



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Noves propostes per a l'anàlisi de medicaments d'ús veterinari i de toxines marines en aliments destinats al consum humà

Antoni Rúbies Prat

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.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Facultat de Química

Departament d'Enginyeria Química i de Química Analítica

Col·laboració amb:



Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona

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

Tesi doctoral

**NOVES PROPOSTES PER A L'ANÀLISI DE MEDICAMENTS D'ÚS
VETERINARI I DE TOXINES MARINES EN ALIMENTS DESTINATS AL
CONSUM HUMÀ**

Memòria presentada per

ANTONI RÚBIES PRAT

Per optar al títol de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Sota la direcció de:

Dra. MERCÈ GRANADOS JUAN

La Dra. **Mercè Granados**, professora titular del Departament d'Enginyeria Química i de Química Analítica de la Universitat de Barcelona

FA CONSTAR

Que la present memòria, titulada “**NOVES PROPOSTES PER A L'ANÀLISI DE MEDICAMENTS D'ÚS VETERINARI I DE TOXINES MARINES EN ALIMENTS DESTINATS AL CONSUM HUMÀ**” ha estat realitzada pel sr. Antoni Rúbies Prat en el Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona i que els resultats presentats en la mateixa són fruit de les experiències realitzades pel citat doctorand.

Barcelona maig de 2017

Dra. Mercè Granados i Juan

AGRAÏMENTS

Vull començar els agraïments recordant el Dr. Ramon Companyó. Amb ell vaig començar aquesta aventura i en aquest moment començo els agraïments dedicant-li aquest treball. Ell va ser un exemple com a gran persona i també com a professional. Amb la seva empenta em va transmetre l'estimació per la feina ben feta i va marcar el camí a seguir.

Seguidament vull agrair a la Dra. Mercè Granados la seva inestimable ajuda. Sense ella segur que no hauria arribat fins aquí. Amb el seu optimisme he tirat endavant en moments d'incertesa i de dubte. Ella ha estat un puntal fonamental en aquest treball i si he de definir algunes característiques seves serien la paciència i la professionalitat.

També vull agrair en aquest punt el recolzament rebut per Francesc Centrich ja que en tot moment ha cregut en el meu treball i m'ha facilitat tots els medis al seu abast per permetre el desenvolupament d'aquest treball. Gràcies a ell i als medis del Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona he pogut dur a terme tota la feina recollida en aquesta memòria.

Agraeixo així mateix als companys de treball del Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona el suport rebut, especialment a la Núria i les seves habilitats en l'edició.

Vull recordar la meva família, que m'ha recolzat en tot moment en les decisions que he pres, tot i que, de vegades no han estat compartides. Finalment vull agrair als meus amics i al Joan tota la seva ajuda i comprensió en les llargues estones i caps de setmana dedicats al desenvolupament de la feina inclosa en aquesta memòria.

GRÀCIES A TOTS!

ÍNDICE

INDEX:

1. RESUM.....	1
2. OBJECTIUS	7
3. INTRODUCCIÓ	11
3.1. La seguretat alimentària i el marc legal	15
3.2. Medicaments d'ús veterinari	17
3.3. Toxines marines.....	27
3.4. La cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses d'alta i de baixa resolució.....	30
4. ANÀLISI DE RESIDUS DE MEDICAMENTS D'US VETERINARI.....	43
4.1. Introducció	45
4.1.1. Metodologia analítica	45
4.1.2. Avermectines.....	55
4.1.3. Nitroimidazols.....	59
4.1.4. Antiinflamatoris no esteroideus	63
4.2. Resultats	
4.2.1. Publicació 1: "Determination of avermectins: A QuEChERS: approach to the analysis of food samples"	69
4.2.2. Publicació 2: "High-throughput method for the determination of nitroimidazoles in muscle samples by liquid chromatography coupled to mass spectrometry"	83
4.2.3. Publicació 3: "Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using a QuEChERS and líquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole vs Q-Orbitrap mass analyzers"	95
4.3. Discussió de resultats.....	107

5. ANÀLISI DE TOXINES MARINES LIPOFÍLIQUES	127
5.1. Introducció	129
5.1.1. Toxines marines estudiades i mecanisme d'acció.....	130
5.1.2. Mètodes d'anàlisi.....	139
5.1.3. Calibratge.....	146
5.2. Resultats	
5.2.1. Publicació 4: “New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in freshand canned bivalves by líquid chromatography coupled to highresolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach”	149
5.3. Discussió de resultats	161
6. CONCLUSIONS	175
7. BIBLIOGRAFIA.....	181

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ABA	Abamectina
ACN	Acetonitril
ADN	Àcid Desoxirribonucleic
AECOSAN	Agencia Española de Consumo y Seguridad Alimentaria
AOAC	Association of Analytical Communities
APCI	Ionització Química a Pressió Atmosfèrica
APPI	Fotoionització a Pressió Atmosfèrica
ARD	Dosi de Refèrència Aguda
ARIDs	Acute Reference Dose
ASP	Amnesic Shellfish Poisoning
AZAs	Azaspiràcids
AZP	Azaspiracid Poisoning
BEH	Ethylene Bridget Hybrid Technology
CCα	Límit de decisió
CCβ	Capacitat de detecció
CEPE	Comissió Econòmica per Europa de l'ONU
CFP	Ciguatera Poisoning
CIs	Imines Cícliques
CNA	Centro Nacional de Alimentación
COX	Ciclooxygenassa
CRM	Material de Referència Certificat
CRZ	Carnidazol
CTXs	Ciguatoxines
DA	Acid Domoic
DAD	Detector de Sèries de Diodes

DC	Diclofenac
DMZ	Dimetridazol
DORA	Doramectina
DSP	Diarrehetic Shellfish Poisoning
DTXs	Dinofisistoxines
ECD	Detector de captura d'electrons
EFSA	Agència Europea de Seguretat Alimentària
ELISA	Enzyme linked Immunosorbent Assay
EMA	Agència Europea del Medicament
EMAM	Emamectina
ENAC	Entitat Nacional Acreditació
EPRI	Eprinomectina
ESI	Electrosprai
EURL	Laboratori Europeu de Referència
EURLMB	Laboratori Europeu de Referència per Biotoxines Marines
FAO	Organització de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació
FDA	Food & Drugs Administration
FET	Factors d'Equivalència Tòxica
FID	Detector d'Ionització de Flama
FLD	Detector de Fluorescència
FLF	Ácid Flufenàmic
FLU	Flunixin
FT-ICR	Ressonancia Ciclotrònica d'Ions amb transformada de Fourier
GC	Cromatografia de Gasos

GC-MS	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de Masses
GNTXs	Goniautoxines
GYM	Gimnodimidines
HESI	Heated-Electrospray
HILIC	Cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica
HMMNI	Dimetridazol hidroxí
HOMO-YTX	Homo-Yessotoxina
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta resolució
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució
IC	Imines Cícliques
IPZ	Ipronidazol
IPZ-OH	Ipronidazol hidroxí
IT	Trampa d'ions
IVE	Ivermectina
JECFA	Joint Fao/Who Expert Committee on Food
KB	Línea cel·lular humana derivada del carcinoma Epidermoide
KTP	Ketoprofè
LASPB	Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona
LC	Cromatografia de Líquids
LC-MS	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
LC-MS/MS	Cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem
LD	Limit de detecció

LIT	Trampa Lineal
FT	Transformada de Fourier
LLE	Liquid-Liquid extraction
LMR	Limits màxim de residu
LNR	Laboratori Nacional de Referència
LQ	Límit de quantificació
LRMS	Espectrometria de masses de baixa resolució
MBTX	Toxines Marines Lipofilíques
MEC	Ácid Meclofenàmic
MIPs	Polimers d'empremta molecular
MLX	Meloxicam
MNZ	Metronidazol
MNZ-OH	Metronidazol hidroxí
MOXI	Moxidectina
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MRPL	Límit mínim de funcionament requerit
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem
MU	Unitats Ratolí
NFL	Ácid Niflúmic
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NSAIDs	Antiinflamatoris no esteroideus
NSP	Neurotoxic Shellfish Poisoning
NSXs	Neosaxitoxina
OA	Acid Okadaic
OMC	Organització Mundial del Comerç
OMS	Organització Munidal de la Salut

OPB	Oxifenbutazona
ORZ	Ornidazol
PBZ	Fenilbutazona
PbTXs	Brevetoxines
PRM	Product Reaction Monitoring
PSP	Paralytic Shellfish Poisoning
PTX	Pectenotoxines
PTXs	Pectenotoxines
QUECHERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
Q-TOF	Quadrupol-Time of Flight
RA	Rat Bioassay
RASFF	Rapid Alert System for Food and Feed
RIA	Radio Immunoassay
RNZ	Ronidazol
Rs	Resolució
SBSE	Extracció per sorció amb barres
SCX	Bescanvi Catiònic fort
SCZ	Secnidazol
SMMS	Surrogate Matrix Matched Standars
SOP-EURLMB	Métode d'Anàlisi del Laboratori Europeu de Referència per a Toxines Marines
SPE	Extracció en fase sòlida
SPXs	Spirolids
SXs	Saxitoxina
TNZ	Tinidazol

TOF	Analitzadors de temps de vol
UE	Unió Europea
UHPLC	Cromatografia de Líquids d'Ultra-Alta Resolució
UHPLC-HRMS/MS	Cromatografia de líquids d'ultra alta resolució acoblada a espectrometria de masses d'alta resolució en tàndem
UV	Detector Ultra Violeta
WEPAL	Wageningen Evaluating Programmes for Analytical Laboratories
YTX	Yessotoxines
5-OH-FLU	5-Hidroxiflunixin

1. RESUM

El sector de la producció ramadera i de l'aqüicultura són pilars fonamentals de la indústria alimentària, que té plantejats grans reptes, com el de poder posar a l'abast de la població quantitat suficient d'aliments i que aquests siguin saludables als consumidors.

La indústria alimentària ha anat optimitzant els seus mecanismes de producció d'aliments, i a dia d'avui són molt esteses les pràctiques de producció intensiva, que es caracteritzen per una productivitat molt elevada amb un cost econòmic relativament baix. Aquests tipus d'enfocament utilitza medicaments veterinaris per tractar els animals malalts, però també amb finalitats profilàctiques, per minimitzar el risc de contagi. L'ús de medicaments pot comportar la presència de residus dels fàrmacs en els productes alimentaris destinats a consum humà, i el risc associat és un tema que preocupa la societat.

Amb l'objectiu d'oferir a la població l'accés a aliments segurs i saludables, s'han establert límits màxims de residu (LMR) per a medicaments d'ús veterinari o bé prohibició per d'altres, atenent a la seva toxicitat.

No és aquest l'únic àmbit on es regula la presència als aliments de compostos que poden suposar un risc per als consumidors; podem citar els pesticides, els contaminants ambientals, les toxines d'origen natural, etc.

El repte pels laboratoris de control és el de poder disposar de mètodes d'anàlisi prou sensibles i selectius com per poder donar compliment a la legislació. A la vegada aquests mètodes convé que siguin suficientment transversals com per poder ser aplicats a diferents matrius alimentàries, les quals poden ser de naturalesa molt diversa pel que fa a la seva composició.

Els mètodes han de ser d'elevada fiabilitat, però també ràpids i senzills.

En aquesta tesi, s'han posat a punt mètodes per l'anàlisi de residus de 3 famílies de medicaments veterinaris (avermectines, nitroimidazols i antiinflamatoris no esteroideus); moltes de les substàncies considerades tenen establerts LMR, però algunes són prohibides. Per altra banda, s'ha posat a punt un mètode d'anàlisi de toxines marines lipofíliques en mol·luscs bivalves. Les toxines estudiades tenen nivells màxims admissibles legislats.

En tots els casos, i tenint en compte els requeriments d'un laboratori que duu a terme controls oficials, s'ha prioritzat la fiabilitat dels resultats, però al mateix temps s'ha intentat que els mètodes fossin ràpids.

En aquest sentit, en tots els mètodes, per a l'extracció dels anàlits i la neteja dels extractes, s'ha aplicat la metodologia QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), que va ser descrita originàriament per a l'anàlisi de plaguicides en fruita, però que ha demostrat ser una estratègia analítica molt eficaç, donada la seva simplicitat i el seu ampli espectre d'aplicació.

D'altra banda, donada la naturalesa dels compostos estudiats s'ha seleccionat com a tècnica de separació la cromatografia de líquids. Les separacions cromatogràfiques s'han establert en condicions d'ultra-alta resolució (UHPLC), que proporcionen una excel·lent eficàcia i permeten reduir el temps d'anàlisi cromatogràfica.

Pel que fa a la detecció, en aquest àmbit de treball, la detecció mitjançant espectrometria de masses (MS) és indispensable. A part de proporcionar la sensibilitat i selectivitats necessàries, és la pròpia legislació la que fa obligada la seva utilització.

En els mètodes destinats a l'anàlisi de fàrmacs, es proposa l'ús d'espectròmetres de masses de baixa resolució, de tipus triple quadrupol, per a l'anàlisi rutinària. A dia d'avui, aquests equips són eines molt habituals en els laboratoris d'aquest camp. També es proposa l'ús de l'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) per a comprovar resultats dubtosos. En aquest cas la confirmació de la identitat del compost mitjançant mesures d'alta resolució, que permeten diferenciar molt millor les interferències isobàriques, és una eina molt valuosa per evitar resultats erronis de falsos conformes o falsos no conformes. En particular s'ha treballat amb un espectròmetre de tipus híbrid quadrupol-Orbitrap. Tant les prestacions com l'experiència en l'ús d'HRMS per al control de residus han resultat molt satisfactòries, de forma que pel que apunten els estudis fets, l'ús d'aquesta tecnologia té un futur molt prometedori en el camp de la química analítica aplicada al control alimentari.

El mètode establert per a l'anàlisi de toxines lipofíliques en mol·luscs bivalves es basa en una separació mitjançant UHPLC-HRMS, amb un espectròmetre

quadrupol-Orbitrap En aquest cas l'ús de la HRMS és especialment indicat, donada la manca de patrons per a molts dels anàlits. Les mesures de massa exacta són, per tant, especialment útils.

S'ha comprovat l'aplicabilitat dels mètodes desenvolupats a una ampla varietat de matrius. El fet que els mètodes siguin el més transversals possible pel que fa a les matrius d'interès és un punt molt rellevant per un laboratori de control de alimentari. Així per exemple, en el cas de l'anàlisi de nitroimidazols, s'ha investigat l'aplicació del mètode no només a múscul de diferents espècies animals sinó també a altres matrius com ara fetge, ronyó o retina. En el cas del mètode d'anàlisi de toxines marines s'ha aplicat a matrius fresques de diferents espècies i també a bivalves processats.

2. OBJECTIUS

Aquesta tesi es situa en el marc d'una col·laboració entre la Universitat de Barcelona i el Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, que du a terme, entre d'altres, el control oficial de mostres d'aliments .

Amb l'objectiu de garantir la seguretat alimentària, els laboratoris de control han de disposar de mètodes d'anàlisi prou sensibles i selectius com per poder donar compliment a la legislació. Els mètodes han de ser a la vegada, fiables, el més senzills possible i eficaços, en el sentit d'aportar una elevada productivitat. A més, la gran diversitat de tipus de mostres alimentàries en que cal dur a terme els controls fa que també sigui prioritari que els mètodes d'anàlisi siguin transversals, aplicables a una gran varietat de matrius, sense o amb molt poques variacions.

L'objectiu general d'aquesta tesi és el de desenvolupar metodologia analítica robusta, per a ser aplicada en l'àmbit d'un laboratori de control, en la determinació de residus de medicaments veterinaris i de toxines naturals presents en aliments d'origen animal destinats a l'alimentació humana. En particular les famílies de compostos que es consideren són avermectines, nitroimidazols, antiinflamatoris no esteroideus i toxines marines lipofíliques.

Pel que fa al tractament de mostra es planteja desenvolupar procediments basats en estratègies de tipus QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), i dur a terme la determinació mitjançant l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses en tàndem, considerant modalitats de baixa i d'alta resolució.

Aquest objectiu general es pot concretar en objectius més específics, com són els següents:

- Establir per a les diferents famílies mètodes d'extracció molt transversals que permetin la seva aplicació a diferents matrius alimentàries, de forma que puguin ser d'aplicació generalitzada i que ajudin a resoldre necessitats analítiques dels laboratoris de control.
- Establir les condicions per a la separació de les diferents famílies mitjançant cromatografia de líquids. Les separacions han de ser ràpides i compatibles amb la detecció per espectrometria de masses, i utilitzar fases mòbils d'ús comú al laboratori.

Objectius

- Establir les condicions per a la detecció dels anàlits mitjançant espectrometria de masses, que han de permetre assolir nivells de concentració prou baixos per donar compliment a la legislació vigent. S'explorarà l'aplicació de modalitats en baixa i alta resolució.
- Validar els mètodes establerts per a l'anàlisi de residus de medicaments d'ús veterinari i de toxines marines. Finalment implementar en el laboratori els mètodes per la seva acreditació segons la norma ISO/IEC/UNE/17025 per a la seva posterior aplicació a l'anàlisi de mostres d'aliments d'origen animal.

3. INTRODUCCIÓ

En les últimes dècades s'han produït grans escàndols alimentaris, tant a nivell europeu com mundial, que han provocat un fort impacte sobre la percepció que la població té de la seguretat alimentària, en particular sobre la innocuïtat dels aliments.

Les substàncies implicades en aquestes crisis alimentàries i els seus orígens són diversos; així hi ha casos provocats per pràctiques fraudulentess, per administració inadequada de medicaments a espècies animals productores d'aliments, per contaminació accidental dels aliments, etc. Alguns exemples poden ser l'escàndol de l'oli de colza a Espanya el 1981, la intoxicació per consum de fetge amb clembuterol ocorreguda també a Espanya el 1992, la retirada general d'aliments que contenien ou per presència de dioxines a nivells superiors als tolerables a Bèlgica el 1999, la crisi de les vaques boges al Regne Unit també a finals del segle XX, o la propagació de la grip aviar des d'Àsia cap a Europa l'any 2004 i que finalment va acabar afectant els humans. Més recentment s'han viscut episodis mixtos, en què s'ha barrejat el frau econòmic amb l'escàndol alimentari, com és l'ocorregut el 2008 a la Xina amb l'adulteració de llet per nadons amb melamina, o l'ocorregut a la UE (Unió Europea) el 2012 amb la presència de carn de cavall en aliments etiquetats com "100% carn de boví".

Aquests tipus d'episodis han sensibilitzat profundament la població i han anat encaminant les autoritats, d'una banda cap a la promulgació de legislació específica per als diferents camps relacionats amb la indústria alimentària, que s'ha anat adequant al progrés tecnològic experimentat, i d'altra cap a la consolidació d'un sistema de control cada cop més eficaç i rigorós, afavorit pels grans avenços tecnològics que s'han anat implementant en els laboratoris de control alimentari.

La present memòria està fonamentalment centrada en el marc europeu de la seguretat alimentària, però també es fa esment a la seva gestió a nivell mundial.

