentària. Generalitat de Catalunya 2011.
75. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) Annual Report 2012. Health and Consumers Directorate-General. European Commission 2013.
76. RASFF Portal. Online searchable database 2013 Disponible a: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/> (darrera consulta: març 2014).
77. Kellmann, M.; Muenster, H.; Zomer, P.; Mol, H., 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* 2009, 20(8), 1464-1476.
78. Mol, H.G.J.; Plaza-Bolaños, P.; Zomer, P.; de Rijk, T.C.; Stolker, A.A.M.; Mulder, P.P.J., Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Analytical Chemistry* 2008, 80(24), 9450-9459.
79. Dusi, G.; Faggionato, E.; Gamba, V.; Baiguera, A., Determination of nicarbazin and clopidol in poultry feeds by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2000, 882(1-2), 79-84.
80. Hormazábal, V.; Yndestad, M., Rapid assay for the determination of zinc bacitracin in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2000, 23(7), 1083-1088.
81. Smallidge, R.L.; Albert, K.; Britton, N.L.; Campbell, H.M.; Jeon, C.-S.; Costello, S.; Elson, K.; Flood, K.; Lee, J.-K.; Lowie, D.M.; Moran, J.W.; Mustafa, M.; Poe, B.; Proksa, P.; Turner, J.M.; Weigand, J.L.; Wetzler, L.M., Determination of sulfamethazine in swine and cattle feed by reversed-phase liquid chromatography with post-column derivatization. Collaborative study. *J. AOAC Int.* 2000, 83(2), 260-268.

82. Cancho-Grande, B.; Rodríguez-Comesaña, M.; Simal-Gándara, J., Simple HPLC determination of colistin in medicated feeds by pre-column derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* 2001, 54(7), 481-484.
83. Capitán-Vallvey, L.; Navas, N.; Titos, A.; Checa, R., Determination of the antibiotic zinc bacitracin in animal food by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Chromatographia* 2001, 54(1), 15-20.
84. Hajee, C.A.J.; van Rhijn, H.A.; Lasaroms, J.J.P.; Keukens, H.J.; de Jong, J., Development and validation of a method for the determination of sub-additive levels of virginiamycin in compound animal feeds by liquid chromatography. *Analyst* 2001, 126(8), 1332-1338.
85. Spinks, C.A.; Schut, C.G.; Wyatt, G.M.; Morgan, C.M.R.A., Development of an ELISA for sulfachlorpyridazine and investigation of matrix effects from different sample extraction procedures. *Food Additives & Contaminants* 2001, 18(1), 11-18.
86. Touraki, M.; Ladoukakis, M.; Prokopiou, C., High-performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid and flumequine in the live fish feed *Artemia*. *Journal of Chromatography B* 2001, 751(2), 247-256.
87. Caballero, R.D.; Torres-Lapasió, J.R.; García-Alvarez-Coque, M.C.; Ramis-Ramos, G., Rapid liquid chromatographic determination of tetracyclines in animal feeds using a surfactant solution as mobile phase. *Analytical Letters* 2002, 35(4), 687-705.
88. Capitán-Vallvey, L.F.; Titos, A.; Checa, R.; Navas, N., High-performance liquid chromatography determination of Zn-bacitracin in animal feed by post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 2002, 943(2), 227-234.
89. Hormazabal, V.; Yndestad, M.; Ostensvik, O., Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2002, 25(17), 2655-2663.
90. Saad, B.; Mohamad, R.; Mohamed, N.; Lawrence, G.D.; Jab, M.S.; Idris Saleh, M., Determination of oxolinic acid in feeds and cultured fish using capillary electrophoresis. *Food Chemistry* 2002, 78(3), 383-388.