El concepte de seguretat alimentària a la Unió Europea (UE) s'entén de forma global, incloent totes les baules de la cadena, des de la producció (pinsos, benestar animal a la granja, transport i sacrifici) fins al producte final. Entre

d'altres aspectes, es contempla el control de tot tipus de substàncies usades en la producció, conservació i transport dels aliments: medicaments, plaguicides, conservants, additius, etc.

Aquesta visió de la seguretat alimentària ha anat variant amb el temps; així fins els anys 70 del segle XX es considerava que la seguretat alimentària consistia en tenir accés a aliments i l'Organització de les Nacions Unides per l'Agricultura i l'Alimentació (FAO) recomanava que, per fer front a una emergència, calia tenir un estoc corresponent a 3 mesos de consum dels productes alimentaris bàsics. Aquest concepte ha anat canviant i als anys 80 es considerava que existia seguretat alimentària quan un país podia produir tot el que consumia; posteriorment el concepte va evolucionar i es van introduir altres aspectes com la dificultat d'accés als aliments i la innocuïtat dels mateixos. Actualment la FAO estableix un concepte ampli de seguretat alimentària basat en 4 pilars: a) la disponibilitat, b) l'accés i el consum, c) l'estabilitat i d) l'ús dels aliments.

La definició actual de seguretat alimentària engloba aquests 4 pilars i s'afirma que hi ha seguretat alimentària *“quan totes les persones tenen accés físic, social i econòmic permanent a aliments segurs, nutritius i en quantitat suficient com per satisfer els seus requeriments nutricionals i preferències alimentàries, podent portar així una vida activa i saludable”* [1].

Pel que fa a la terminologia, en anglès els conceptes de disponibilitat i innocuïtat dels aliments es diferencien clarament i es parla de *food security* i de *food safety*, respectivament; en canvi, en català, es fa servir el terme seguretat alimentària per a tots dos conceptes, el que de vegades introdueix alguna ambigüïtat. En el marc d'aquesta tesi la seguretat alimentària serà tractada bàsicament des del vessant de la innocuïtat dels aliments.

En la present introducció ens centrarem en aspectes relacionats amb la innocuïtat dels aliments, que es troba vinculada al pilar “ús dels aliments”. Presentarem primerament la problemàtica associada a l'ús de medicaments veterinaris en la producció d'aliments d'origen animal i el marc legal relacionat, i en segon lloc tractarem la problemàtica relacionada amb la presència de toxines marines en aliments d'origen animal tipus bivalve. En tots dos casos, l'assegurament de la innocuïtat dels aliments que arriben a la cadena

alimentària recau finalment en les anàlisis químiques, i és per això que cal disposar de la metodologia adequada, que ha de ser fiable, però al mateix d'alt rendiment, per tal de permetre el control efectiu. La metodologia emprada ha anat millorant, seguint l'evolució de les tècniques d'anàlisi, i a dia d'avui l'acoblament de la cromatografia de líquids amb l'espectrometria de masses, tant de baixa com d'alta resolució, hi té un rol molt important, i en farem especial esment en aquesta introducció.

3.1 La seguretat alimentària i el marc legal

En les últimes dècades, especialment des de la meitat dels anys 80, s'ha anat perfilant un major control sobre els aliments a disposició de la població per part d'organismes internacionals com el Codex Alimentarius, dependent de la FAO i l'Organització Mundial de la Salut de les Nacions Unides (OMS), a nivell mundial, o la Comissió de la UE, a nivell europeu. La finalitat d'aquest control és evitar la presència de substàncies de provada toxicitat, o si més no de nivells superiors als considerats com a segurs en els aliments.

Les normes establertes tant per la UE com pel Codex tenen plena vigència en l'àmbit actual, en què el comerç mundial d'aliments s'ha incrementat de forma exponencial. A la vegada que la innocuïtat dels aliments, les normes garanteixen l'equitat en els intercanvis comercials, ajudant a resoldre conflictes comercials entre països. Les normes abasten temes tan diversos com són els relacionats amb els residus de medicaments veterinaris i de productes zosanitaris, els residus de plaguicides, la presència de toxines naturals o de contaminants, els additius alimentaris, etc.

A la UE, les normes promulgades per la Comissió (Reglaments, Decisions, Directives) són d'obligat compliment per part dels estats membres [2]; en canvi les normes del Codex són facultatives pels seus estats membres, tot i que molts cops són la base de la legislació nacional en aquest camp. Cal tenir en compte que 166 països són membres del Codex, el què abasta el 99% de la població mundial.

La primera reunió del comitè mixt FAO/OMS d'experts en nutrició va tenir lloc el 1950 amb la finalitat de resoldre conflictes comercials en el comerç mundial

d'aliments, ja que les legislacions relatives a aliments eren en aquells moments molt diverses. El 1958 es va celebrar la primera conferència mixta FAO/OMS sobre additius alimentaris i va començar a funcionar el comitè d'experts sobre additius alimentaris, (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food, JECFA). També l'any 1958, la Comissió Econòmica per Europa (CEPE) de l'ONU (Organització de les Nacions Unides) va establir la primera estructura harmonitzada de normes sobre productes alimentaris i seguidament va establir normes de qualitat per a la fruita i les hortalisses fresques.

Mentre tant, entre 1954 i 1958, l'austríac Hans Frenzel va treballar en la idea de crear un Codex Alimentarius a nivell europeu; les seves idees van culminar en la creació del Consell de Codex Alimentarius Europaeus el 1958, i el 1960 se li va proposar a l'OMS la seva incorporació. Finalment, el 1962, es va acordar que la Comissió del Codex Alimentarius seria l'únic òrgan responsable de l'execució del programa conjunt FAO/OMS i d'altres organismes internacionals en matèria alimentària.

El treball de la Comissió del Codex ha estat continu des de la seva fundació i coopera amb la Comissió de la UE en l'establiment de normes sanitàries i d'higiene dels aliments. A més, des de l'any 1995 les normes del Codex han passat a ser de referència, pel que fa a la innocuïtat dels aliments, per a l'organització mundial del comerç (OMC).

Retornant al marc europeu, es pot considerar que la UE és capdavantera pel que fa a les polítiques orientades a aconseguir que els aliments siguin cada vegada més segurs. La forma de controlar la seguretat dels aliments ha estat plantejada des d'un punt de vista global pel que fa a la cadena alimentària, en el sentit que el control s'aplica des de la producció fins al punt final d'abastiment del consumidor. Així, el control de la producció inclou l'alimentació animal, l'ús de plaguicides en els conreus, etc. fins arribar al producte final que arriba al consumidor.

Algunes de les fites importants a nivell europeu han estat la creació l'any 2002 de l'Agència Europea de Seguretat Alimentària, o European Food Safety Agency (EFSA) [3], que és una entitat de referència científica, independent, que assessora i emet opinions sobre temes d'aquest camp, i també informa sobre

riscs. A més a més, es va crear el sistema d'alerta ràpida per aliments i pinsos, Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), que és el mecanisme que s'utilitza a la UE per comunicar quan es detecta algun risc per a la salut pública relacionat amb l'alimentació. El RASFF és un sistema transparent i altament eficient de compartir aquest tipus d'informació [4].

Pel que fa als perills inherents als aliments es poden esmentar, a tall d'exemple, la contaminació microbiològica, les toxines naturals, els residus de plaguicides i els de medicaments d'ús veterinari, els contaminants ambientals, i els contaminants que es generen durant el processat dels aliments per obtenir-los en la seva forma final per al consum, els d'envasat, etc.

Alguns dels perills esmentats són efectes secundaris, no desitjats, de l'ús d'algunes substàncies, com ara plaguicides o fàrmacs; tot i així, es considera que l'ús adequat d'aquests presenta més avantatges que inconvenients, entre d'altres que permeten millorar el rendiment en la producció d'aliments, o el benestar animal.

En aquest context, i per tal garantir la seguretat alimentària i protegir el consumidor, s'ha promulgat un gran volum de legislació. En aquesta introducció farem esment especialment al que fa referència als residus de medicaments d'ús veterinari i a les toxines marines, que són els grups de compostos que han estat estudiats en aquesta tesi.

3.2 Medicaments d'ús veterinari

L'ús i l'abús dels medicaments veterinaris ha estat abastament tractat els últims anys a la literatura científica. Cal remarcar que l'ús d'aquestes substàncies en la cria ramadera per tractar malalties dels animals té un benefici clar en la producció d'aliments d'origen animal, ja que millora les condicions de creixement i de vida dels animals; tot i així, cal controlar que se'n faci un ús racional per evitar perjudicar els consumidors, com seria per exemple la ingesta involuntària de medicaments mitjançant els aliments consumits.

En aquest sentit, el National Research Council dels EEUU, va crear un Comitè sobre l'ús de Medicaments Veterinaris en Animals Productors d'Aliments, l'informe del qual [5] ja alertava dels problemes associats a la generalització de l'ús de medicaments veterinaris (antisèptics, antiinflamatoris, hormones, antiparasitaris, antibiòtics, etc).

Sens dubte, el grup de fàrmacs que més preocupa és el dels antibiòtics, per la possible creació de resistències en humans. Les conclusions de l'informe, pel que fa als antibiòtics, poden resumir-se en els punts següents:

- a) L'ús d'antibiòtics en la cria d'animals augmenta el risc d'emergència de microorganismes resistents.
- b) L'aparició de resistències bacterianes està directament relacionada amb la concentració dels compostos usats i amb la duració del tractament.
- c) Hi ha relació directa entre l'ús d'antibiòtics en la cria d'animals i la disseminació o difusió de patògens en humans, tot i que la incidència és encara molt limitada.

Altres estudis, com els de Beyene et al [6, 7], remarquen que la indústria ramadera és la segona en consum d'antibiòtics, després de les pràctiques mèdiques en humans. De fet, és l'ús dels antibiòtics el que ha permès la pràctica de la ramaderia intensiva, i poder obtenir aliments d'origen animal amb un cost econòmic relativament baix.

Els antibiòtics poden ser usats de forma legal a ramaderia amb finalitats terapèutiques, o profilàctiques quan hi ha risc d'infecció dels animals, i sempre amb prescripció del veterinar.

Els antibiòtics també han estat usats com a promotors de creixement. Aquest tipus d'aplicació consisteix en l'administració d'aquests fàrmacs a dosis sub-terapèutiques durant períodes llargs de temps per evitar que els agents infecciosos redueixin el rendiment de la producció d'animals amb fins alimentaris, i millorar els factors de conversió dels pinsos. Aquesta és una pràctica definitivament prohibida a la UE des de l'any 2006 [8]

El mecanisme pel qual els antibiòtics administrats en dosis baixes serveixen com a promotors del creixement no està clar, però per exemple en el cas del porc, se suposa que a l'entorn del 6% de l'energia de la dieta es perd per fermentació microbiana a l'intestí de l'animal [6], de forma que una reducció en patògens gastro-intestinals resulta en un augment de pes.

Altres males praxis en l'ús de medicaments veterinaris consisteixen en la prescripció innecessària de medicaments, l'ús de substàncies inapropiades per la malaltia, l'ús de dosis inapropiades o bé l'extensió temporal incorrecta del tractament. Aquestes pràctiques errònies tenen diferents causes, entre les quals algunes són involuntàries (desconeixement, falta de comunicació amb el professional sanitari) però d'altres són intencionades, a demanda del ramader. Existeixen alternatives a l'ús dels antibiòtics en l'engreix intencionat dels animals productors d'aliments [6]:

- a) Ús de probiòtics, és a dir, productes que contenen microorganismes beneficiosos, (majoritàriament *Lactobacillus acidophilus* o *Streptococcus faecium*), vitamines i traces de minerals. El seu mecanisme d'acció consisteix en la colonització de l'intestí, desplaçant els patògens i estimulant el sistema immunitari.
- b) Ús de prebiòtics, o ingredients no digeribles que serveixen de substrat pels microorganismes beneficiosos del tracte gastro-intestinal.
- c) Ús d'enzims, que serveixen per metabolitzar components dels pinsos que els animals tenen problemes per digerir. Són produïts per processos de fermentació a partir de fongs i de bacteris.

En general, existeixen diferents factors que influeixen l'efecte del medicament sobre l'animal; entre ells podem esmentar l'edat de l'animal, l'alimentació (l'ús de farratge fresc disminueix la biodisponibilitat del medicament) i l'estat de la malaltia (si aquesta afecta el sistema metabòlic). Això permet explicar perquè dosis idèntiques de medicaments poden resultar en quantitats diferents de residus de la substància administrada en els diferents animals de la partida.

Pel que fa a la legislació que regula la utilització de medicaments veterinaris en l'àmbit de la UE, cal esmentar que s'ha anat adaptant progressivament als

avenços tecnològics de tot tipus: de la producció ramadera, de la indústria farmacèutica, de la instrumentació analítica, etc. Així des de les primeres normatives que en els anys 80 feien referència a la necessitat del control de les substàncies d'efecte hormonal i tireostàtic [9] fins a l'actualitat, hi ha hagut una sèrie de canvis que exposarem de forma resumida, sense pretendre fer un compendi detallat.

Cal esmentar el Reglament 2377/90/CE [10], on es defineix què és un residu de medicament veterinari i quins són els tipus de substàncies que cal controlar. Els residus de medicaments d'ús veterinari es defineixen com totes les substàncies farmacològicament actives, tant els principis actius com els seus productes de degradació, que resten als aliments d'origen animal. Actualment aquest Reglament es troba derogat pel Reglament 470/2009/CE [11], que estableix que els límits màxims tolerables dels medicaments presents en aliments d'origen animal es defineixen en base a dictàmens de l'Agència Europea del medicament (EMA). El Límit Màxim de Residu (LMR) es defineix com la concentració màxima permesa d'un medicament en un tipus concret d'aliment d'origen animal. En funció dels LMR la classificació de les possibles substàncies presents en els aliments és la següent:

- **Substàncies amb LMR**
Són les substàncies autoritzades per l'ús en medicina veterinària, de les quals es controla el residu que resta en els òrgans i teixits dels animals destinats al consum humà, ja que a certs nivells són innòcues, però per sobre de certs límits poden tenir un efecte no desitjat.
- **Substàncies permeses**
Són aquelles substàncies que no presenten cap tipus de toxicitat per als humans i per tant poden usar-se sense restriccions.
- **Substàncies amb LMR provisional**
Són aquelles substàncies de les quals no es disposa de suficient informació per establir un LMR definitiu. Les substàncies d'aquesta llista, en finalitzar els estudis corresponents, han d'anar migrant cap al grup de substàncies amb LMR o cap al grup de substàncies prohibides.
- **Substàncies prohibides**

Les substàncies prohibides són aquelles per a les quals s'han demostrat efectes tòxics, cancerígens o teratogènics sobre la salut humana a qualsevol nivell de concentració.

A la vegada, el Reglament 470/2009/CE estableix la prohibició d'administrar qualsevol substància que no estigui en els grups de productes amb LMR, amb LMR provisional o permesos, la qual cosa de vegades ha creat paradoxes, com el cas d'algunes substàncies d'efecte coccidiostàtic que no van tenir un LMR en aus de corral fins el 2010, tot i que el seu ús era habitual i la seva toxicitat força baixa, vistos el LMRs finalment establerts [12].

El Reglament 37/2010/CE [13] és el resultat de la recopilació de la dispersa legislació en matèria de LMRs de medicaments d'ús veterinari a nivell europeu. Aquest reglament és vigent a dia d'avui i en contínua actualització, ja que sovint es produeixen actualitzacions o incorporacions de valors de LMR en les matrius d'interès.

Els valors de LMR en principi s'estableixen a partir dels estudis presentats per les indústries farmacèutiques productores de medicaments d'ús veterinari i són avaluats per l'EMA, prèvia sol·licitud dels productors del medicament.

En aquests estudis, un cop establertes les dosis terapèutiques del medicament, es fan, entre altres, assaigs de biodisponibilitat a partir dels quals, per exemple, s'estableixen:

- Període de retirada, temps que cal que transcorri entre l'última dispensació i el sacrifici de l'animal, o el consum de l'aliment.
- NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), dosi del principi farmacèutic que no produeix efectes adversos en animals de laboratori.
- Dosi a escala humana, basant-se en el NOAEL, en el pes corporal i aplicant un factor de seguretat, que pot ser 10, 100, etc.
- Establiment d'un LMR, a partir d'aquesta dosi i de la ingesta estimada.

Els esmentats estudis són extensos i molt costosos. Per aquest motiu de vegades s'aplica el principi de cascada, la qual cosa significa que un LMR establert per un medicament en una determinada matriu, pot ser aplicat en una altra matriu de la mateixa espècie animal o bé en la mateixa matriu d'altres

espècies animals. Aquesta possibilitat es troba descrita en el Reglament 470/2009.

A nivell de l'estat Espanyol, l'ús de medicaments sense prescripció veterinària en la cria d'animals destinats al consum humà es troba explícitament prohibit en el Reial Decret 109/1995 [14]. Aquest decret deixa el control de l'ús de medicaments veterinaris en mans dels cossos d'inspecció veterinària.

Les substàncies que cal controlar en els aliments es troben descrites en la Directiva 96/23/CE [15]. Aquesta normativa és el compendi de la dispersa legislació europea dels anys 80 i principis dels 90 ([16, 17, 18], per exemple) que va quedar derogada amb la seva promulgació. En aquesta Directiva es descriuen les substàncies per famílies (Taula 3.1). Defineix 2 grans grups: A i B. El grup A correspon a les substàncies prohibides, per les quals no es pot establir cap límit permès, donada la seva perillositat per la salut humana; el grup B correspon a les substàncies que tenen LMR establert.

Taula 3.1: Classificació dels residus de medicaments veterinaris segons la Directiva 96/23/CE

Grup A: Substàncies amb efecte anabolitzant i no autoritzades:	
A1	Estilbens i derivats
A2	Antitiroïdeals
A3	Esteroids
A4	Lactones de l'àcid resorcílic
A5	β-agonistes
A6	Altres: cloramfenicol, nitrofurans, ronidazol, metronidazol, dimetridazol, dapsona, etc.
Grup B, B1: Antibiòtics	
	Penicil·lines i cefal·losporines
	Sulfamides
	Quinolones
	Tetraciclines
	Macròlids
	Aminoglucòsids
Grup B, B2	
B2a	Antihelmíntics
B2b	Anticoccidians incloent nitroimidazols
B2c	Carbamats i piretroïds

B2d	Tranquil·litzants
B2e	Antiinflamatoris no esteroideus
B2f	Altres substàncies amb activitat farmacològica (corticosteroids)
Grup B, B3	
B3a	Compostos organoclorats, incloent PCBs
B3b	Compostos organofosforats
B3c	Metalls pesants (elements químics): Hg, Pb, Cd, As
B3d	Micotoxines (M1)
B3e	Colorants d'ús zoosanitari

Aquesta directiva indica també quines són les espècies i productes animals que cal controlar:

- Espècies bovina, equina, porcina i ovina
- Espècies de corral: aviram i conill
- Llet i ous
- Carn de caça (criada i silvestre)
- Cargols
- Mel
- Productes de la pesca i de l'aqüicultura

La directiva 96/23/CE estableix també la freqüència del mostreig, basada en el nombre d'animals sacrificats. Aquesta forma d'actuació, que en un principi va resultar eficaç, està en l'actualitat desfasada per diferents motius, essencialment:

- Alguns dels compostos inclosos a les taules anteriors són molt poc usats en l'actualitat.
- No es preveu l'avaluació del risc; és a dir, l'actualització dels plans de control no té en compte els resultats d'anys anteriors.

Cal tenir present que el nombre de mostres que s'analitzen anualment, en base als animals sacrificats, representa un esforç enorme pels laboratoris de control, ja que cal dur a terme un elevat nombre d'anàlisis, la gran majoria dels quals proporcionen resultats conformes. D'una banda, això posa de manifest un fet molt positiu, com és un elevat nivell de seguretat alimentària. Però d'altra

banda la planificació del nou programa de control no considera en absolut quines són les matrius i substàncies més freqüentment relacionades amb resultats no conformes, en les què convindria concentrar més esforços . És a dir, el mantenir la mateixa estratègia per al disseny dels plans de control sembla un gran malbaratament de recursos.

A la Directiva 96/23/CE s'estableix la xarxa d'estructura piramidal de laboratoris europeus de control, començant pels laboratoris europeus de referència (EURL), cadascun dels quals té assignada una sèrie de famílies de compostos pels quals són referència. Posteriorment en altres documents normatius s'han anat designant nous EURL per altres grups de compostos, com per exemple, plaguicides, contaminants, toxines [19], etc. L'estructura piramidal es completa amb els laboratoris nacionals de referència (LNR) nomenats per a cada país (poden ser 1 o més) i els laboratoris de control oficial, que són els que realitzen les anàlisis de control rutinàries.

A nivell espanyol, els laboratoris de referència per a les substàncies de la Directiva 96/23/CEE són el Centro Nacional de Alimentación (CNA), de l'Agencia Española de Consumo, Seguridad alimentaria y Nutrición (AECOSAN) a Majadahonda (Madrid) i el Laboratorio Central de Sanidad Animal del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente a Santa Fe (Granada).

En els 20 anys transcorreguts des de la creació dels EURL, s'ha demostrat que l'existència d'aquests laboratoris no té una aplicació pràctica gaire efectiva, donat que:

- Els EURL no duen a terme anàlisi de mostres de control i per tant, estan molt allunyats de la realitat de les tasques de control diari.
- Els EURL apliquen criteris diferents a l'hora d'interpretar algunes normes europees referents a validació, sense assolir solucions de consens. En conseqüència, els laboratoris de control, que han de seguir els criteris dels EURL, es troben amb la paradoxa de l'existència de criteris diferents segons el grup de compostos a analitzar.

La Decisió 657/2002/CE [20], dedicada al funcionament dels mètodes analítics i la interpretació dels resultats, ha estat un gran revulsiu en el camp de l'anàlisi de residus de fàrmacs d'us veterinari. En el moment de la seva promulgació, l'any 2002, aquesta Decisió va incloure força novetats, algunes relacionades amb els avenços instrumentals de l'època. Entre les novetats podem esmentar:

- No inclou, ni fa referència a mètodes oficials d'anàlisi.
- Incorpora els conceptes de límit de decisió ($CC\alpha$) i de capacitat de detecció ($CC\beta$).
- Incorpora el concepte de límit de funcionament mínim requerit (MRPL).
- Substitueix els conceptes Positiu/ Negatiu pels corresponents de No conforme/ Conforme.
- Estableix un sistema de punts que valora el potencial de la instrumentació del laboratori per a la confirmació de les substàncies.
- Estableix el mínim nombre de punts necessaris per poder confirmar substàncies prohibides (Grup A) o permeses (Grup B)
- Estableix uns requisits mínims que cal assolir en la validació dels mètodes d'anàlisi.

A la Decisió s'estableix que cal obtenir 4 punts per a l'anàlisi confirmatòria de substàncies prohibides (Grup A) i 3 per les del Grup B.

A la pràctica, en el cas de les substàncies del grup A, per obtenir els 4 punts cal usar l'espectrometria de masses acoblada a algun sistema de separació. Per analitzar substàncies del Grup B cal obtenir com a mínim 3 punts, i això permet usar, a més de l'espectrometria de masses, diferents sistemes de detecció, com per exemple els detectors d'absorció de llum ultraviolada o de fluorescència, acoblats a un cromatògraf de líquids, sempre que permetin l'adquisició de l'espectre.

Aquest sistema de punts no es basa en dades científiques [21], sinó en l'opinió d'un grup d'experts que van prendre com a punt de partida el nombre d'ions que usualment es monitoritzaven en els equips de cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS) treballant en mode *Selected Ion Monitoring*, i a dia d'avui està força qüestionat per diversos autors [21, 22]

Els paràmetres que es consideren per a distingir entre mostres conformes i no conformes són el límit de decisió ($CC\alpha$) i la capacitat de detecció ($CC\beta$). El límit de decisió haurà d'usar-se en mètodes d'anàlisi confirmatoris, mentre que la capacitat de detecció serà el punt de tall en el cas dels mètodes de cribratge. La normativa dóna algunes pautes per a la determinació dels esmentats límits, tot i que alguns EURL utilitzen procediments diferents [23], que poden donar lloc a límits força diferents.

Per substàncies amb LMR, es defineix la mostra "conforme" com aquella que conté l'anàlit en concentracions inferiors al límit de decisió ($CC\alpha$) i a la inversa en el cas de mostres "no conformes". En el cas de substàncies prohibides, la mostra "conforme" és aquella que no conté l'anàlit o bé no es confirma la presència del mateix i a la inversa en el cas de la mostra "no conforme".

El MRPL és un concepte que s'aplica a substàncies prohibides i es defineix com la mínima concentració de compost que el laboratori ha de poder detectar i confirmar. El concepte MRPL pretenia, en el seu origen, una harmonització dels resultats provinents dels diferents laboratoris europeus de control. Els MRPL, a part de ser un requisit per als laboratoris, són una guia per a dissenyar la validació dels mètodes d'anàlisi de compostos prohibits. Hi ha pocs MRPLs publicats, de fet només per cloramfenicol, metabòlits de nitrofurans, verd de malaquita i acetat de medroxiprogesterona [24, 25]. Aquests límits es van publicar només els anys 2003 i 2004 i ja no hi ha hagut més actuacions en aquest camp, ja que es tracta d'un paràmetre força qüestionat. La falta de límits orientatius per validar substàncies prohibides, es va paliar amb la publicació de límits recomanats pels laboratoris europeus de referència en la seva guia publicada el 2007 [26]. En l'actualitat aquests MRPL són considerats equivalents als LMR.

Cal indicar que per alguns dels compostos inclosos al grup B3, en particular els metalls pesants i les micotoxines, donat que tenen la seva pròpia legislació, no els són aplicables els nous conceptes definits a la Decisió 657/2002/CE.

Ja hem comentat que la Decisió 657/2002/CE no parla de mètodes oficials d'anàlisi. En aquest sentit és molt flexible i permet l'ús de qualsevol mètode d'anàlisi que permeti assolir els límits de funcionament requerits i que sigui

validat adequadament i compleixi els criteris de validació establerts a la pròpia Decisió.

Així, per exemple, estableix criteris per a la precisió i per a la recuperació que depenen del nivell de concentració. En particular, en el cas de la precisió, expressada com a desviació estàndard relativa, el valor màxim permès s'obté de l'equació de Horwitz, que a la pràctica és un criteri força permissiu.

Finalment esmentarem el Reglament 882/2004/CE [27], que fa referència al control oficial dels aliments a realitzar pels estats membres. Aquest reglament estableix quines són les autoritats competents en la matèria, indica que els laboratoris de control cal que estiguin acreditats segons la norma ISO/IEC/17025, i també estableix els controls a què cal sotmetre els pinsos i aliments provinents de països de fora de la UE, el que obliga els països que vulguin exportar a la UE a establir un pla nacional de control de residus en aliments i pinsos.

3.3 Toxines marines

La presència de toxines marines d'origen natural en productes de la pesca és un problema important de salut pública per la seva perillositat, ja que les persones afectades poden presentar símptomes força greus, com ara amnèsia, paràlisi, diarrea i altres trastorns gastrointestinals, etc. Les toxines poden ser perjudicials tant pels humans com per altres espècies de peixos que consumeixen bivalves. Les toxines marines són contaminants naturals produïts per microalgues en determinades condicions climàtiques. Aquestes microalgues formen part de la dieta dels mol·luscs bivalves i les biotoxines que produeixen són acumulades per la majoria d'ells, ja que la seva forma d'alimentació és a través del filtrat de grans quantitats d'aigua; tot i que no són compostos tòxics per als mol·luscs, sí ho són quan aquests entren a la cadena alimentària, en ser consumits per humans.

Inicialment, les toxines marines van ser classificades pel tipus d'efecte tòxic que tenien en els humans. Així podem citar, entre d'altres, els grups de PSP (paralytic shellfish poisoning), ASP (amnesic shellfish poisoning), DSP

(diarrhetic shellfish poisoning), NSP (neurotoxic shellfish poisoning), AZP (azaspiracid poisoning), CFP (Ciguatera poisoning), etc [28].

Les toxines marines també es poden classificar segons la seva polaritat, en compostos lipòfils o hidrofílics. El grup de les toxines hidrofíliques, amb masses moleculars inferiors a 500 Da, ve normalment representat per l'àcid domoic (DA), la saxitoxina (SXs) i la neosaxitoxina (NSXs);

Les toxines marines lipofíliques, amb masses moleculars superiors a 500 Da, es poden classificar en diferents grups: grup de l'àcid okadaic (OA) i les dinofisistoxines (DTXs), azaspiracids (AZAs), pectenotoxines (PTXs), imines cícliques (CIs), brevetoxines (PbTXs), espirolids (SPXs), ciguatoxines (CTXs), entre altres [29, 30, 31, 32].

Les yessotoxines (YTX i homo-YTX), palitoxines i pinnatoxines, presenten una lipoficitat intermitja, tot i que s'inclouen normalment al grup de les lipofíliques.

Cal fer esment en aquest punt que existeix un elevat nombre de toxines marines encara no caracteritzades ni regulades per la normativa. És el cas de les toxines de la família de la palitoxina, que inclou les ovatoxines a, b, c, d, e, f, per les quals solament s'ha elucidat l'estructura d'una d'elles (ovatoxina a) [31], o bé les tetrodoxines, maitotoxines, etc [33].

D'entre els bivalves, els musclos poden ser considerats una espècie sentinella, en el sentit que alerten de la contaminació per toxines, donada la seva alimentació poc selectiva en comparació amb altres bivalves, com ara les ostres [29].

El control de la presència de toxines marines en aliments es duia tradicionalment a terme amb el bioassaig del ratolí, injectant extractes de bivalves en ratolins de laboratori seguint el Reglament 2074/2005/CE [34]. L'esmentat mètode biològic és diferent segons es determinin les toxines hidrofíliques o les lipofíliques, essent la diferència essencial el tipus de dissolvent (orgànic o aquós) en què s'extreu la mostra. Aquest mètode va ser posat a punt al Japó i ha estat usat durant els últims 70 anys pel control de les toxines PSP i en els últims 30 anys pel control de les toxines DSP [33].

A part d'altres punts discutibles, el bioassaig amb ratolins té l'inconvenient que registra els efectes per injecció d'un extracte en l'animal i no per ingestió de

l'aliment. Per aquest motiu es va desenvolupar també el bioassaig en rates, consistent en experimentar amb rates que han estat sotmeses a dejuni i que són alimentades després amb els bivalves a testar, registrant l'efecte sobre l'animal. Aquest mètode és encara permès en el Reglament 15/2011 per la detecció de l'OA, les DTX i les AZAs i va ser usat fins el 2015 a Holanda [35].

El bioassaig amb ratolins, tot i ser prou sensible per la majoria de toxines, no és gens específic i no permet arribar a conclusions sobre el tipus de toxina present en els bivalves. A banda, té altres limitacions, com ara la limitada sensibilitat per les toxines del grup de l'àcid okadaic (OA), la limitada reproduïbilitat, i tota la problemàtica relacionada amb l'experimentació amb animals vius, per motius ètics.

Per aquestes raons, a partir de 2011 la Unió Europea va recomanar l'ús dels mètodes analítics basats en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses (Reglament 15/2011/CE, [36]) la qual finalment s'ha convertit en la tècnica obligatòria a partir de 2015 per a l'anàlisi de toxines marines lipofíliques. A partir de 2015, el bioassaig amb ratolins només es permet pel control de la presència de toxines desconegudes en zones de producció de bivalves [36].

Un dels grans problemes associats a la determinació de toxines marines per tècniques cromatogràfiques és la manca d'estàndards comercials per a moltes d'elles, i quan existeixen, els seus elevats preus [37, 38, 39].

Els límits màxims permesos per les toxines marines es troben recollits de forma específica en els Reglaments 853/2004/CE [40] i 786/2013/CE [41]. En aquest cas els LMR s'expressen en funció del compost base de cada família de toxines, i la resta de toxines del grup s'expressen en termes del compost base utilitzant els anomenats factors d'equivalència tòxica (FET), tal com la indica l'EFSA [42]. És una forma de fer l'avaluació del risc del consum de bivalves, però en l'opinió publicada per l'EFSA es reconeix que no es tracta de FETs robustos, avaluats per ingesta sinó de valors trobats per injecció intraperitoneal en ratolins. En l'opinió de l'EFSA es reconeix que els valors FETs hauran de ser revisats quan es disposi de prou dades trobades a partir de estudis de toxicitat oral aguda [42]. Les concentracions màximes permeses varien força

depenent del tipus de toxina; així, per exemple, per a les YTXs, es situa en 3,75 mg/kg^{bivalve} equivalents de YTX-1, o bé pels azaspiràcids, en 160 µg/kg^{bivalve} equivalent de AZA-1.

3.4 La cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses d'alta i de baixa resolució.

L'anàlisi de residus de medicaments veterinaris, de toxines naturals i de tot tipus de contaminants o additius en aliments ha anat lligada a la ràpida evolució de les tècniques instrumentals que ha tingut lloc en les últimes dècades.

En els anys 80 del segle passat, quan es van publicar les primeres normes relatives al control dels aliments d'origen animal, la instrumentació i els mitjans disponibles als laboratoris de control eren limitats. Els mètodes d'anàlisi pràcticament es restringien a l'ús de la cromatografia en capa fina, amb lectura i interpretació visual o bé amb densitòmetres, i a l'ús de la cromatografia de gasos amb detectors de flama (FID), o de captura d'electrons (ECD). Per a la confirmació de la presència d'algun compost, calia usar més d'una tècnica analítica o bé estratègies com la co-cromatografia (addició d'una certa quantitat de l'anàlit sospitós de ser present sobre l'extracte de la mostra i observar el creixement del pic, donada la limitació dels detectors disponibles)

A final de la dècada dels 80 i principi de la dels 90 es deixa de banda la cromatografia en capa fina, mentre que la cromatografia de líquids (LC) amb detectors com els ultraviolat (UV), de sèries de díodes o de fluorescència es troba plenament implantada als laboratoris. A més, també s'introdueix amb força l'acoblament GC-MS, amb espectròmetres de quadrupol simple.

Aquests detectors ja permetien diferents formes de confirmació, com per exemple la comparació d'espectres d'absorció UV amb llibreries d'espectres prèviament enregistrades (cas dels detectors de sèries de díodes) o amb les relacions d'abundància dels fragments dels ions monitoritzats (cas dels quadrupols simples).

En aquest camp, l'acoblament de la cromatografia de líquids amb espectròmetres de masses de quadrupol simple (LC-MS) no va tenir tant d'èxit com el de GC, ja que els equips LC-MS no permetien en si mateixos la

confirmació de la presència de substàncies, en produir ionitzacions suaus, amb molt poca fragmentació.

A finals del segle XX, es van popularitzar els acoblaments de sistemes cromatogràfics a espectròmetres de masses de baixa resolució en tàndem, tipus triple quadrupol o quadrupol-trampa d'ions, ja que es van comercialitzar equips de sobretaula, que eren d'instal·lació, ús i manteniment relativament senzill. Això, unit a la publicació de la Decisió 657/2002/CE, que obliga a la confirmació inequívoca de la presència de compostos prohibits via espectrometria de masses, va marcar un punt d'inflexió als laboratoris de control. La nova instrumentació, a més del seu ús com a eina de confirmació, va permetre assolir límits de confirmació i de quantificació cada cop més baixos, en la zona de nivells baixos de $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En el camp de la cromatografia de líquids es van produir també nous desenvolupaments, amb innovacions com la cromatografia de líquids d'ultra-alta pressió (UHPLC), on es treballa amb columnes que contenen rebliments amb diàmetre de partícula inferior a $2\ \mu\text{m}$, o les columnes de cromatografia de líquids de base sílice amb nucli sòlid. Aquestes innovacions permeten una millora molt significativa de l'eficàcia i per tant una millor resolució. Aquesta millora permet fer separacions més ràpides, i per tant una major productivitat de la línia d'anàlisi per LC. A més, suposa una millora en la confirmació dels compostos, ja que les interferències que dificulten la confirmació espectral o mitjançant ion ratio, se separen millor.

Centrant-nos en l'acoblament LC-MS, comentarem aspectes relacionats amb dues parts essencials, com són la font d'ionització i el tipus d'analitzador de l'espectròmetre.

La font d'ionització permet l'acoblament del cromatògraf amb l'espectròmetre de masses. La funció de la font és, a més d'evaporar el dissolvent que prové del sistema cromatogràfic, ionitzar els anàlits, per a que puguin ser analitzats a l'espectròmetre de masses. La font d'ionització més emprada a l'acoblament LC-MS és sens dubte l'electrosprai (ESI). És fàcil d'utilitzar i robusta. És una font considerada suau, ja que generalment es produeix poca fragmentació a la font, i per a la molècula d'anàlit s'obté normalment un senyal (o grup de

senyals) per a la seva forma protonada o desprotonada, segons la polaritat amb la que es treballi. L'ESI és adequada per compostos de polaritat entre moderada i alta, i és la font que s'ha utilitzat en els estudis fets en el marc d'aquesta tesi. De fet, en el camp d'aplicació que ens ocupa, l'ESI és la font més emprada, tot i que han estat descrites algunes aplicacions fent servir ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) o fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI) [43, 44].

El funcionament de l'ESI, que s'esquematitza a la figura 3.1, es basa en la ionització de la fase mòbil que prové del sistema LC mitjançant l'aplicació d'un voltatge elevat, la consegüent formació de gotes múltiples carregades, l'evaporació del dissolvent i la posterior explosió de les gotes quan les forces de repulsió superen la tensió superficial de la gota. Aquests processos de repulsió-explosió es repeteix uns quants cops fins a provocar la dessolvatació i evaporació dels ions.