91. Pecorelli, I.; Galarini, R.; Bibi, R.; Floridi, A.; Casciarri, E.; Floridi, A., Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2003, 483(1-2), 81-89.
92. van Poucke, C.; De Keyser, K.; Baltusnikiene, A.; McEvoy, J.D.G.; van Peteghem, C., Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Analytica Chimica Acta* 2003, 483(1-2), 99-109.
93. Civitareale, C.; Fiori, M.; Ballerini, A.; Brambilla, G., Identification and quantification method of spiramycin and tylosin in feedingstuffs with HPLC-UV/DAD at 1 ppm level. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004, 36(2), 317-325.
94. Dousa, M.; Lemr, K.; Stransky, Z., Determination of methylbenzoate in premixes and animal feeds using liquid chromatography with fluorescence detection. *J. AOAC Int.* 2005, 88(3), 673-678.
95. Farer, L.J., Determination of emamectin benzoate in medicated fish feed: a multisite study. *J. AOAC Int.* 2005, 88(2), 462-467.
96. Gramse, M.J.; Jacobson, P.E., Determination of penicillin G in feeds by liquid chromatography with solid-phase extraction. *J. AOAC Int.* 2005, 88(3), 679-683.
97. Hayes, J.M., Determination of florfenicol in fish feed by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 2005, 88(6), 1777-1783.
98. Hutchinson, M.J.; Young, P.B.; Kennedy, D.G., Confirmatory method for the analysis of carbadox and olaquinox in porcine feedingstuffs using LC-electrospray MS-MS. *Food Additives & Contaminants* 2005, 22(2), 113-119.
99. Kot-Wasik, A.; Wasik, A., Determination of robenidine in animal feeds by liquid chromatography coupled with diode-array detection and mass spectrometry after accelerated solvent extraction. *Analytica Chimica Acta* 2005, 543(1-2), 46-51.
100. Morales-Muñoz, S.; de Castro, M.D.L., Dynamic ultrasound-assisted extraction of colistin from feeds with on-line pre-column derivatization and liquid chromatography-fluorimetric detection. *Journal of Chromatography A* 2005, 1066(1-2), 1-7.

101. Mortier, L.; Daeseleire, E.; Van Peteghem, C., Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. *Journal of Chromatography B* 2005, 820(2), 261-270.
102. Situ, C.; Elliott, C.T., Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay. *Analytica Chimica Acta* 2005, 529(1-2), 89-96.
103. Viñas, P.; Balsalobre, N.; Hernández-Córdoba, M., Determination of chloramphenicol residues in animal feeds by liquid chromatography with photo-diode array detection. *Analytica Chimica Acta* 2006, 558(1-2), 11-15.
104. Capitán-Vallvey, L.; Ariza, A.; Checa, R.; Navas, N., Liquid chromatography-mass spectrometry determination of six 5-nitroimidazoles in animal feedstuff. *Chromatographia* 2007, 65(5), 283-290.
105. De Baere, S.; De Backer, P., Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta* 2007, 586(1-2), 319-325.
106. Zhou, Y.X.; Yang, W.J.; Zhang, L.Y.; Wang, Z.Y., Determination of kanamycin A in animal feeds by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2007, 30(11), 1603-1615.
107. Focht, C., Determination of lasalocid sodium in animal feeds and premixes by reversed-phase liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2008, 91(3), 479-487.
108. Kesiunaite, G.; Naujalis, E.; Padarauskas, A., Matrix solid-phase dispersion extraction of carbadox and olaquinox in feed followed by hydrophilic interaction ultra-high-pressure liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* 2008, 1209(1-2), 83-87.
109. Sanchez, A.A.; Campbell, H.M., Determination of decoquinatone in animal feeds by liquid chromatography: collaborative study. *J. AOAC Int.* 2008, 91(4), 685-693.
110. Vincent, U.; Chedin, M.; Yasar, S.; von Holst, C., Determination of ionophore coccidiostats in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Part I. Application to targeted feed. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 47(4-5), 750-757.

111. Wang, L.; Yang, H.; Zhang, C.; Mo, Y.; Lu, X., Determination of oxytetracycline, tetracycline and chloramphenicol antibiotics in animal feeds using subcritical water extraction and high performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 2008, 619(1), 54-58.
112. Benito-Peña, E.; Urraca, J.L.; Moreno-Bondi, M.C., Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009, 49(2), 289-294.
113. Galarini, R.; Fioroni, L.; Angelucci, F.; Tovo, G.R.; Cristofani, E., Simultaneous determination of eleven quinolones in animal feed by liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216(46), 8158-8164.
114. Jiménez, V.; Companyó, R.; Guiteras, J., Preparation of quality control materials for the determination of sulfonamides in animal feed. *Food Additives & Contaminants, Part A* 2009, 26(7), 969-977.
115. Scortichini, G.; Annunziata, L.; Di Girolamo, V.; Buratti, R.; Galarini, R., Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay screening for quinolones in egg, poultry muscle and feed samples. *Analytica Chimica Acta* 2009, 637(1-2), 273-278.
116. Tong, J.; Rao, Q.; Zhu, K.; Jiang, Z.; Ding, S., Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *Journal of Separation Science* 2009, 32(23-24), 4254-4260.
117. van der Heeft, E.; Bolck, Y.J.C.; Beumer, B.; Nijrolder, A.W.J.M.; Stolker, A.A.M.; Nielen, M.W.F., Full-scan accurate mass selectivity of ultra-performance liquid chromatography combined with time-of-flight and orbitrap mass spectrometry in hormone and veterinary drug residue analysis. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2009, 20(3), 451-463.
118. Boscher, A.; Guignard, C.; Pellet, T.; Hoffmann, L.; Bohn, T., Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217(41), 6394-6404.
119. Cronly, M.; Behan, P.; Foley, B.; Malone, E.; Earley, S.; Gallagher, M.; Shearan, P.; Regan, L., Development and validation of a rapid multi-class method for the confirmation of fourteen prohibited medicinal additives in pig