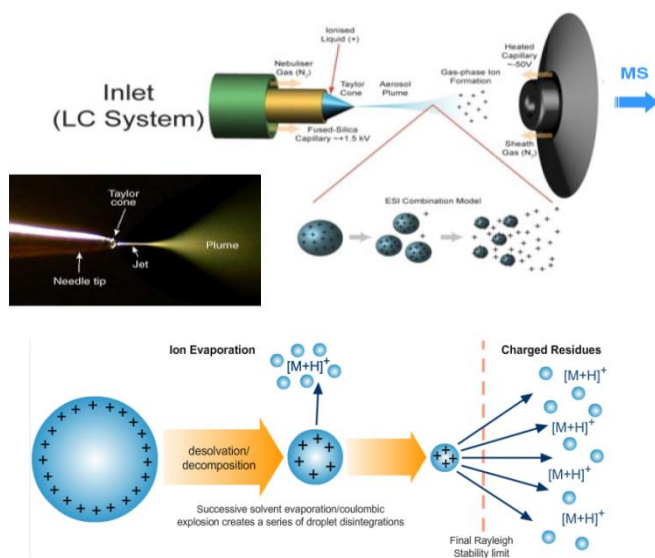


Figura 3.1. Esquema de funcionament de la sonda electrospray i formació de l'spray (font: "The Mass Spectrometry Primer". Waters Corporation, 2009).

Entre els inconvenients més importants de l'ESI cal esmentar els efectes de supressió, i molt menys sovint d'intensificació, de la ionització que poden experimentar els anàlits. Aquests fenòmens es produeixen per la competència entre els anàlits i altres compostos presents a la mostra per passar a la fase gas. L'ESI és més sensible a aquests efectes que altres tipus de fonts.

El fet que es produeixi supressió o intensificació del senyal pot portar a errors molt importants en la quantificació, si no s'actua adequadament. Bàsicament hi ha tres possibles estratègies generals:

- Minimitzar al màxim la presència d'altres compostos que coelueixin amb els anàlits, mitjançant l'aplicació de processos intensius de clean-up a les mostres abans de la seva injecció al sistema cromatogràfic.
- Ús de patrons de calibratge que incloguin l'efecte de la matriu de les mostres, de forma que els anàlits es comportin de la mateixa manera en els patrons i en les mostres.
- Dilució dels extractes de les mostres, ja que habitualment les interferències de la matriu que provoquen la supressió iònica estan en una concentració molt superior als anàlits d'interès. Normalment la dilució minimitza la supressió de forma molt important.

Actualment en els laboratoris de control el tipus d'espectròmetre més comunament acoblat a cromatògrafs, tant de LC com de GC, és el triple quadrupol (QqQ), usat en el mode MRM (multiple reaction monitoring). Existeixen altres modes de treball (product ion scan, neutral loss, etc.) però no arriben a la sensibilitat o no donen la informació que aporta el mode MRM. El mode MRM permet treballar en condicions d'elevada sensibilitat donat que se selecciona solament els ions d'interès, descartant tota la resta de components de l'extracte de la mostra. La seqüència de treball es pot esquematitzar de la següent forma: el primer quadrupol selecciona l'ió precursor, el segon quadrupol, que actua com a cel·la de col·lisió, el fragmenta i el tercer quadrupol selecciona solament l'ió o ions producte d'interès. Finalment els ions seleccionats arriben al detector, que pot ser un fotomultiplicador. D'aquesta manera, el que s'observa finalment són transicions de massa de l'ió precursor a l'ió producte.

La figura 3.2 mostra l'esquema d'un espectròmetre de masses de triple quadrupol.

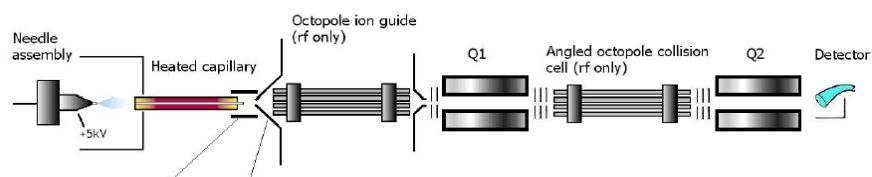


Figura 3.2: Esquema d'un triple quadrupol. (font: "The Mass Spectrometry Primer". Waters Corporation, 2009)

L'èxit dels espectròmetres de triple quadrupol radica fonamentalment en els següents punts:

- Elevada selectivitat i sensibilitat, que permet arribar a detectar compostos a nivells de concentració inferiors als $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.
- Facilitat d'ús, amb paràmetres d'ús intuïtius.
- Gran robustesa, ja que funciona de forma estable al llarg del temps i no necessita calibratge de m/z en continu.
- Permet la confirmació de resultats via "ion ratio", és a dir monitoritzant la relació entre transicions de massa de les mostres de referència i les mostres a analitzar, tal com proposa la Decisió 657/2002/EC.

La informació MS/MS (d'espectrometria de masses en tàndem) que proporciona un equip de triple quadrupol es pot obtenir també amb un espectròmetre de trampa d'ions (IT), quan treballa en mode MS/MS. El fonament de funcionament de l'equip IT és diferent al d'un triple quadrupol, i es basa en l'emmagatzematge de paquets d'ions en trajectòries d'oscil·lació, estabilitzats amb un camp elèctric; posteriorment els ions atrapats es dissocien mitjançant l'aplicació de rampes de voltatge, que seguidament es desestabilitzen de forma selectiva, surten de la trampa en funció de la relació m/z i són detectats. Són equips robustos i relativament econòmics, però presenten algunes limitacions, com una zona de linealitat de la resposta molt reduïda, menor sensibilitat en comparació amb els QqQ o baixa velocitat d'escombratge. A la pràctica la seva aplicació a l'anàlisi de residus és molt limitada. Les trampes lineals (LIT) milloren clarament les prestacions de les IT.

Tal com s'ha comentat, a dia d'avui els instruments de triple quadrupol estan molt implantats i són eines essencials als laboratoris de control dedicats a l'anàlisi de residus en aliments. Quan es van començar a introduir com a eines de rutina, les seves altes prestacions en termes de selectivitat i sensibilitat van suposar un gran salt, i es va tenir la impressió que quedaven superats els problemes relacionats amb resultats de falsos conformes i falsos no conformes. Però els espectròmetres de triple quadrupol, igual que els de trampa d'ions, són instruments de baixa resolució; permeten diferenciar ions que difereixen pel que fa a m/z com a mínim en 1 unitat.; en el millor dels casos els equips més recents poden arribar a 0,1 Da. En aquestes condicions es poden produir interferències isobàriques que portarien a l'emissió de resultats erronis. És l'espectrometria de masses d'alta resolució la que pot donar resposta a aquest problema.

El llindar que s'estableix per diferenciar baixa i alta resolució (R_s) és $R_s = 10.000$ a una alçada del pic del 10%, o bé $R_s = 20.000$ si la R_s s'expressa a la meitat de l'alçada del pic (Full Width at Half Maximum, FWHM). Aquest valor llindar de R_s es recull en diferents texts legislatius, entre ells la Decisió 657/2002/CE [20].

L'espectrometria de masses d'alta resolució es trobava a finals del segle XX bàsicament representada pel sector magnètic i els equips de ressonància ciclòrica d'ions amb transformada de Fourier (FT-ICR). Tant per preu com per requeriments d'instal·lació eren, a la pràctica, inabastables pels laboratoris de control alimentari. Però els analitzadors de temps de vol (TOF, Time of Flight), que ja es van descriure als anys 50, s'han anat perfeccionant i els equips actuals proporcionen resolucions força superiors a 10.000.

En un TOF, com més lleugers siguin els ions, de menor massa/càrrega, major velocitat desenvoluparan i recorreran el camí al detector en menys temps. Amb l'ús de reflectrons, que allarguen el camí recorregut pels ions, els equips TOF han millorat la seva resolució, arribant actualment a $R_s = 60.000$. La forma de treballar d'aquests analitzadors és fent escombratges.

Actualment hi ha equips híbrids amb un acoblament amb un quadrupol (Q-TOF), per tal de poder seleccionar els ions precursors, la qual cosa millora la

sensibilitat de l'equip de forma notable. Un handicap associat a aquesta tecnologia, en comparació amb altres, és la necessitat d'un calibratge continu de m/z , que es fa introduint una solució calibrant, la qual cosa pot afectar la sensibilitat. Un altre dels problemes associats a l'ús de la tecnologia TOF és la necessitat de mantenir les condicions ambientals del laboratori molt estables pel que fa temperatura, i l'elevat preu dels instruments (com tots els equips d'espectrometria de masses d'alta resolució, HRMS) si els comparem amb els equips de baixa resolució que hi ha en el mercat. Per contra, un dels avantatges més importants és la elevada seva velocitat d'escombratge, comparada amb altres tipus de tecnologies, el que el fa un equip ideal quan es volen determinar molts compostos alhora [45].

L'aparició al mercat de la tecnologia Orbitrap ©, basada en les investigacions de Makarov, publicades l'any 2000 [46], ha estat un gran revulsiu en el camp de l'espectrometria de masses. L'analitzador Orbitrap, també anomenat analitzador orbital, arriba a resolucions més elevades, superiors a 100.000, basant-se en una trajectòria dels ions en els 3 eixos (X, Y, Z), a l'entorn d'un elèctrode central, a mode fus. Amb l'ús de la transformada de Fourier, es transforma el recorregut a l'analitzador en espectres de masses. Hi ha diversos models comercialitzats en l'actualitat, alguns d'ells amb acoblaments a altres analitzadors, com el quadrupol (Q-Exactive) o la trampa d'ions (LTQ-Orbitrap). L'acoblament a un quadrupol i a una trampa d'ions és l'Orbitrap Fusion Tribrid. El Q-Exactive és un dels equips utilitzats en aquesta tesi. Pertany a la categoria d'analitzadors híbrids i consta, a grans trets, d'un quadrupol on se seleccionen els ions, d'una trampa iònica (C-Trap) on s'acumulen els ions, d'una cel·la on es fragmenten els ions (HCD cell) i d'un analitzador Orbitrap, on els ions descriuen trajectòries oscil·lants. La figura 3.3 mostra l'esquema d'aquest tipus d'instrumentació.

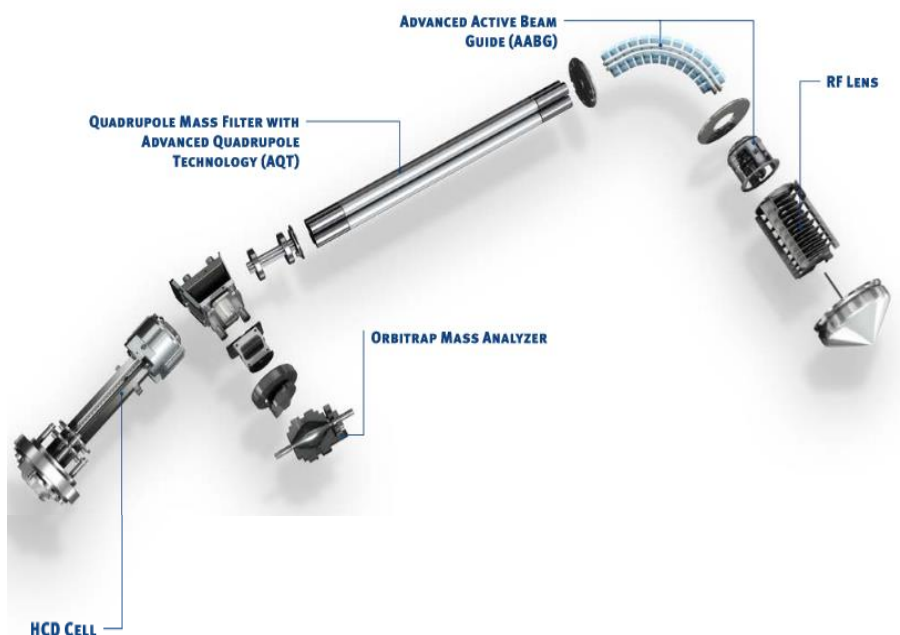


Figura 3.3: Analitzador Q-Orbitrap (font: www.thermofisher.com)

El Q-Exactive té com a principals avantatges les elevades resolucions a què pot arribar (fins a 140.000) i la seva robustesa; comparativament, un Q-TOF pot arribar a $R_s = 60.000$ i no és tan robust, ja que depèn molt més de les condicions ambientals i del calibratge, tal com s'ha descrit anteriorment.

Tot i així el Q-Exactive presenta alguns inconvenients, ja que és relativament lent comparat amb els Q-TOF i de vegades pot entrar en conflicte amb l'acoblament amb la UHPLC, quan l'elevada resolució cromatogràfica proporciona pics tan estrets que, depenent del mode de treball i condicions d'adquisició que s'utilitzin al Q-Exactives, no és possible adquirir prou informació espectral com per poder definir adequadament el pic cromatogràfic. Per aquest motiu, de vegades cal treballar amb menys resolució a l'espectròmetre, per tal que la detecció sigui més ràpida o dur a terme separacions cromatogràfiques més lentes amb l'objectiu que els pics cromatogràfics siguin una mica més amples i l'espectròmetre tingui temps de detectar el compost eluent, tenint així el nombre suficient de punts per poder definir el pic.

L'instrument Q-Exactive té definits uns quants valors de resolució: 17.500, 35.000, 70.000 i 140.000. Com major és la resolució emprada, major és el

temps de mesura necessari i per tant menor capacitat de determinar molts compostos alhora; cal arribar, per tant, a una solució de consens.

A part de fixar la resolució de treball, hi ha altres paràmetres a considerar, donat que l'equip inclou una trampa d'ions (C-trap) i per tant, cal optimitzar el temps d'obertura de la mateixa i el nombre d'ions que s'hi emmagatzemaran.

Aquests paràmetres que cal optimitzar un cop decidit el mode de treball són:

- AGC Target: fixa el nombre d'ions que entren a la C-trap en un segment de temps.
- Injection Time (IT): fixa el temps màxim en què la trampa està oberta. És un paràmetre relacionat amb la resolució i el multiplexing.
- Multiplexing (MSX): fixa el nombre de masses que l'espectròmetre pot monitoritzar al mateix temps; serveix per resoldre coelucions de pics cromatogràfics.

El Q-Exactive és un instrument que per les seves característiques permet molts modes de treball diferents; en aquest sentit i em l'àmbit de la seguretat alimentaria que ens ocupa, destaquem d'entre totes les possibles combinacions, els modes següents:

- Full-scan: escombrat usant l'analitzador orbitrap, sense usar ni el quadrupol ni la cel·la de col·lisió.
- All ion fragmentation: no hi ha selecció al quadrupol, es fragmenten tots els ions de la mostra a la cel·la de col·lisió, fent un escombrat a l'analitzador.
- t-SIM: selecció d'ions al quadrupol i anàlisi a l'orbitrap, sense fragmentació.
- t-SIM-ddpp: selecció d'ions al quadrupol + data dependent, fragmentant a la cel·la de col·lisió, amb condicions establertes per l'equip.
- t-MS/MS: selecció d'ions al quadrupol i fragmentació a la cel·la de col·lisió per obtenir ions precursors i fragments a la vegada.

En aquesta tesi, per tal d'obtenir la màxima informació de la molècula analitzada en condicions d'elevada sensibilitat, s'ha usat el mode t-MS/MS amb energia de col·lisió intermitja, que permet monitoritzar ions precursors i producte.

Les novetats tecnològiques descrites provoquen que la legislació actualment vigent vagi quedant obsoleta i es faci necessària una revisió urgent de la mateixa. A tall d'exemple, la Decisió 657/2002/CE no atribueix punts a l'acoblament LC-HRMS, ja que a l'època de publicació de la reglamentació estava en ple desenvolupament, i no parla de la monitorització de precursors o productes en alta resolució.

S'han publicat alguns reviews sobre l'ús creixent de la tecnologia Orbitrap en l'anàlisi d'aliments [47].

Alguns autors han publicat estudis comparatius dels 2 tipus d'instruments (Orbitrap vs Q-TOF) [48] en la determinació de 300 medicaments d'ús veterinari, usant-los en condicions de resolució similars i han pogut concloure que el Q-TOF presenta major efecte matriu per a la majoria de compostos estudiats. L'efecte matriu el calculen comparant els pendents de les rectes matrix-matched amb les rectes en dissolvent. Una altra de les diferències trobades és que la tecnologia Orbitrap permet arribar a límits més baixos i els temps d'anàlisi són més curts, tot i que els temps de vol es comporta millor quan es volen fer escombratges ràpids. Altres estudis s'han fixat en els límits d'aquests 2 tipus d'instruments; així el treball de Knolhoff [49], està centrat en la detecció de compostos desconeguts en matrius alimentàries comparant les prestacions dels 2 tipus de tecnologia. Les conclusions pel que fa a la comparació d'espectròmetres inclouen que cal treballar sempre amb errors de massa < 5 ppm, que l'exactitud de massa en el Q-TOF està molt afectada per l'elevada o baixa abundància dels ions i que en el cas de la tecnologia Orbitrap, l'exactitud ve molt afectada per la coalescència i la supressió iònica entenent com a coalescència, la coincidència de freqüències seculars en l'analitzador, que resulten en una superposició de núvols d'ions i per tant, en la distorsió de la freqüència mesurada [49]. En l'article es demostra que la coelució de

substàncies pot fer incrementar l'error en la massa des de 2 a 15 ppm. Autors com Kaufmann han comparat el seu propi mètode d'anàlisi per la determinació de medicaments d'ús veterinari usant un Q-TOF amb el mateix mètode d'anàlisi aplicat a l'espectròmetre tipus Orbitrap [50]. Els autors van haver de modificar l'extracció, incrementant el clean-up per usar l'Orbitrap, ja que van arribar a la mateixa conclusió que altres autors: la tecnologia Orbitrap està fortament afectada pel fenomen de la supressió iònica. Tot i així, els autors remarquen en la seva conclusió, que l'interval dinàmic és més llarg en l'Orbitrap que en el Q-TOF.

Els laboratoris de control han incorporat ja alguns instruments d'espectrometria de masses d'alta resolució per les seves tasques rutinàries i s'ha arribat a la paradoxa d'emetre resultats analítics que tot i ser d'alta fiabilitat no troben recolzament en la legislació vigent. En aquest sentit cal destacar treballs com els de Vanhaecke et al [22, 51] i Kaufmann et al [21], en què es qüestionen els criteris analítics de la legislació europea. Vanhaecke discuteixen les febleses de l'emissió de resultats seguint la legislació vigent, com per exemple, la possibilitat d'error quan es monitoritzen transicions poc específiques (pèrdues d'aigua o de diòxid de carboni), o quan existeixen interferències isobàriques coeluent a elevades concentracions. Tot i així, es remarca que la falta de criteris legislatius per a l'ús de l'alta resolució és un handicap que cal resoldre; els autors proposen treballar en les condicions següents: error de massa < 5ppm, $R_s > 20000$, atribuir 2 punts d'identificació per ió, monitoritzar 1 ion ratio i permetre una variació de temps de retenció relatiu < 2.5%, que són criteris actualment acceptats per la comunitat científica. S'apunta però, que amb els actuals sistemes d'UHPLC, la tolerància del 2.5% pel temps de retenció relatiu és massa elevada.

Kaufmann argumenta que la legislació europea està basada en opinions d'experts i no en dades científiques ni en estudis publicats per justificar el sistema de punts atribuït a cada tipus de residu.

Kaufmann et al, puntualitzen que el criteri de treballar amb error de massa < 5 ppm és arbitrari i que l'espectròmetre Orbitrap no mostra una correlació entre l'error de massa i l'abundància de l'ió. També qüestionen que s'usi el mateix

criteri d'error de massa < 5 ppm tant per precursors com per ions producte, ja que sovint s'adquireixen a diferents resolucions. Així mateix, afirmen que el pes de la confirmació no ha de recaure en els ion ratio donada la seva inestabilitat i dependència de les interferències coeluent. Discuteixen també el fet que en la validació cal determinar el $CC\beta$ o capacitat de detecció, mitjançant un estudi estadístic, (concentració de l'anàlit a la que hi hauria d'haver pocs errors de confirmació ($<5\%$)). Quan un analit està interferit, tot i que la seva concentració sigui $> CC\beta$, si l'ion ratio no es compleix, la mostra es donarà com a "conforme", donant lloc a resultats "falsos negatius", i per tant, un criteri "arbitrari" com és l'ion ratio serveix per rebutjar resultats amb consistència estadística, com és una concentració $> CC\beta$. Altres consideracions inclouen que l'adquisició a HRMS pot necessitar més temps que en baixa resolució i que és un factor a tenir en compte si es vol usar UHPLC.

Kaufmann i col·laboradors arriben a proposar nous criteris de confirmació usant espectròmetres d'HRMS. Aquest criteris relacionen la resolució usada a l'equip instrumental amb la puntuació atribuïda a cada ió monitoritzat; per exemple, a un ió precursor a $R_s = 70.000$ se li donen 2 punts i si es monitoritza a 35.000 , se li atribueixen 1,5 punts, prioritant el primer per evitar la confusió amb ions producte d'interferències isobàriques coeluent.

4. ANÀLISI DE RESIDUS DE MEDICAMENTS D'ÚS VETERINARI

4.1. Introducció

4.1.1. Metodologia analítica

En aquest capítol es presenten els mètodes d'anàlisi de residus de medicaments d'ús veterinari desenvolupats en el marc de la tesi. El capítol està estructurat en una introducció als medicaments veterinaris estudiats i a la seva anàlisi, una part dedicada als resultats dels estudis realitzats, en què s'inclouen els articles científics publicats sobre els nous mètodes per a l'anàlisi d'ivermectines, de nitroimidazols i d'antiinflamatoris no esteroideus, i finalment una discussió dels resultats obtinguts.

En la introducció general (capítol 3) s'ha fet una revisió del marc legislatiu relacionat amb la presència i l'anàlisi dels residus dels medicaments d'ús veterinari en aliments d'origen animal. Aquest camp es troba molt regulat, pel que fa als tipus de residu (classificació de les substàncies) i matrius diana, als nivells de concentració i altres característiques de funcionament que han d'assolir els mètodes d'anàlisi i a les tècniques instrumentals que es poden usar segons el tipus de residu, i que de fet venen pràcticament determinades pel sistema de puntuació que estableix la Decisió 2002/657/CE. En aquest context, i tenint en compte que els compostos estudiats són poc volàtils, l'acoblament de la cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem (LC-MS/MS) és el més convenient per a la seva determinació. En aquesta tesi s'ha considerat l'espectrometria de masses tant de baixa com d'alta resolució.

Un dels objectius prioritaris ha estat que els nous mètodes fossin, a més de fiables, d'elevat rendiment, adequats per a un laboratori amb una elevada càrrega de mostres.

L'anàlisi de residus de medicaments veterinaris en aliments d'origen animal es caracteritza per la seva complexitat, donada la coincidència de diferents factors:

- a) Nivells de concentració a confirmar molt baixos, de vegades per sota dels $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

- b) Matrius complexes i de característiques diverses, amb elevades concentracions de lípids, proteïnes, etc.
- c) Elevat nombre d'anàlits a determinar per cadascuna de les famílies de compostos a investigar.
- d) Nivells de concentració límit legiscats diferents segons la matriu: ous, llet, múscul, mel, peix, etc.
- e) Validacions complexes, regulades per legislació.

Els mètodes d'anàlisi confirmatòria de residus de medicaments veterinaris consten, en termes generals, de 3 etapes fonamentals: extracció dels anàlits, neteja (clean-up) dels extractes i determinació quantitativa i confirmació de la identitat.

Tot i això, abans cal procedir a la preparació de la mostra. La neteja de la mostra és un pas bàsic. Així, en el cas de l'anàlisi de múscul, cal eliminar teixits com el greix o les glàndules. En el cas d'haver d'analitzar glàndules, com ara el ronyó o el fetge, cal eliminar el múscul o el greix. L'eliminació de la part no desitjada es duu a terme usant pinces, tisores i bisturí. En el cas d'haver d'analitzar l'ull, cal obrir el globus, recollir l'humor vitri i rascar la retina. Un cop es disposa de la mostra en forma adequada s'homogeneïtza amb una picadora de mostres. Si l'anàlisi no es realitza al moment, les mostres es poden congelar a -18°C durant setmanes. Els compostos estudiats en aquesta tesi no han mostrat degradació quan les mostres s'han conservat congelades durant els mesos que han durat els experiments de posta a punt i validació del mètode d'anàlisi.

És ben conegut que les etapes d'extracció i clean-up són etapes crítiques, que determinen el bon funcionament del mètode d'anàlisi, però en molts casos són el coll d'ampolla del procediment. En general requereixen força intervenció manual i temps. Aquestes etapes venen condicionades per la naturalesa dels anàlits i les característiques de la matriu. Així, cal tenir en compte la composició de la matriu, com ara els percentatges de greix, proteïna o aigua, a més de les propietats fisicoquímiques dels anàlits.

Pel que fa a l'extracció, la selecció del dissolvent d'extracció és un punt clau. Convé utilitzar un dissolvent que sigui capaç d'extreure de forma eficient els anàlits, i si és possible que proporcioni extractes relativament nets. En l'àmbit de l'anàlisi dels fàrmacs d'ús veterinari, en tractar-se en la majoria de casos de compostos relativament polars, els medis més habituals per extreure els compostos són dissolvents orgànics com el metanol o l'acetonitril o bé tampons aquosos, o mescles hidroorgàniques d'aquest medis. Si es compara el metanol i l'acetonitril, cal dir aquest últim té un marcat efecte desproteïntzador (precipita la proteïna) la qual cosa afavoreix l'obtenció d'extractes més nets.

Quant a les tècniques emprades, a la bibliografia es troben propostes que fan ús de tècniques com l'extracció amb solvents pressuritzats [52] o l'extracció assistida amb microones [53], però en general l'extracció amb agitació mecànica, o si de cas amb l'ajut d'un bany d'ultrasons, sol proporcionar resultats similars i amb temps d'extracció curts. Per aquest motiu els laboratoris de control solen optar per l'agitació mecànica o assistida amb ultrasons, que resulten molt més simples i àgils quan cal processar un nombre de mostres important. És força habitual procedir a una segona extracció, el que permet millorar el rendiment del procés.

Per separar l'extracte de la mostra es centrifuga. La centrifugació es duu a terme normalment en fred, per tal d'evitar l'escalfament dels dissolvents i la degradació dels anàlits i també reduir la perillositat de la manipulació.

Normalment els extractes obtinguts són força complexos, i en gran part dels casos es fa una purificació o clean-up. Aquesta etapa és la que normalment requereix més intervenció de l'analista, la més laboriosa i lenta. No és d'estranyar doncs que en els casos en que no sigui estrictament necessari, és a dir si no hi ha interferències o impediments en la determinació dels anàlits, s'intenti obviar el clean-up. En aquest cas cal tenir present que si l'extracte és complex, per exemple amb un elevat contingut de proteïnes o de lípids, caldrà fer un manteniment força freqüent del sistema cromatogràfic.

Una possible alternativa, si la sensibilitat del mètode ho permet, és diluir l'extracte abans de la seva injecció al sistema cromatogràfic, però això només és viable quan els LMRs no són molt baixos i el mètode és prou sensible.

Però en la majoria de casos cal fer algun tipus de clean-up. Sens dubte, actualment la tècnica més emprada és l'extracció en fase sòlida (SPE), que permet a la vegada que eliminar interferències, concentrar els extractes i per tant assolir límits de detecció i quantificació més baixos. Per diferents motius, l'extracció líquid-líquid ha quedat molt relegada, tot i que per la seva efectivitat encara es proposen procediments que incorporen una extracció amb hexà per eliminar greixos.

El format més habitual de SPE és el que utilitza cartutxos i, tot i que hi ha sistemes que permeten l'automatització, molts laboratoris utilitzen estacions de buit, amb les que es poden processar simultàniament fins a 24 cartutxos.

Un bon clean-up requereix una selecció adequada de la fase sòlida i dels dissolvents. El tipus de cartutx a usar dependrà de la natura dels anàlits d'interès. Actualment hi ha moltes opcions, tant de fases que podríem considerar genèriques, com les de fase inversa, fase normal, de bescanvi catiònic o aniònic, mixtes (fase inversa-bescanvi), com d'altres molt selectives, dissenyades en particular per a un compost o família de compostos; en aquesta categoria s'inclouen els immunosorbents i els polímers d'empremta molecular. També hi ha fases d'exclusió molecular [54].

Amb diferència els cartutxos més emprats són els de fase inversa. Inicialment es tractava de fases sòlides basades en sílice amb cadenes C8, C18, grups fenil, etc. Avui en dia les fases més emprades són de tipus polimèric, com les del tipus Oasis® o equivalents d'altres marques, que mostren un comportament més robust, permeten treballar en un interval de pH molt més ampli, tenen més capacitat i són adequades tant per a compostos no polars, com per a compostos relativament polars.

En la majoria de casos, els compostos de la família tenen un comportament químic similar i es pot usar un únic tipus de cartutx per dur a terme la purificació. Tot i així, hi ha casos més complexos, en què la família està formada per compostos de naturalesa i comportament diferents, i el trobar un sistema comú eficaç no és senzill.

De forma genèrica, la purificació per SPE inclou els passos següents:

- a) Condicionament del cartutx amb dissolvents que s'usaran posteriorment.
- b) Càrrega de l'extracte de la mostra; en aquesta etapa els anàlits queden retinguts en la fase estacionària del cartutx i les interferències s'elueixen. Cal que el dissolvent de l'extracte no elueixi els anàlits.
- c) Rentat del cartutx amb un solvent que no elueixi els anàlits. Aquest pas serveix per eluir el màxim nombre possible d'interferents de la mostra que estan retinguts al cartutx.
- d) Assecat del cartutx: cal usar el buit per arrossegar tot el dissolvent usat en l'etapa de rentat i deixar el cartutx preparat per a l'elució dels anàlits.
- e) Elució: cal usar el dissolvent adequat segons la naturalesa dels anàlits i la modalitat de retenció que s'hagi utilitzat.

L'extracte purificat normalment es concentra en evaporadors de nitrogen, amb el temps, la temperatura i la pressió de gas optimitzats. Moltes vegades cal evitar la sequedat total dels extractes ja que això pot provocar pèrdues importants, i obtenir recuperacions baixes. L'error que es pot cometre en deixar volums finals diferents de l'extracte queda compensat per l'ús de patrons interns. L'extracte finalment es dilueix en un medi compatible amb el mètode cromatogràfic que s'utilitza per a la seva determinació, normalment una mescla de composició similar a la de la fase mòbil a l'inici del cromatograma.

Tot i que l'automatització de l'etapa de clean-up és factible, a la pràctica acaba requerint força manipulació i sol consumir bastant temps, i en definitiva és l'etapa més determinant pel que fa al temps d'anàlisi.

En aquest sentit, la proposta d'Anastassiades *et al* l'any 2003 [55] de la metodologia QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) ha suposat un punt d'inflexió en l'àmbit de l'anàlisi de residus en aliments.

La metodologia QuEChERS va ser inicialment desenvolupada per a l'anàlisi de plaguicides en verdures i fruites. Es basa en l'extracció dels anàlits amb un dissolvent orgànic, en la majoria dels casos acetonitril, en presència d'una

elevada concentració de sals per afavorir el pas dels compostos d'interès al solvent orgànic (efecte "salting out") i al mateix temps provocar la separació de la fase aquosa. Seguidament hi ha una etapa de purificació de l'extracte mitjançant extracció en fase sòlida dispersiva, seguida de l'evaporació i reconstitució de l'extracte amb el dissolvent adequat. La metodologia és molt simple i d'alt rendiment, permetent el processat àgil d'un elevat nombre de mostres, i és especialment atractiva per als laboratoris que han d'analitzar moltes mostres d'aquest tipus. A dia d'avui és el mètode recomanat pels laboratoris de referència en matèria de plaguicides. Amb el temps la metodologia QuEChERS s'ha anat aplicant a l'anàlisi d'altres tipus de mostres, com per exemple ous, llet, pinsos, etc. [48, 56, 58] i s'ha comprovat que també és adequada per a l'anàlisi d'altres tipus de compostos, com antibiòtics, tranquil·litzants, coccidiostàtics, etc. [45, 56, 57, 58].

En aquesta tesi s'ha estudiat la seva aplicació a l'anàlisi de compostos de naturalesa molt diversa i en diferents tipus de matrius: avermectines en múscul i greix (secció 4.1.2), nitroimidazols en múscul, ronyó, fetge i ull (secció 4.1.3), o antiinflamatoris no esteroideus en llet i múscul (secció 4.1.4).

En qualsevol cas, sigui quin sigui el tractament de mostra aplicat, atesa la polaritat dels compostos l'anàlisi confirmatòria de residus de fàrmacs veterinaris es realitza mitjançant cromatografia de líquids, i gairebé sempre, acoblada a l'espectrometria de masses.

A dia d'avui, molts dels nous procediments proposen l'ús de columnes amb grandària de partícula inferior a 2 μm , que permeten treballar en condicions d'ultra alta resolució (UHPLC), o bé amb partícules de nucli sòlid, o ambdues coses alhora. L'ús de columnes amb reblliments de grandària de partícula inferiors a 2 μm , requereix disposar d'instrumentació que pugui suportar pressions elevades, a l'entorn de 600-1000 bars. Quan la columna té com a fase estacionària partícules de nucli sòlid, es pot arribar a assolir una resolució dels pics cromatogràfics similar usant fases estacionàries amb diàmetres de partícula superiors (per exemple amb partícules de 2,5 μm), i en conseqüència amb pressions de treball menors. En definitiva el resultat és que s'obtenen pics

més estrets, i es milloren de forma molt notòria les separacions, alhora que s'obté una millor sensibilitat i es pot disminuir el temps d'anàlisi cromatogràfica. Els detectors utilitzats han de ser compatibles amb aquestes prestacions; és a dir han de ser de resposta molt ràpida, per tal de poder adquirir prou informació per aconseguir una bona definició del pic en un temps força reduït, de l'ordre de 10 a 12 s.

La modalitat de separació més emprada és, amb diferència, la fase inversa, amb columnes majoritàriament C18 o C8, tot i que recentment per a algunes aplicacions es proposen fases del tipus fenil o fenil-hexil. Les fases mòbils solen ser mescles hidroorgàniques, majoritàriament acetonitril-aigua. Sovint les separacions es fan en condicions àcides, tot i que alguns casos concrets es treballa a pH bàsics [59]. En aquest capítol en farem esment.

Cal comentar també que els darrers anys s'han comercialitzat diverses fases estacionàries adequades per a treballar en la modalitat de cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica (HILIC), que és especialment adequada per a algunes famílies de fàrmacs de polaritat molt elevada, com per exemple els aminoglicòsids [60, 61].

Una de les normatives fonamentals en l'anàlisi de residus de medicaments d'ús veterinari, la Decisió 657/2002/CE [20], obliga a l'ús de l'espectrometria de masses per a la determinació de compostos sense LMR, com és el cas dels nitroimidazols i de la majoria d'antiinflamatoris no esteroideus. L'aplicació d'aquesta normativa ha fet que equips com els triple quadrupols siguin actualment eines de rutina als laboratoris de control. Aquests instruments han experimentat una ràpida evolució, amb velocitats d'escombratge cada cop més elevades i temps menors per al canvi de polaritat, un paràmetre fonamental quan els anàlits a determinar ionitzen en polaritats diferents.

La Decisió 657/2002 /CE permet l'ús de detectors tradicionals com el UV o el de sèries de diodes (DAD) en l'anàlisi de compostos amb LMR, com per exemple els antibiòtics. Tot i així, la majoria de mètodes d'anàlisi desenvolupats en la última dècada usen l'espectrometria de masses, i en particular, el triple quadrupol, donada la seva gran sensibilitat i versatilitat d'aplicacions.

Pel motius explicats, actualment, la majoria de publicacions en aquest camp proposen l'ús de triple quadrupols, tot i que i de forma creixent es planteja l'ús d'espectròmetres de masses d'alta resolució, entre els que cal destacar els de temps de vol (TOF) i els analitzadors orbitals, basats en la tecnologia Orbitrap®.

Els equips TOF i els híbrids que inclouen un quadrupol (Q-TOF) van anar entrant al laboratoris durant la 1^a dècada del segle XXI, però no s'ha consolidat la seva implementació com a eina de rutina als laboratoris de control, probablement degut no només al seu elevat cost, sino també a requeriments d'ús pel que fa a calibratge i condicions ambientals. Més recentement, comença a descriure's l'ús d'equips basats en la tecnologia Orbitrap, reportada ja l'any 2000 [46] i disponible comercialment a partir del 2005. L'analitzador Orbitrap té alguna limitació important, com és el seu preu d'adquisició, però a la vegada ofereix importants avantatges, com la seva robustesa i sensibilitat.

Kaufmann i col·laboradors comparen els resultats obtinguts en la determinació d'ivermectines, benzimidazols i anti-inflamatoris no esteroideus (NSAIDs) usant espectrometria de masses d'alta resolució, amb un espectròmetre amb analitzador Orbitrap treballant en mode Scan a una resolució de 50.000 FWHM amb un equip de tipus Q-TOF amb resolucions de l'ordre de 10.000 a 15.000 FWHM [50, 62]. L'equip Orbitrap, que permet establir finestres de masses molt estretes (de 5, 10 ppm d'error de massa), proporciona més selectivitat i límits de detecció més baixos.

Els resultats de Wang et al [45] que usen un instrument tipus Q-TOF en mode Scan per determinar NSAIDs, amb una resolució de 15.000 FWHM, també posen de manifest que els límits de detecció són força superiors als que es poden obtenir amb un analitzador Orbitrap.