- and poultry compound feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2010, 53(4), 929-938.
120. Delahaut, P.; Pierret, G.; Ralet, N.; Dubois, M.; Gillard, N., Multi-residue method for detecting coccidiostats at carry-over level in feed by HPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A* 2010, 27(6), 801-809.
 121. Jiménez, V.; Adrian, J.; Guiteras, J.; Marco, M.-P.; Companyó, R., Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detecting sulfonamides in feed resources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010, 58(13), 7526-7531.
 122. Kantiani, L.; Farré, M.; Grases i Freixiedas, J.M.; Barceló, D., Development and validation of a pressurised liquid extraction liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry method for β -lactams and sulfonamides in animal feed. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217(26), 4247-4254.
 123. Kantiani, L.; Farré, M.; Grases i Freixiedas, J.M.; Barceló, D., Determination of antibacterials in animal feed by pressurized liquid extraction followed by online purification and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 398(3), 1195-1205.
 124. van Holthoon, F.; Mulder, P.P.J.; van Bennekom, E.; Heskamp, H.; Zuidema, T.; van Rhijn, H., Quantitative analysis of penicillins in porcine tissues, milk and animal feed using derivatisation with piperidine and stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010, 396, 3027-3040.
 125. Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R.; Miralles, J.; Moreno, A., Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS. *Food Control* 2011, 22(6), 993-999.
 126. Cronly, M.; Behan, P.; Foley, B.; Malone, E.; Shearan, P.; Regan, L., Determination of eleven coccidiostats in animal feed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry at cross contamination levels. *Analytica Chimica Acta* 2011, 700(1-2), 26-33.
 127. Huang, M.; Braselton, W.E.; Rumbelha, W.K.; Johnson, M., Rapid and reliable identification of ionophore antibiotics in feeds by liquid chromatography-

- tandem mass spectrometry. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2011, 23(2), 358-63.
128. Iammarino, M.; Palermo, C.; Nardiello, D.; Muscarella, M., Optimization and validation of a confirmatory method for determination of ten sulfonamides in feeds by LC and UV-diode array detection. *Chromatographia* 2011, 73(1), 75-82.
129. Xu, H.; Wang, T.; Zhao, Q.; Zeng, Q.; Wang, H.; Xu, Y.; Zhang, X.; Wang, F.; Ding, L., Analysis of fluoroquinolones in animal feed based on microwave-assisted extraction by LC-MS-MS determination. *Chromatographia* 2011, 74(3-4), 267-274.
130. Guo, L.; Chen, Y.; Zhang, L.; Yang, W.; He, P., Development and validation of a liquid chromatographic/ tandem mass spectrometric method for determination of chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline in animal feeds. *J. AOAC Int.* 2012, 95(4), 1010-1015.
131. Kumar, P.; Companyó, R., Development and validation of an LC-UV method for the determination of sulfonamides in animal feeds. *Drug Testing and Analysis* 2012, 4(5), 368-375.
132. Vudathala, D.; Murphy, L., Rapid method for the simultaneous determination of six ionophores in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 2012, 95(4), 1016-22.
133. Aguilera-Luiz, M.M.; Romero-González, R.; Plaza-Bolaños, P.; Martínez-Vidal, J.L.; Garrido-Frenich, A., Wide-scope analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by liquid chromatography coupled to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013, 405(20), 6543-6553.
134. Kaklamanos, G.; Vincent, U.; von Holst, C., Analysis of antimicrobial agents in pig feed by liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2013, 1293(0), 60-74.
135. Martínez-Villalba, A.; Vaclavik, L.; Moyano, E.; Galceran, M.T.; Hajslova, J., Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2013, 27(3), 467-475.
136. Nacher-Mestre, J.; Ibáñez, M.; Serrano, R.; Pérez-Sánchez, J.; Hernández, F., Qualitative screening of undesirable compounds from feeds to fish by liquid

- chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013, 61(9), 2077-2087.
137. Rokka, M.; Jestoi, M.; Peltonen, K., Trace level determination of polyether ionophores in feed. *BioMed Research International* 2013, 2013, ID 151363.
138. Lopes, R.P.; de Freitas Passos, E.E.; de Alkimim Filho, J.F.; Vargas, E.A.; Augusti, D.V.; Augusti, R., Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control* 2012, 28(1), 192-198.
139. Ramos, L., Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A* 2012, 1221(0), 84-98.
140. Marazuela, M.D.; Bogialli, S., A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatography-based analytical methods. *Analytica Chimica Acta* 2009, 645(1-2), 5-17.
141. Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Furey, A.; Danaher, M., Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216(46), 7977-8015.
142. Berendsen, B.J.A.; Stolker, L.A.M.; Nielen, M.W.F., Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2013, 43(0), 229-239.
143. Chico, J.; van Holthoon, F.; Zuidema, T., Ion suppression study for tetracyclines in feed. *Chromatography Research International* 2012, 2012, ID 135854.
144. R-Biopharm AG. Disponible a: <http://www.r-biopharm.com/> (darrera consulta: març 2014).
145. Elisa Technologies, Inc. Disponible a: <http://www.elisa-tek.com/> (darrera consulta: març 2014).
146. Randox Laboratories. Disponible a: <http://www.randoxfooddiagnostics.com/> (darrera consulta: abril 2014).
147. Bioo Scientific Corp. Disponible a: <http://www.biooscientific.com/> (darrera consulta: març 2014).

148. Tecna - R&D Diagnostics - Biotechnology. Disponible a: <http://www.tecnalab.it/> (darrera consulta: març 2014).
149. Kaufmann, A., The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2012, 403(5), 1233-1249.
150. Holčápek, M.; Jirásko, R.; Lisa, M., Recent developments in liquid chromatography–mass spectrometry and related techniques. *Journal of Chromatography A* 2012, 1259(0), 3-15.
151. Decisión de la Comisión 2002/657/CE, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* 2002, L 221, 8-36.
152. Reglamento (CE) N° 152/2009 de la Comisión, de 27 de enero de 2009, por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los piensos 2009, 1-130.
153. Base de dades internacional de materials de referència certificats (Code d'Indexation des Matériaux de Référence, COMAR). Disponible a: <http://www.comar.bam.de/en/> (darrera consulta: març 2014).
154. European Proficiency Testing Information System (EPTIS). Disponible a: <http://www.eptis.bam.de/en/index.htm> (darrera consulta: març 2014).
155. Stolker, A.A.M.; Zuidema, T.; Nielen, M.W.F.; Nielen, M.W.F., Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007, 26(10), 967-979.
156. Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Disponible a: <http://www.aafco.org/> (darrera consulta: març 2014).
157. Ducares B.V. Disponible a: <http://www.ducares.nl/?lang=en> (darrera consulta: març 2014).
158. RIKILT Institute of Food Safety. Wageningen University and Research Centre. Disponible a: <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Research-Institutes/rikilt.htm> (darrera consulta: març 2014).
159. Progetto Trieste. Test Veritas S.r.l. Disponible a: <http://www.testveritas.com> (darrera consulta: març 2014).

160. Di Corcia, A.; Nazzari, M., Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products. *Journal of Chromatography A* 2002, 974(1–2), 53-89.
161. Gentili, A.; Perret, D.; Marchese, S., Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2005, 24(7), 704-733.
162. Cháfer-Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R., Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2010, 29(9), 1038-1049.
163. Stolker, A.A.M.; Brinkman, U.A.T., Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals—a review. *Journal of Chromatography A* 2005, 1067(1–2), 15-53.
164. Blasco, C.; Picó, Y.; Torres, C.M., Progress in analysis of residual antibacterials in food. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2007, 26(9), 895-913.
165. Mastovska, K., Multiresidue analysis of antibiotics in food of animal origin using liquid chromatography–mass spectrometry, in *Mass spectrometry in food safety : Methods and protocols* 2011. p. 267-307.
166. Samanidou, V.F.; Evaggelopoulos, E.N., Chromatographic analysis of banned antibacterial growth promoters in animal feed. *Journal of Separation Science* 2008, 31(11), 2091-2112.
167. Laboratori Agroalimentari de Cabrils de la Generalitat de Catalunya (LAC). Disponible a: www.gencat.cat/dar/laboratori (darrera consulta: abril 2014).
168. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA). Disponible a: www.irta.cat/ (darrera consulta: abril 2014).
169. Gritti, F.; Guiochon, G., Performance of columns packed with the new shell Kinetex-C18 particles in gradient elution chromatography. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217(10), 1604-1615.
170. Gritti, F.; Leonardis, I.; Shock, D.; Stevenson, P.; Shalliker, A.; Guiochon, G., Performance of columns packed with the new shell particles, Kinetex-C18. *Journal of Chromatography A* 2010, 1217(10), 1589-1603.