El calibratge és una etapa fonamental i crítica per poder donar resultats acurats. És ben conegut que la detecció mitjançant espectrometria de masses és força sensible als efectes de la matriu, en especial si es treballa amb electroesprai com a sistema d'ionització.

Quan hi ha efectes de matriu una de les opcions és el calibratge per addició estàndard. En aquesta modalitat, s'obté una corba de calibratge per a cada mostra, a partir de l'addició diferents quantitats de patró sobre porcions de la mostra. Però els laboratoris de control no poden assumir aquest tipus de calibratge, que requereix molt temps d'anàlisi quan el nombre de mostres és elevat.

Una de les estratègies més habituals en el camp de l'anàlisi de residus és el calibratge amb patrons equivalents a la matriu (MMS, de matrix matched standard). Els patrons es prepararen addicionant quantitats conegudes dels anàlits a porcions de matriu blanca, que es tracten de la mateixa que les mostres que es vol analitzar. Si l'addició dels anàlits es fa sobre l'extracte obtingut després de tractament de mostra, el calibratge compensa els efectes de la matriu. Si l'addició dels anàlits a la matriu blanca es fa abans de l'extracció, el calibratge corregeix l'efecte de matriu i també la recuperació del procés d'extracció i clean-up. En aquesta cas parlem de patrons SMMS (de surrogate matrix matched standards).

Aquest procediment de calibratge no es troba descrit en la legislació europea d'anàlisi de residus de zoonòtics, però sí en altres documents d'àmbits diferents; així en documents de la comissió del Codex Alimentarius per a l'anàlisi de residus de medicaments veterinaris ja es descriu aquesta forma de treball i se l'anomena "method matrix matched standard calibration curve" [63].

Tanmateix l'ús de SMMS no corregeix l'efecte de factors incontrolats, com possibles fluctuacions o inexactituds en diferents etapes del procediment. En aquest sentit és convenient l'ús de patrons interns, que s'addicionen tant als patrons del calibratge com a les mostres.

El patró intern hauria de ser un compost marcat isotòpicament (amb ^{13}C , ^{15}N o D), de forma que assegurem la màxima similitud amb els anàlits, i així el comportament més similar possible durant tota la determinació analítica. La situació ideal seria aquella en què es pogués usar un patró intern marcat isotòpicament de cadascun dels anàlits; això malauradament no és possible ja que no existeixen en el mercat compostos d'aquests tipus per tots els anàlits, el

seu preu és força elevat i la disponibilitat no és molts cops immediata, donat que hi ha poca oferta i pocs laboratoris que els sintetitzin.

Per algunes famílies de compostos no es troba cap compost marcat isotòpicament en el mercat i llavors cal usar anàlegs estructurals que no s'usin com a medicament veterinari, tal com descriu la Decisió 657/2002/CE. És el cas de les avermectines, en què hem usat la selamectina com a patró intern.

L'addició de patró intern sobre totes les mostres té diferents avantatges:

- a) Permet controlar les diferències entre les matrius de la tanda
- b) Permet comprovar que el procés d'extracció hagi estat correcte per cadascuna de les mostres analitzades
- c) El fet que la recta de calibratge es construeixi usant la relació de l'anàlit respecte el patró intern garanteix que els resultats de les mostres a quantificar estiguin automàticament corregits per possibles fluctuacions.

La pràctica més habitual en l'anàlisi de residus de medicaments en aliments és emprar patrons SMMS i l'addició de patrons interns, i és la que s'ha utilitzat en tots els mètodes desenvolupats en aquesta tesi.

Així, els patrons (anàlits i patrons interns) s'addicionen a les mostres blanques, que seran els SMMS del calibratge, i els patrons interns s'addicionen també a les mostres que cal analitzar. L'addició de patrons es realitza de forma prèvia a l'extracció, per tal de garantir que els compostos circulin a través de les etapes d'extracció i clean-up. Habitualment es deixa uns 30 minuts de contacte de la matriu amb el patrons per tal de fer que hi hagi interacció anàlit-matriu.

Centrant-nos en les famílies de medicaments estudiades en aquesta tesi, en el cas de les avermectines hi ha autors que quantifiquen amb un calibratge fet amb patrons en dissolvent [64, 65], tot i que la majoria ho fa amb SMMSs [66, 67, 68], mentre d'altres utilitzen la combinació de SMMS i patró intern [59]. Val a dir que per les avermectines no hi havia en el moment de validació del mètode d'anàlisi patrons marcats isotòpicament comercialitzats.

Pel que fa als nitroimidazols, ja es disposa d'una sèrie de compostos marcats isotòpicament disponibles al mercat i la majoria d'autors usen estàndards

interns i SMMSs [69, 70, 71, 72], però també hi ha treballs en què s'utilitzen patrons MMS, preparats a partir d'extractes de mostres blanques [43, 73, 74]. Finalment, pel que fa a l'anàlisi de NSAIDs, com en el cas anterior, els compostos marcats isotòpicament estan disponibles en el mercat i la majoria d'autors en fan ús [75, 76, 62, 77], encara que algun autor [78], usa només estàndards interns però no dopa les mostres prèviament a l'extracció.

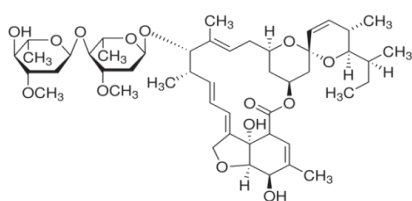
4.1.2. Avermectines

Ús terapèutic

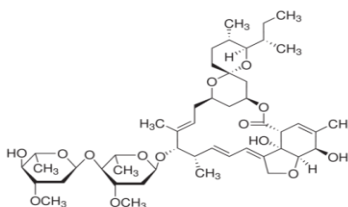
Les avermectines són lactones macrocíclics amb efecte antihelmíntic. Són compostos sense propietats àcid-base i altament lipofílics, per la qual cosa presenten una elevada distribució en els teixits adiposos i una prolongada residència en el plasma. S'utilitzen en veterinària per controlar les infeccions per endo i ectoparàsits, tant en fase larva com en fase adulta.

La família de compostos inclou l'abamectina (ABA), la ivermectina (IVE), la doramectina (DORA), l'eprinomectina (EPRI) i l'emamectina (EMAM), les estructures de les quals es mostren a la Figura 4.1.1.

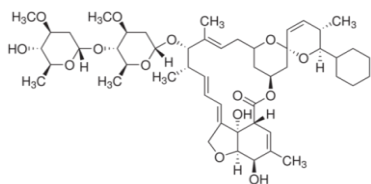
Provenen de la fermentació al laboratori usant el bacteri *Streptomyces avermitilis* i tots els compostos estudiats, excepte la DORA, són barreges de dos isòmers B1a i B1b (amb una proporció majoritària, superior al 80%, de l'isòmer B1a), amb propietats toxicològiques semblants. L'isòmer B1a té un radical 2-butil en la posició C₂₅, mentre que l'isòmer B1b té un grup isopropil en la mateixa posició.



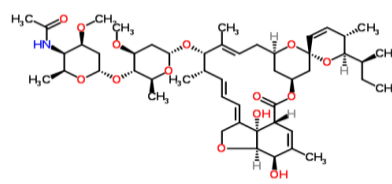
Abamectina B1a



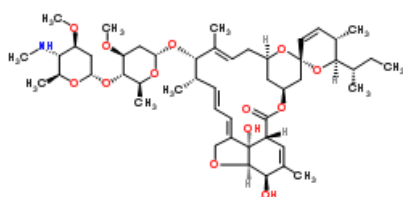
Ivermectina B1a



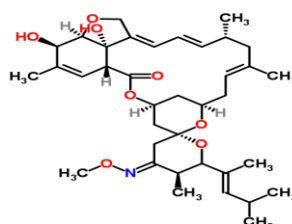
Doramectina



Eprinomectina B1a



Emamectina B1a



Moxidectina

Figura 4.1.1. Estructura de les avermectines.

La moxidectina (MOXI), de fet no és una avermectina sinó una milbemicina, sintetitzada per fermentació amb el bacteri *Streptomyces cyano-griseus*, però està molt relacionada tant estructuralment com a nivell terapèutic, i se sol analitzar conjuntament amb les avermectines.

A part dels usos genèrics en medicina veterinària ja descrits (control d'infeccions per endo- i ecto-paràsits), algun dels compostos estudiats té aplicacions més específiques. Per exemple, la doramectina, en ser un compost més lipofílic en comparació amb la resta, presenta una major concentració en plasma i s'usa per eliminar els àcars de la sarna. L'eprinomectina té un ús descrit per tractar paràsits intestinals, nemàtodes pulmonars, polls i àcars de la sarna en bovins, gats i gossos. L'emamectina té un ús en aquicultura pel control d'infeccions per paràsits en salmons (*Lepeophteirus salmonis* i *caligus elongatus*) i és un producte autoritzat per ser addicionat a l'aliment d'aquests peixos en molts països europeus. La moxidectina té com a espècies de destí tant els bovins i equins com els animals de companyia (cànids i felins).

Les avermectines són compostos regulats pel Reglament 37/2010/CE [13], amb LMR en diverses matrius, el quals es mostren a taula 4.1.1.

Taula 4.1.1. Límits màxims de residu (LMR) d'ivermectines [13].

Substància activa	Residu marcador	Espècie animal	LMR (µg/kg)	Teixit diana
Abamectina	Avermectina B1a	Ovins	20 50 25 20	Múscul Greix Fetge Ronyó
		Bovins	10 20	Greix Fetge
Doramectina	Doramectina	Tots els mamífers	40 150 100 60	Múscul Greix Fetge Ronyó
Emamectina	Emamectina B1a	Peixos	100	Múscul i pell (en proporcions normals)
Eprinomectina	Eprinomectina B1a	Bovins	50 250 1500 300 20	Múscul Greix Fetge Ronyó Llet
Ivermectina	Ivermectina B1a	Tots els mamífers destinats a producció d'aliments	30 100 100 30	Múscul Greix Fetge Ronyó
Moxidectina	Moxidectina	Bovins, ovins, èquids	50 500 100 50	Múscul Greix Fetge Ronyó
		Bovins, ovins	40	Llet

A part d'aquests usos, algunes de les avermectines també s'utilitzen en medicina humana; així trobem la ivermectina, que té aplicació per combatre algunes infeccions dèrmiques i oculars, com l'oncocerciasis, una malaltia parasitària que provoca problemes a la pell i ceguera, i la estrongiloidiasis, provocada per l'entrada de paràsits a través de la pell i que s'allotgen als intestins; també s'utilitza contra els polls i la sarna. Es metabolitza ràpidament i s'excreta per via urinària o fecal.

El mecanisme d'acció de les avermectines no està aclarit en la seva totalitat; la seva lipofilitat n'afavoreix l'absorció transcuticular; tot i així, s'ha comprovat que aquesta és tan efectiva com l'absorció oral. El principal mecanisme és un augment de la permeabilitat de la membrana cel·lular als ions clorur. El flux

d'ions carregats negativament cap a l'interior de la neurona provoca la seva hiperpolarització, la qual cosa resulta en un bloqueig de la transmissió postsinàptica dels impulsos nerviosos (interneuronal i neuromuscular). Això causa paràlisi i mort en les espècies de nematodes i artròpodes sensibles [79]. Finalment, i a part dels usos en medicina veterinària o humana, alguns dels compostos tenen altres aplicacions; així, l'abamectina s'usa com a insecticida i acaricida en cultius de fruita, hortalisses i plantes ornamentals; quan s'utilitza d'aquesta forma es degrada ràpidament en condicions aeròbies, ja que és fotosensible i es degrada ràpidament en l'aigua i en el sòl. L'emamectina té un ús com a fitosanitari ja que té activitat insecticida i s'ha demostrat ser eficaç contra les plagues de les palmeres.

Anàlisi d'avermetines en mostres alimentàries

En el cas de les avermectines el dissolvent més habitualment usat per la seva extracció és l'acetonitril [59, 65, 66], o barreges acetonitril: metanol [64], tot i que algun autor ha descrit l'ús altres reactius, com l'isooctà [67]. L'acetonitril aporta a més un efecte de precipitació de les proteïnes que és força útil a l'hora de netejar els extractes.

Per purificar els extractes normalment s'aplica una SPE amb cartutxos del tipus fase inversa [59, 68, 44] o alúmina [66], però hi ha autors que no apliquen cap clean-up, [64, 65, 67], argumentant la baixa reproduïbilitat del procés.

La majoria dels mètodes d'anàlisi de residus d'avermectines es basen en l'acoblament de la cromatografia de líquids i l'espectrometria de masses, generalment amb equips de triple quadrupol, tot i que hi ha autors que descriuen l'ús de trampes d'ions [68], de quadrupol-trampa (Q-Trap) [66] o espectròmetres d'alta resolució amb analitzador Orbitrap [62].

Les avermectines poden ser ionitzades tant en mode positiu com en negatiu, sempre comptant amb l'ajuda de les fases mòbils adequades. Alguns autors proposen l'ús de sondes d'APCI [44, 68], però la majoria utilitza ESI [59, 64] [62, 66, 67, 81].

Turnipseed et al [68] comparen les sondes APCI i APPI acoblades a espectròmetres de tipus triple quadrupol, i estudien la ionització en positiu i en

negatiu. Obtenen un senyal 100 vegades més intens en mode positiu usant APCI, però descriuen senyals molt intensos d'adductes amb Na^+ i NH_4^+ , que provoquen una disminució en el senyal de l'espècie M-H^+ . Usant el mode negatiu, el senyal més intens l'obtenien amb la sonda APPI (atmospheric pressure photo-ionisation).

La formació d'adductes amb NH_4^+ o Na^+ en ionitzar en mode positiu es descrita també per altres autors que utilitzen una font ESI [66, 67].

Durden [33] i Dahiya et al [34] estudien els 2 modes d'ionització amb una font ESI i conclouen que el mode positiu dona senyals més intensos, que permeten obtenir límits de detecció més baixos, però que el mode negatiu dona corbes més lineals, per la manca d'interferències.

D'altra banda hi ha autors que proposen l'ús de detectors de fluorescència. Atès que les avermectines no són intrínsecament fluorescents cal formar derivats fluorescent, que s'obtenen per reacció amb 1-metilimidazol i anhídrid trifluoroacètic. Els mètodes LC-FLD descrits proporcionen una sensibilitat adequada per a la seva aplicació al control de residus en aliments [65, 80]. La normativa europea permet l'ús d'aquest tipus d'acoblament ja que les avermectines pertanyen al grup B de residus de medicaments a investigar en els aliments. Els límits de quantificació i de detecció (LQ, LD) obtinguts són considerablement més alts que els dels treballs que usen espectrometria de masses i se situen a l'entorn de $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ per LQ.

4.1.3. Nitroimidazols

Ús terapèutic

Els nitroimidazols són compostos efectius contra paràsits com els protozous i bacteris anaeròbics. Són efectius en malalties que afecten humans com l'amebiasis, la giardiasis i la tricomoniasis, ja que actuen sobre l'Entamoeba Histolítica, la Giardia Lamblia i la Tricomona Vaginalis. En veterinària, aquests compostos s'utilitzen en aviram per combatre la histomoniasi i la coccidiosi i en porcins per combatre la enteritis hemorràgica. Algun dels compostos de la família tenen un ús majoritari en animals de companyia, com és el cas del ronidazol. Són compostos que s'administren per via oral i la seva vida mitja

dura entre les 8 i les 24 hores a l'organisme, es metabolitzen en el fetge i s'eliminen per via urinària i fecal.

La figura 4.1.2 mostra les estructures dels nitroimidazols estudiats:

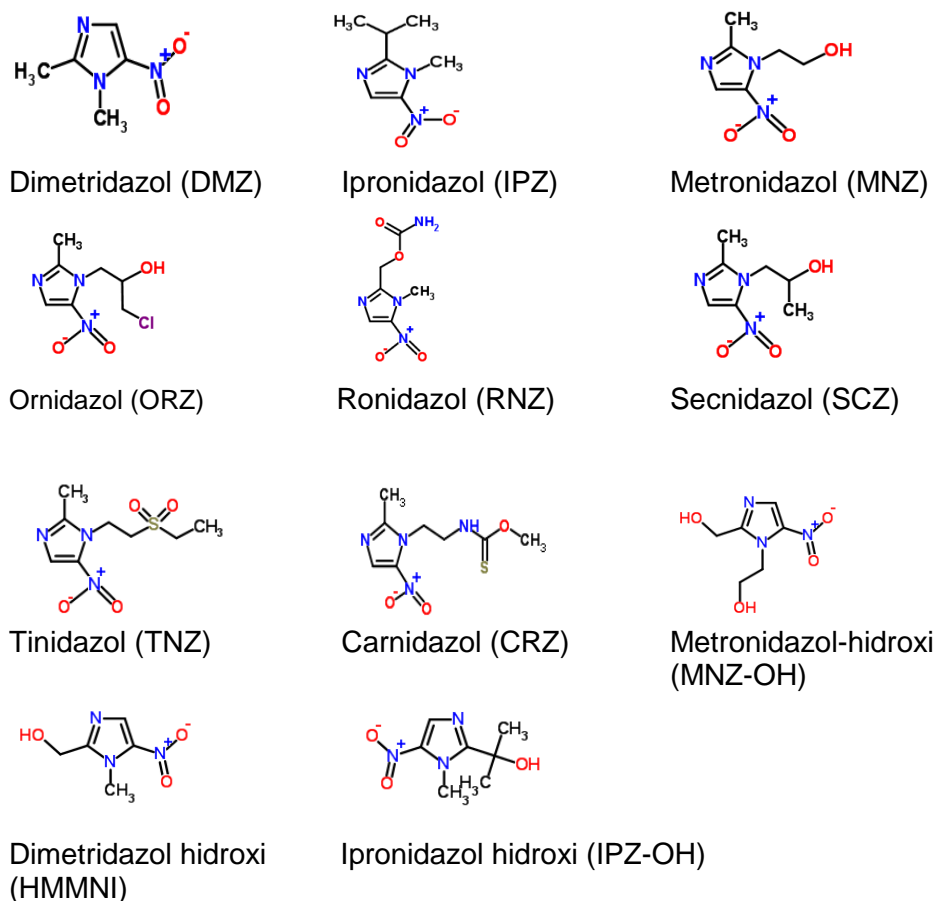


Figura 4.1.2. Estructures de nitroimidazols

El primer compost usat contra una protozoosi va ser el metronidazol. Posteriorment es van anar sintetitzant altres compostos de la família, que van mostrar una farmacocinètica més avantatjosa; així per exemple, el tinidazol s'absorbeix molt ràpidament a l'intestí i resta més temps en els teixits, l'ornidazol manté una elevada concentració en sang i s'elimina lentament, per tant es poden realitzar tractaments més curts, i finalment el secnidazol, que ja permet tractaments en dosis úniques.

El mecanisme d'acció dels nitroimidazols es basa en el grup nitro, que es redueix amb la ferredoxina del paràsit i es forma un compost reactiu que interfereix en el transport d'electrons i trenca l'àcid desoxirribonucleic (ADN), i per tant atura l'activitat del paràsit.

Tot i ser compostos molt efectius contra les esmentades malalties, tenen importants i freqüents efectes secundaris en humans, evidents en un 30% de les persones que es mediquen, com ara convulsions, vertígen, efectes gastrointestinals o sabor metàl·lic. A més, s'han descrit efectes carcinogènics en estudis preclínics; per exemple el metronidazol té activitat mutagènica en algunes soques de bacteris, i compostos com el dimetridazol o l'ipronidazol es metabolitzen ràpidament per oxidació en la posició C₂ de l'anell imidazol, donant els hidroxí-derivats, que mostren major activitat mutagènica que els compostos originals en assajos amb bacteris.

Donada la freqüència i severitat dels efectes secundaris en humans i l'activitat mutagènica dels seus metabòlits, el control del seu ús en ramaderia és del tot imprescindible. Així, els compostos més tòxics de la família es troben expressament prohibits en el Reglament 37/2010/CE; aquests compostos són metronidazol, ronidazol, dimetridazol i els metabòlits hidroxilats de tots ells, tal com es mostra a la taula 4.1.2, on s'indiquen les substàncies prohibides per l'esmentat Reglament:

Taula 4.1.2. Llista de substàncies prohibides segons el Reglament 37/2010/CE [13]

Sustancias prohibidas

Sustancia farmacológicamente activa	LMR
<i>Aristolochia spp.</i> y sus formulaciones	No puede establecerse LMR.
Cloranfenicol	No puede establecerse LMR.
Cloroformo	No puede establecerse LMR.
Clorpromazina	No puede establecerse LMR.
Colchicina	No puede establecerse LMR.
Dapsona	No puede establecerse LMR.
Dimetridazol	No puede establecerse LMR.
Metronidazol	No puede establecerse LMR.
Nitrofuranos (incluida la furazolidona)	No puede establecerse LMR.
Ronidazol	No puede establecerse LMR.

La resta de compostos es troben classificats en el grup B2b (coccidiostàtics incloent els nitroimidazols) de la Directiva 96/23/CE [15], que estableix els residus de medicaments a controlar en aliments d'origen animal. Atès que la legislació no estableix LMR per cap nitroimidazol, d'acord amb el Reglament 470/2009/CE [11], cal considerar-los compostos no autoritzats i detectar-los i confirmar-los a les concentracions més baixes que sigui possible. Tot i així, el laboratori europeu de referència (BVL, Berlín) ha publicat unes concentracions recomanades (3 µg/kg en matrius com plasma, sèrum, retina, ous, múscul, llet i mel), que els laboratoris de control han de ser capaços de poder confirmar [26]

Anàlisi de nitroimidazols en mostres alimentàries

En el cas de l'anàlisi de nitroimidazols, la majoria d'autors usen l'acetonitril com a dissolvent d'extracció [73, 82], o amb algunes variants, com l'addició de NaCl [69, 70], acetat d'etil [43] o àcid fòrmic [71]. Alguns autors han estudiat l'ús d'altres dissolvents, com ara l'acetat d'etil o el diclorometà [74], arribant a la conclusió que aquests dissolvents comporten una major co-extracció de components no desitjats, en comparació amb l'acetonitril.

En el cas dels nitroimidazols, observem que existeix una gran variabilitat a l'hora de dur a terme la neteja dels extractes de les mostres; hi ha autors que no duen a terme aquesta etapa [83], n'hi ha que usen l'extracció líquid-líquid (LLE) amb hexà [69, 70], altres apliquen una SPE amb cartutxos de diferents tipus, o bé una extracció per sorció amb barres (bar sorptive extraction, SBSE) [84].

Pel que fa a la SPE, els cartutxos polimèrics són els descrits amb més freqüència a la bibliografia [43, 71, 72]. Tot i així, hi ha autors que usen altres tipus de cartutxos, com els de bescanvi catiònic fort (SCX) [74, 85], basant-se en la retenció dels anàlits protonats en medi àcid per part de la fase sòlida benzeno-sulfònica. També s'ha proposat l'ús de fases molt més selectives, com polímers d'empremta molecular (molecularly-imprinted polymers, MIPs) [73].

Alguns dels articles revisats eviten l'etapa de clean-up amb SPE, substituint-la per una extracció líquid-líquid (LLE) amb hexà [60, 70] o bé no apliquen cap tipus de purificació [83].

En tractar-se de compostos prohibits o sense LMR, és obligat fer la determinació dels residus de nitroimidazols mitjançant LC-MS.

La majoria d'autors descriuen l'ús d'instruments de triple quadrupol i amb una font ESI [73, 69, 70, 71, 74]. Els nitroimidazols s'ionitzen en mode positiu i no tenen una tendència tan acusada a formar adductes com les avermectines. Així, l'ió monitoritzat és, en la majoria de casos, el M-H⁺.

4.1.3. Antiinflamatoris no esteroideus

Ús terapèutic

Els antiinflamatoris no esteroideus (NSAIDs) són compostos molt usats tant en veterinària com en medicina humana. S'estima que el consum mundial de NSAIDS és a l'entorn de 216 milions de dosis al dia.

A part dels efectes antiinflamatoris, els NSAIDs també tenen efectes antipirètics i analgèsics. L'efecte antiinflamatori dels NSAIDs es basa en la inhibició de la ciclooxigenassa (COX), que és un enzim implicat en la producció de prostaglandines a partir dels àcids grassos. Les prostaglandines són compostos que actuen sobre el sistema nerviós, els teixits llisos, la sang i altres; a més, intervenen en la regulació de la pressió sanguínia, en l'aparell digestiu (mantenen la integritat de la mucosa gàstrica) i en els processos inflamatoris al·lèrgics (estimulen els terminals nerviosos del dolor).

La ciclooxigenassa, té els isòmers COX-1 i COX-2. La isoforma relacionada amb els processos inflamatoris és la COX-2. Si tenim en consideració el mecanisme d'acció, podem distingir dos tipus de NSAIDs. Els NSAIDs *no selectius* (diclofenac, fenilbutazona, etc.) inhibeixen tant la COX-1 com la COX-2, i en conseqüència tenen tant efectes beneficiosos (reducció de la inflamació) com no desitjats (eliminació de la mucosa gàstrica). En canvi, els NSAIDs *selectius*, com ara el meloxicam, només inhibeixen la COX-2, i no alteren la mucosa gàstrica, tot i que requereixen dosis més elevades per igualar els efectes antiinflamatoris dels no selectius [86].

Tal com es comentava al principi d'aquest capítol, els NSAIDs tenen aplicacions tant en medicina humana com en veterinària; així, les seves espècies de destí són diverses, i moltes vegades s'usen com a suplement en

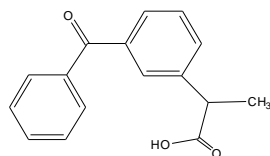
una teràpia amb antibiòtics. Algun dels seus usos principals són per al tractament de la mastitis en vaques productores de llet o de la síndrome de mastitis metritis agalactia en porcíns. En el cas de les vaques productores de llet hi ha alguns NSAIDs que estan autoritzats i tenen per tant LMR, donat que la llet és un fluid corporal i una via d'excreció d'aquests medicaments. Tot i així, la major part de NSAIDs usats en medicina humana (ibuprofè, naproxè) o en animals de companyia (vedaprofè, fenilbutazona) estan prohibits a la UE en les vaques productores de llet [76].

La llista de compostos permesos varia segons l'autoritat reguladora; així la UE permet l'ús dels compostos de la taula 4.1.3, on per exemple hi ha el flunixin, el carprofè, àcid tolfenàmic, o el meloxicam. Al Japó, la llista de substàncies permeses inclou carprofè, ketoprofè, flunixin, meloxicam i àcid tolfenàmic. La llista de la FDA (Food and Drugs Administration) inclou el flunixin, la fenilbutazona i el metamizol [87].

D'altra banda alguns dels NSAIDs tenen altres aplicacions diferents de les anti-inflamatòries; per exemple el meloxicam es mostra efectiu com anticonceptiu d'emergència no hormonal en humans.

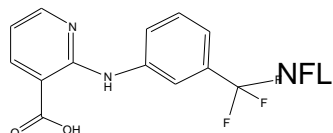
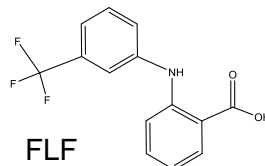
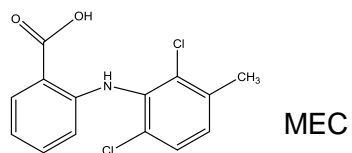
Els NSAIDS es poden classificar atenent a la seva estructura química. Els NSAIDS més antics pertanyen a la família de l'àcid salicílic i de les pirazolones, mentre que els més nous pertanyen a famílies com la dels oxicams o la de l'àcid antranílic. A la figura 4.1.3 es mostren les principals famílies de NSAIDS i s'indiquen els compostos estudiats en la present memòria:

a) Derivats de l'àcid propiònic: ketoprofè (KTP)

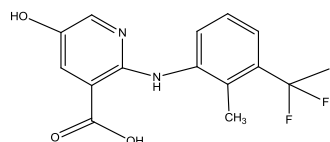
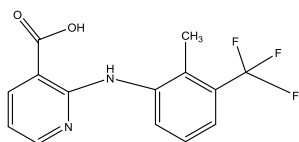


KTP

- b) Derivats de l'àcid antranílic: àcid meclofenàmic (MEC), àcid flufenàmic (FLF) i àcid niflúmic (NFL)



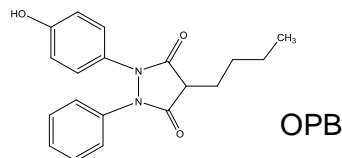
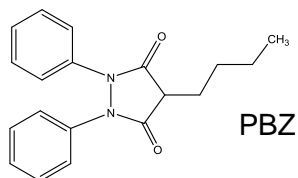
- c) Derivats de l'àcid nicotínic: flunixin (FLU) i 5-hidroxi-flunixin (5-OH-FLU)



FLU

5-OH-FLU

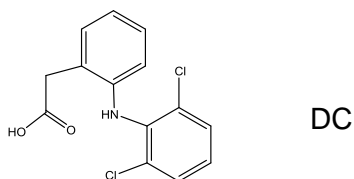
- d) Pirazolones: fenilbutazona (PBZ) i oxifenbutazona (OPB)



PBZ

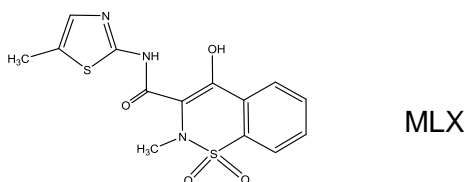
OPB

- e) Derivats de l'àcid acètic: diclofenac (DC)



DC

- f) Classe dels oxicam: meloxicam (MLX)



MLX

Figura 4.1.3. Estructura dels NSAIDs

Els LMR per aquests compostos es troben recollits al Reglament 37/2010. En general els valors es situen entre 5 i 500 µg/kg, excepte en el cas del diclofenac, que en llet té un LMR extremadament baix (0,1 µg/kg), difícil d'assolir per a la majoria de laboratoris de control i que és força inferior a la concentració mínima recomanada pel laboratori europeu de referència (BVL, Berlin) que cal que els laboratoris de control puguin determinar (5 µg/kg) [26]. A la taula 4.1.3 s'han recollit els límits màxims de residu establerts a la UE, així com les concentracions recomanades pel laboratori europeu de referència:

Taula 4.1.3. Límits màxims de residu [13] i concentracions recomanades [26] dels NSAIDs .

Compost	LMR (µg/Kg)				Concentracions recomanades pels CRL's (µg/Kg)	
	Llet	Múscul			Llet	Múscul, ronyó, fetge, plasma, llet
		Boví	Porcí	Èquids	No indicat	No indicat
5-OH-flunixin	40	40				
Flunixin	40	20	20	20		
Diclofenac	0,1	5		5	5	
Carprofè		500		500		
Àcid Tolfenamic	50	50				
Meloxicam	15	20				
Fenillbutazona						5
Oxifenbutazona						5
Ibuprofè						10
Naproxè						10
Àcid Mefenàmic						10

4.3.2. Anàlisi d' antiinflamatoris no esteroideus en mostres alimentàries

La família de compostos dels antiinflamatoris no esteroideus està integrada per compostos de característiques físico-químiques força diferents i, per tant, la seva extracció i clean-up comporta una dificultat afegida.

Com en els casos anteriors, l'acetonitril és el dissolvent més utilitzat per a l'etapa d'extracció [75, 76, 78], donada la seva capacitat addicional de

precipitar proteïnes, tot i que alguns autors usen mesclures d'aquest dissolvent amb metanol [88] o amb acetat d'etil [89]

Pel que fa a la purificació dels extractes, en ser els NSAIDs un grup de medicaments molt heterogeni, les propostes fetes depenen molt dels compostos inclosos en cada estudi. Així, alguns autors descriuen un clean-up mitjançant LLE amb hexà [75], altres fan una purificació per SPE usant cartutxos de fase normal tipus amino [76], o cartutxos de fase reversa C18 [90], polimèrics tipus HLB [78] o combinació de C18 i alumina [91].

Cal fer esment que hi ha autors que no duen a terme cap tipus de clean-up, confiant en la selectivitat de l'equip d'espectrometria de masses; aquest és el cas dels mètodes proposats pel grup de Kaufmann, que usa un espectròmetre tipus Orbitrap [50, 62]. En general aquest tipus d'estratègia és molt atractiva per simplificar el procediment d'anàlisi, però a la pràctica, si cal analitzar un nombre important de mostres, només és aplicable si els extractes obtinguts són relativament nets; altrament les feines de neteja i manteniment de l'equip poden ser tan o més laborioses,

En l'anàlisi cromatogràfica dels NSAIDs, s'utilitzen diferents estratègies. El més habitual és dur a terme l'anàlisi usant cromatografia de líquids, encara que també hi ha autors que han separat els compostos usant la cromatografia de gasos, derivatitzant els anàlits amb anhídrid heptafluorobutíric en un medi de hexafluoropropanol [92]. L'anàlisi per LC es duu a terme habitualment en columnes C18 [77, 78] o C8 [75, 76], tot i que més recentment s'han explorat altres camps, com és l'ús de columnes HILIC [93].

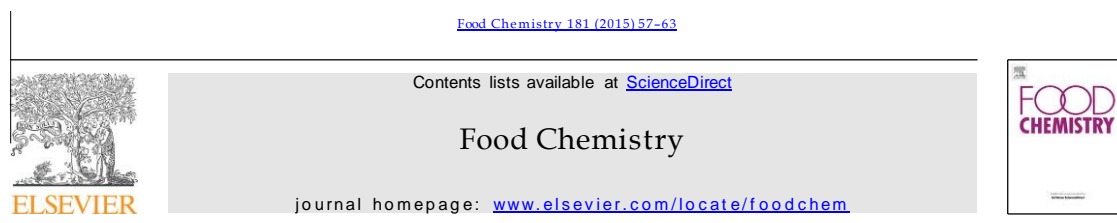
L'anàlisi de NSAIDS comporta treballar amb una família composta de moltes substàncies amb estructures químiques variades, i per tant, cal tenir en compte que alguns d'ells ionitzen en mode positiu, altres en negatiu i un petit grup en ambdós modes. El tema del canvi de polaritat en espectrometria de masses no és un tema menor, ja que és una característica dels equips instrumentals i convé que el temps requerit pel canvi de polaritat (polarity switching) sigui el més curt possible, donat que cal combinar aquests canvis amb l'elució dels diferents compostos de la columna cromatogràfica.

En els treballs d'anàlisi de NSAIDs revisats s'observa que la majoria d'autors utilitza sondes ESI, combinant els modes positiu i negatiu. Diferents autors proposen polaritats diferents pels anàlisis i el fet que s'obtingui major o menor resposta dels compostos en les diferents condicions sovint depèn de l'espectròmetre usat.

Pel que fa a la detecció amb espectrometria de masses, la majoria d'autors usa espectròmetres de baixa resolució; per exemple, Jedziniak et al [76] i de Nemoto [93] utilitzen un equip híbrid quadrupol-trampa (Q-Trap), Vinci [94], Igualada [77] o Gallo [88] utilitzen trampes d'ions i en altres casos [75, 78, 87, 95, 96, 97] els autors usen triples quadrupols. Hi ha també treballs publicats en què s'usa l'espectrometria de masses d'alta resolució, amb analitzadors Orbitrap [50, 62] o de temps de vol [98, 99].

4.2. Resultats

4.2.1. Publicació 1: "Determination of avermectins: A QuEChERS: approach to the analysis of food samples"



Analytical Methods

Determination of avermectins: A QuEChERS approach to the analysis of food samples



A. Rúbies ^{a,d,†}, S. Antkowiak ^b, M. Granados ^c, R. Companyó ^c, F. Centrich ^{a,d}

^a Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avinguda Drassanes 13-15, 08001 Barcelona, Spain

^b Strathclyde University, Department of Pure and Applied Chemistry, Thomas Graham Building, 295 Cathedral Street, Glasgow G1 1XL, United Kingdom

^c Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

^d CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

article info

Article history:

Received 18 January 2014

Received in revised form 26 January 2015

Accepted 14 February 2015

Available online 21 February 2015

Keywords:

Liquid chromatography

Mass spectrometry

Triple quadrupole

Quadrupole-orbitrap

Muscle samples

Avermectins

abstract

We present a simple method for extracting avermectins from meat, based on a QuEChERS approach followed by liquid chromatography (LC) coupled to triple quadrupole (QqQ) tandem mass spectrometry (MS/MS). The compounds considered are ivermectin, abamectin, emamectin, eprinomectin, doramectin and moxidectin. The new method has been fully validated according to the requirements of European Decision 657/2002/CE (EU, 2002). The method is suitable for the analysis of avermectins at concentration as low as 2.5 µg kg⁻¹, and allows high sample throughput. In addition, the detection of avermectins by high resolution mass spectrometry using a quadrupole-orbitrap (Q-Orbitrap) hybrid instrument has been explored, and the target Selected Ion Monitoring data dependent MS/MS (t-SIM-dd MS/MS) mode has been found to provide excellent performance for residue determination of target analytes.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Avermectins are macrocyclic lactones with high anthelmintic activity that are used in veterinary practice to control internal and external infection by parasite involving either larvae or adult forms. This family of chemotherapeutic agents includes ivermectin (IVE), abamectin (ABA), emamectin (EMA), eprinomectin (EPRI) and doramectin (DORA), which are fermentation products generated by the soil-dwelling bacteria *Streptomyces avermitilis*. Some avermectins are also employed as pesticides, and IVE is used in human medicine to treat diseases such as onchocerciasis and scabies.

IVE, ABA, EMA and EPRI are mixtures of compounds, named B_{1a} (over 80%) and B_{1b} (less than 20%); the B_{1a} compound has a 2-butyl radical in C₂₅, whereas the B_{1b} has an isopropyl group in the same position. On the other hand, moxidectin (MOXI) is a milbemycin, which is produced by the same organisms. Milbemycins are also anthelmintic agents and are chemically similar to avermectins, the main difference being the lack of a disaccharide moiety attached at the 13-position in milbemycins (Table 1).