171. Samanidou, V.F.; Karageorgou, E.G., On the use of Kinetex™-C18 core-shell 2.6 µm stationary phase to the multiclass determination of antibiotics. *Drug Testing and Analysis* 2011, 3(4), 234-244.
172. Tylová, T.; Kameník, Z.; Flieger, M.; Olšovská, J., Comparison of LC columns packed with 2.6 µm core-shell and sub-2 µm porous particles for gradient separation of antibiotics. *Chromatographia* 2011, 74(1-2), 19-27.
173. SciFinder Scholar (calculat utilitzant el software Advanced Chemistry Development V11.02 © 1994-2013 ACD/Labs). (darrera consulta: novembre 2013).
174. Park, H.-R.; Kim, T.H.; Bark, K.-M., Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 37(6), 443-460.
175. Nollet, L.M.L.; Toldrà, F., Safety analysis of foods of animal origin. CRC Press 2010.
176. Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K.; Walker, S.; Widmer, M., Development of an improved high resolution mass spectrometry based multi-residue method for veterinary drugs in various food matrices. *Analytica Chimica Acta* 2011, 700(1-2), 86-94.
177. Jiménez, V.; Companyó, R.; Guiteras, J., Validation of a method for the analysis of nine quinolones in eggs by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta* 2011, 85(1), 596-606.
178. Kaufmann, A.; Butcher, P.; Maden, K., Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Analytica Chimica Acta* 2012, 711(0), 46-53.
179. Tölgyesi, Á.; Berky, R.; Békési, K.; Fekete, S.; Fekete, J.; Sharma, V.K., Analysis of sulfonamide residues in real honey samples using liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometry detection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2012, 36(8), 1105-1125.
180. Tölgyesi, Á.; Fekete, J.; Fekete, S.; Sharma, V.K.; Békési, K.; Tóth, E., Analysis of sub µg/kg lincomycin in honey, muscle, milk, and eggs using fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 2012, 50(3), 190-198.

181. Kaufmann, A.; Widmer, M., Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2013, 797(0), 81-88.
182. Lara, F.J.; del Olmo-Iruela, M.; García-Campaña, A.M., On-line anion exchange solid-phase extraction coupled to liquid chromatography with fluorescence detection to determine quinolones in water and human urine. *Journal of Chromatography A* 2013, 1310(0), 91-97.
183. Valera-Tarifa, N.M.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Martínez-Vidal, J.L.; Garrido-Frenich, A., Determination of nitrofurans metabolites in seafood by ultra high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* 2013, 30(2), 86-93.
184. Tölgyesi, Á.; Sharma, V.K.; Fekete, S.; Fekete, J.; Simon, A.; Farkas, S., Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012, 64–65(0), 40-48.
185. Phenomenex. Kinetex Core-Shell Technology. Disponible a: <http://www.phenomenex.com/Kinetex/CoreShellTechnology> (darrera consulta: febrer 2014).
186. Raich-Montiu, J.; Folch, J.; Compañó, R.; Granados, M.; Prat, M.D., Analysis of trace levels of sulfonamides in surface water and soil samples by liquid chromatography-fluorescence. *Journal of Chromatography A* 2007, 1172(2), 186-193.
187. Raich-Montiu, J., Metodologia analítica per a la determinació de sulfonamides i avermectines en mostres ambientals. Tesi doctoral. Departament de Química Analítica. Universitat de Barcelona 2011.
188. Berrada, H.; Borrull, F.; Font, G.; Moltó, J.C.; Marcé, R.M., Validation of a confirmatory method for the determination of macrolides in liver and kidney animal tissues in accordance with the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A* 2007, 1157(1–2), 281-288.
189. Blasco, C.; Di Corcia, A.; Picó, Y., Determination of tetracyclines in multi-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid

- chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 2009, 116(4), 1005-1012.
190. Bohm, D.A.; Stachel, C.S.; Gowik, P., Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A* 2009, 1216(46), 8217-8223.
191. Cinquina, A.L.; Longo, F.; Anastasi, G.; Giannetti, L.; Cozzani, R., Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. *Journal of Chromatography A* 2003, 987(1–2), 227-233.
192. Li, J.; Chen, L.; Wang, X.; Jin, H.; Ding, L.; Zhang, K.; Zhang, H., Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. *Talanta* 2008, 75(5), 1245-1252.
193. Pena, A.; Lino, C.M.; Alonso, R.; Barceló, D., Determination of tetracycline antibiotic residues in edible swine tissues by liquid chromatography with spectrofluorometric detection and confirmation by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007, 55(13), 4973-4979.
194. Peres, G.T.; Rath, S.; Reyes, F.G.R., A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food Control* 2010, 21(5), 620-625.
195. Shao, B.; Jia, X.; Wu, Y.; Hu, J.; Tu, X.; Zhang, J., Multi-class confirmatory method for analyzing trace levels of tetracycline and quinolone antibiotics in pig tissues by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 21(21), 3487-3496.
196. Vargas Mamani, M.C.; Reyes Reyes, F.G.; Rath, S., Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry* 2009, 117(3), 545-552.
197. Yue, Z.; Qiu, Y.; Liu, X.; Ji, C., Determination of multi-residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography-tandem positive-ion electrospray ionization mass spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2006, 34(9), 1255-1259.

198. Zhang, H.; Ren, Y.; Bao, X., Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009, 49(2), 367-374.
199. Chico, J.; Rúbies, A.; Centrich, F.; Companyó, R.; Prat, M.D.; Granados, M., Use of gel permeation chromatography for clean-up in the analysis of coccidiostats in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013, 405(14), 4777-4786.
200. Shao, B.; Wu, X.; Zhang, J.; Duan, H.; Chu, X.; Wu, Y., Development of a rapid LC–MS–MS method for multi-class determination of 14 coccidiostat residues in eggs and chicken. *Chromatographia* 2009, 69(9-10), 1083-1088.
201. Chico, J.; Rúbies, A.; Centrich, F.; Companyó, R.; Prat, M.D.; Granados, M., High-throughput multiclass method for antibiotic residue analysis by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2008, 1213(2), 189-199.
202. Moloney, M.; Clarke, L.; O'Mahony, J.; Gadaj, A.; O'Kennedy, R.; Danaher, M., Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2012, 1253(0), 94-104.
203. Kaufmann, A.; Widmer, M.; Maden, K., 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* 2010, 24(14), 2162-2170.
204. Kaufmann, A., Strategy for the elucidation of elemental compositions of trace analytes based on a mass resolution of 100 000 full width at half maximum. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2010, 24(14), 2035-2045.
205. Kaufmann, A., Determination of the elemental composition of trace analytes in complex matrices using exact masses of product ions and corresponding neutral losses. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2007, 21(13), 2003-2013.
206. Hu, Q.; Noll, R.J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R., The Orbitrap: a new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry* 2005, 40(4), 430-443.

207. Thermo Scientific. Disponible a: <http://www.thermoscientific.com/en/products/orbitrap-lc-ms.html> (darrera consulta: març 2014).
208. Geromanos, S.J.; Vissers, J.P.C.; Silva, J.C.; Dorschel, C.A.; Li, G.Z.; Gorenstein, M.V.; Bateman, R.H.; Langridge, J.I., The detection, correlation, and comparison of peptide precursor and product ions from data independent LC-MS with data dependant LC-MS/MS. *Proteomics* 2009, 9(6), 1683-1695.
209. Grange, A.H.; Sovocool, G.W., Automated determination of precursor ion, product ion, and neutral loss compositions and deconvolution of composite mass spectra using ion correlation based on exact masses and relative isotopic abundances. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2008, 22(15), 2375-2390.
210. Guan, F.; Uboh, C.E.; Soma, L.R.; You, Y.; Liu, Y.; Li, X., Correlation of product ion profiles with molecular structures of androgenic and anabolic steroids in ESI MS/MS. *Journal of Mass Spectrometry* 2010, 45(11), 1261-1269.
211. Beconi-Barker, M.G.; Davison, K.L.; Hornish, R.E.; Arnold, T.S.; Craigmill, A.L.; Gilbertson, T.J.; Smith, E.B.; Vidmar, T.J.; Hoffman, G.A.; Gatchell, C.L., [¹⁴C]Ceftiofur sodium absorption, distribution, metabolism, and excretion in sheep following intramuscular injections. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995, 43(6), 1589-1597.