Maximum residue limits (MRL) have been established by Commission Regulations 37/2010, 418/2014 and 1390/2014 (EU, 2010;

EU, 2014a, 2014b) for some avermectins in specific tissues (Table 1). Liquid chromatography (LC) with fluorimetric detection has traditionally been used to determine avermectins in animal tissues (Danaher, Howells, Crooks, Cerkvenik-Flajs & O'Keefe, 2006; Gianneti et al., 2011); since avermectins are not intrinsically fluorescent, a derivatisation step prior to the chromatographic analysis with trifluoroacetic anhydride and methyl-imidazole is usually performed.

Currently, liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (LC-QqQ-MS/MS) in the multiple reaction monitoring mode (MRM) is the technique of choice for confirmatory residue analysis (Hernando, Suárez-Barcelona, Bueno, García-Reyes, & Fernández-Alba, 2007; Inoue, Yoshimi, Hino, & Oka, 2009; Durden, 2007; Wang et al., 2011). Although some authors have reported the use of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) (Raich-Montiu, Krogh, Granados, Jönsson, & Halling-Sørensen, 2008), electrospray (ESI) is more sensitive and more used. Most avermectins show low ionization efficiency, and tend to form sodium adducts when using positive ESI, which provides poor linearity and poor fragmentation (Wang, 2011). Negative ESI is an alternative, although it has been reported that it offers less sensitivity than positive ESI (Durden, 2007; Danaher et al., 2006).

Although QqQ instruments are currently the workhorse of residue analysis laboratories, a new generation of high resolution MS (HRMS) instruments based on technologies such as time-of-flight (TOF) or Orbitrap are being introduced. These hybrid instruments,

[†] Corresponding author at: Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avinguda Drassanes 13-15, 08001 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934439400x216; fax: +34 93 441 35 24.

E-mail address: arubies@aspb.cat (A. Rúbies).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.067>

0308-8146/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anàlisi de residus de medicaments d'us veterinari

58

A. Rúbies et al. / Food Chemistry 181 (2015) 57–63

Table 1
Structure of avermectins and moxidectin and MRL values.

Compound	Marker residue	Animal species	MRL ^a (lg kg ⁻¹)	Tissue
Abamectin (ABA)	Abamectin B1a MW:830.05	Bovine Ovine	10 20 20 50 25 20	Fat Liver Muscle Fat Liver Kidney
Doramectin (DORA)	Doramectin MW:898.51	All mammals	40 150 100 60	Muscle Fat Liver Kidney
Emamectin (EMA)	Emamectin B1a MW:8886.20	Fish	100	Muscle and skin
Eprinomectin (EPRI)	Eprinomectin B1a MW:914.14	Bovine Ovine Caprine	50 250 1500 300 20	Muscle Fat Liver Kidney Milk
Ivermectin (IVER)	Ivermectin B1a MW:875.09	All mammals	30 100 100 30	Muscle Fat Liver Kidney
Moxidectin (MOXI)	Moxidectin MW:639.82	Bovine, ovine, equine Bovine ovine	50 500 100 50 40	Muscle Fat Liver Kidney Milk

^a = MRL = maximum residue limit.

which combine a quadrupole and a high resolution mass spectrometer, i.e. Q-TOF and Q-Orbitrap, are very attractive and can be considered as the high resolution equivalent of the QqQ instruments. In particular, Q-Orbitrap appears especially suitable for highly demanding residue analysis, as it can offer outstanding resolution and accuracy in addition to high sensitivity (Kumar et al., 2013).

In this article we present a high sample throughput method for the determination of avermectins in meat samples. The method is based on a QuEChERS extraction strategy, followed by LC-QqQ-MS/MS with negative ESI. Moreover the use of a Q-Orbitrap instrument is explored, and two detection modes are assayed, using positive and negative ionization modes.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Standards of IVE (95%), EMA (99.4%), MOXI (97.1%), EPRI (96.7%), DORA (95.4%) and selamectin (SELA) (99.5%) were obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). ABA (88%) was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Acetonitrile and methanol of HPLC quality were obtained from Fisher Scientific UK (Loughborough Leics, UK). Magnesium sulfate and triethylamine were obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Sodium chloride and ammonia were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Double deionized water (Milli Q, Millipore, Molsheim, France) of 18.2 MO cm^{-1} was used.

QuEChERS dispersive SPE kits containing 150 mg of C18 and 900 mg of MgSO_4 (ref 5982-4956), or 400 mg primary secondary amine (PSA), 400 mg of C18 and 1200 mg of MgSO_4 (ref 5982-5158) were obtained from Agilent Technologies (Lake Forest, CA, USA).

Individual stock solutions (1000 mg L^{-1}): 10 mg of each compound was weighed and dissolved in 10 mL of methanol using volumetric flasks and stored at -20°C for up to 1 year. An intermediate standard solution containing all analytes at a concentration of 20 mg L^{-1} was prepared and stored for up to 6 months. The working solutions were prepared in methanol at concentrations of 5 mg L^{-1} and 0.4 mg L^{-1} and stored for up to 3 months at -20°C .

Other solutions were prepared as follows:

Solution of 10 mM triethylamine (TEA): 700 μL of TEA were dissolved in 500 mL of double deionized water.

Reconstituting solvent: 50 mL of 10 mM TEA was mixed with 50 mL acetonitrile.

Whatman Mini-UniPrep PVDF filters (0.2 μm) with polypropylene housing from GE Healthcare UK Ltd., (Buckinghamshire, UK) were used to filter the extracts.

2.2. Instrumentation

HPLC-ESI-QqQ-MS/MS system: A Waters Alliance 2695 HPLC system (Manchester, UK) coupled to a Quattro Micro triple-quadrupole mass spectrometer from Micromass (Manchester, UK) equipped with an ESI source was used. The ESI was operated in negative mode under the following conditions: capillary voltage, 3.0 kV; source block and desolvation temperatures, 120°C and 400°C , respectively; desolvation and nebulizer gas (N_2) flow rates, 650 L h^{-1} and 50 L h^{-1} , respectively; argon pressure in the collision cell, 3.5×10^{-3} mbar. Instrument control and data processing were carried out using Masslynx 4.1 software. Nitrogen was obtained from a nitrogen generator Alphagaz N2 Flo (Air Liquide, Paris, France).

UHPLC-HESI-Q-Orbitrap system: A Thermo Accela UHPLC system coupled to a Maylab Switch column manager and a Thermo

high resolution Q Exactive mass spectrometer (Thermo, Bremen, Germany) were used. The chromatographic system was coupled to the MS with a Heated ESI Source II (HESI II). HESI II conditions were: spray voltage, 3.5 kV (positive ionization), 3 kV (negative ionization); sheath gas flow rate (N_2), 35 units; capillary temperature, 300°C ; S-lens RF level, 50; heater temperature, 350°C . Nitrogen obtained from a nitrogen generator Zefiro (Clantecnologica, Seville, Spain) was employed as both the collision and damping gas.

Mass calibration for Orbitrap was performed every three days to ensure a working mass accuracy lower than or equal to 5 ppm. Pierce LTQ Velos ESI Positive ion and Pierce LTQ Velos ESI Negative ion calibration solutions (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) were used to calibrate the mass spectrometer. Specific detection conditions are given in Section 2.4.2.

XCalibur 2.2 and Trace Finder 3.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) were used for UHPLC control and data processing, respectively.

Q-Exactive 2.0 SP 2 from Thermo Fisher Scientific was used to control the mass spectrometer.

An Agitax SRU-CP38 shaker (Cirta SL, Madrid, Spain), an Ultrasons-H ultrasonic bath (Selecta, Abrera, Barcelona, Spain), a Hettich refrigerated centrifuge (Tutlingen, Germany) and a Turbovap nitrogen evaporator system from Biotage (Uppsala, Sweden) were used.

2.3. QuEChERS extraction method

3 g of minced sample was mixed with 2 g of magnesium sulfate, 0.5 g of sodium chloride and 10 mL of acetonitrile containing 0.5% ammonia. After shaking for 1 min and sonicating for 5 min, samples were centrifuged and the extract was transferred to a dispersive tube containing 150 mg of C18 and 900 mg of magnesium sulfate. After shaking for 1 min, sonicating for 5 min, and centrifuging for 10 min (10°C , 3000 rpm), the organic layer was separated and evaporated under nitrogen at 45°C . Extracts were re-dissolved in 500 μL of a mixture of water and acetonitrile (50:50), filtered using filter vials (PVDF membrane; 0.2 μm pore size) and injected into the chromatographic system.

2.4. Liquid chromatography/mass spectrometry

2.4.1. HPLC-MS/MS (QqQ)

A Luna C18 column (50 mm \times 2.1 mm, 2.6 μm ; Phenomenex, Torrance, CA, USA) operated at 40°C was used for liquid chromatography. Extracts were kept at 15°C during storage in the autosampler. Mobile phases were 10 mM TEA aqueous solution (A) and acetonitrile (B). The gradient program (time (min), %B) was: (0, 55); (5, 90); (5.1, 55); (11, 55). The flow rate was 0.35 mL min^{-1} , and the injection volume 25 μL . The parameters of the multiple reaction monitoring (MRM) program for the QqQ mass spectrometer are provided in Table 2.

2.4.2. UHPLC-HRMS

HESI positive mode: Separation was achieved in gradient mode using a Kinetex C18 column (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) operated at 40°C . The mobile phases were 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B). The gradient program (time (min), %B) was: (0, 55); (5, 0); (8, 0); (8.5, 55); (13, 55). The flow rate was set at 0.25 mL min^{-1} and the injection volume was 5 μL . The parameters for the Q-Exactive mass spectrometer are provided in Table 3.

HESI negative mode: Separation was achieved in gradient mode using a Luna C18 column (50 mm \times 2.1 mm, 2.6 μm) operated at 40°C . Mobile phases were double deionized water (A) and acetonitrile (B). The gradient program (time (min), %B) was: (0, 55); (5,

Table 2
MRM parameters for HPLC-ESI⁺ QqQ-MS/MS.

Analyte	Molecular formula	Molecular weight	<i>t</i> _R ^a (min)	Precursor ion, [M-H] ⁻	Product ions	Cone voltage (V)	Collision energy (V)	Dwell time (s)
Ivermectin(B1a)	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄	875.09	6.96	874.0	108.9	40	45	0.2
					567.5	40	30	0.2
Abamectin(B1a)	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	873.00	5.40	871.5	565.2	30	30	0.2
					229.1	30	30	0.2
Emamectin(B1a)	C ₄₉ H ₇₅ O ₁₃	886.20	5.66	884.4	565.6	48	25	0.2
					242.1	48	25	0.2
Moxidectin	C ₃₇ H ₅₃ O ₈	639.82	6.80	638.1	528.5	42	25	0.2
					236.4	42	25	0.2
Eprinomectin(B1a)	C ₅₀ H ₇₅ O ₁₄	914.14	4.63	912.4	565.5	55	35	0.2
					270.4	55	35	0.2
Doramectin	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₄	898.51	6.11	897.5	229.1	38	35	0.2
					109.0	38	30	0.2
Selamectin (I.S.)	C ₄₃ H ₆₃ O ₁₁	769.96	6.90	768.1	722.7	48	25	0.2

^a *t*_R = retention time.

Table 3
High resolution mass spectrometry parameters in HESI⁺ and HESI⁻.

Compound	Ionization	<i>t</i> _R ^a (min)	Formula	Precursor ion	Precursor ion accurate mass (Da)	<i>m</i> _{err} (ppm)	Product ion accurate mass (Da)	NCI ^b (%)
Emamectin	HESI ⁺	1.33	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄	[M+H] ⁺	886.5305	0.6	158.1172	20
Eprinomectin		5.18	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	[M+H] ⁺	914.5255	0.6	186.1122	20
Abamectin		5.85	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₃	[M+Na] ⁺	895.4809	0.6	123.1168	50
Doramectin		6.46	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₄	[M+Na] ⁺	921.4965	0.6	149.1321	50
Moxidectin		6.57	C ₃₇ H ₅₃ NO ₈	[M+H] ⁺	640.3839	0.8	199.1116	20
Ivermectin		7.18	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄	[M+Na] ⁺	897.4964	0.7	153.0520	50
Emamectin	HESI ⁻	4.56	C ₄₉ H ₇₅ NO ₁₃	[M-H] ⁻	884.5169	0.8	242.1397	20
Eprinomectin		3.71	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄	[M-H] ⁻	912.5115	0.5	270.1348	20
Abamectin		4.38	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	871.4852	0.3	229.1079	20
Doramectin		4.97	C ₅₀ H ₇₄ O ₁₄	[M-H] ⁻	897.5013	0.4	229.1079	20
Moxidectin		5.51	C ₃₇ H ₅₃ NO ₈	[M-H] ⁻	638.3698	0.1	236.1653	20
Ivermectin		5.72	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄	[M-H] ⁻	873.5001	0.1	229.1079	20

^a *t*_R = retention time.

^b NCE = neutralized collision energy.

10); (5.1, 10); (11, 55). The flow rate was set at 0.35 mL min⁻¹, and the injection volume was 5 μ L.

Parameters for HRMS modes operation:

Full scan-all ion fragmentation (full MS/AIF) (HESI⁺ and HESI⁻): resolution (FWHM), 70000; AGC target, 10⁶; injection time, 250 ms; scan range, 100–1500 m/z.

Target selected ion monitoring data dependent- MS/MS (t-SIM-ddMS/MS) (HESI⁺ and HESI⁻): resolution (FWHM), 70000 for precursor ions and 35000 for product ions; AGC target, 10⁶ (precursor ions), 2–10⁵ (product ions); injection time, 250 ms (precursor ions), 120 ms (product ions); loop count, 3; multiplexing, 1; isolation width, 1.5 Da.

2.5. Calibration

To overcome the usual ion suppression or ion enhancement effects in MS detection, calibration was performed using surrogate matrix matched standards (SMMS). Thus, blank samples were spiked with the analytes at different concentrations, and 50 μ L of SELA solution (20 mg/L), which is used as internal standard (IS), was added; the total volume of solvent added while spiking and adding IS should not exceed 100 μ L. Afterward the SMMS were submitted to the whole analytical procedure; the calibration curves for each analyte were obtained by linear regression analysis of the peak areas relative to IS areas against concentration.

3. Results and discussion

3.1. LC-QqQ-MS/MS

First, in order to optimize the MS conditions and select the ions for each analyte, standard solutions of 4 mg L⁻¹ in methanol were infused into the mass spectrometer and the spectra were acquired using the ESI source operating in negative mode. A mobile phase consisting of 10 mM TEA aqueous solution: acetonitrile (1:1) was used. The presence of TEA in the mobile phase was necessary in order to achieve a good detection in ESI⁻. The optimal conditions for detection are given in Section 2.4.1. For all compounds the deprotonated molecular ion [M-H]⁻ was selected as the precursor ion, and two transitions of the precursor ion were also selected (Table 2). To achieve maximum sensitivity, the multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for quantification and confirmation. The most intense transition (in bold) was used for quantification, and the ion ratio for confirmation.

Although MS detection is very selective, it was convenient to achieve a good chromatographic separation, because as shown in Table 2 different analytes can provide the same product ion, which could lead to cross-talk problems. After optimization, a Luna C18 column (50 mm x 2.1 mm, 2.6 μ m) operating at 40 °C provided a proper separation of the set of analytes in 11 min, using 10 mM TEA aqueous solution and acetonitrile as mobile phases, with the gradient program reported in Section 2.4.1. These conditions were

suitable for ESI-. To avoid system contamination due to the use of a mobile phase containing TEA, 0.1% formic acid in water was passed through the chromatographic system overnight.

3.2. Optimization of QuEChERS extraction method

Several sample treatment approaches have been proposed for the analysis of avermectins in food samples. Acetonitrile is frequently used as extraction solvent (Danaher et al., 2006), and it yields quite good recovery values. Some users avoid the clean-up step by diluting the extract (Rudik, Cummings, & Poppenga, 2002; Kaufmann, Butcher, Maden, Walker, & Widmer, 2011), but some clean-up is frequently applied. Different approaches have been proposed, such as liquid-liquid extraction with n-hexane (Gianneti et al., 2011), solid phase extraction (SPE) with alumina and/or C18 (Hernando et al., 2007; Noppe, Verheyden, Vanden Bussche, Wille, & De Brabander, 2009; Wang, 2011), or dispersive SPE (d-SPE) using PSA or C18 (Kinsella et al., 2009; Lopes, Reyes, Romero-González, Frenich, & Vidal, 2012). The QuEChERS approach, i.e. the combination of an extraction using acetonitrile with a high salt content and clean-up using d-SPE, was adopted in this study, due to its simplicity and high throughput.

The first attempts to extract samples with acetonitrile containing magnesium sulfate and sodium chloride showed high variation of the internal standard response, i.e. SELA, which was attributed to a poor control of pH. When the extraction was performed with acetonitrile containing 0.5% ammonia, the variability was clearly reduced. Inoue et al. (2009) also reported satisfactory results for the extraction of avermectins under basic conditions.

For the clean-up step using d-SPE, C18 was compared with a mixture of C18 and PSA. The analytes behaved similarly in both systems, except in the case of DORA, for which recovery was higher with C18 than with C18 + PSA (Fig. S1. Supplementary data). Thus, from these experiments the conditions for the extraction and the clean-up steps were established as follows: (i) extraction with acetonitrile containing sodium chloride, magnesium sulfate and ammonia; (ii) clean-up using d-SPE with C18. Details of the procedure are provided in Section 2.3. Fig. S2 (Supplementary data) shows the MRM chromatograms for extracts from swine muscle spiked with all the analytes at $1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ and for blank swine muscle.

Extraction efficiency was evaluated from the analysis of swine meat samples spiked at three concentration levels (2.5, 40 and $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$). To determine absolute recovery values, the analytical responses obtained from samples spiked with the analytes before extraction were compared with those obtained from extracts spiked after extraction, just before LC injection. The results obtained were satisfactory, in the range 74–102%, as shown in Fig. 1.

3.3. Validation of the QuEChERS extraction and LC-QqQ-MS/MS method

Samples of bovine, ovine, porcine, rabbit and poultry meat were tested in order to investigate if there was any effect due to differences in the matrices. In Fig. S3 (Supplementary data) the response of SELA in different muscle species is shown. The percentage of relative standard deviation (RSD) was 10.5%, indicating that there was no species-specific effect, and thus they can be considered equivalent for quantification purposes. The other avermectins have a similar behavior. Therefore, a calibration curve is built for each compound and is used to quantify all muscle samples, irrespective of the animal species.

The proposed method was validated using swine muscle according to Decision 657/2002/CE (EU, 2002) rules. Specificity, linear range, precision (repeatability and reproducibility), trueness, decision limit (CCa) and detection capability (CCb) were determined.

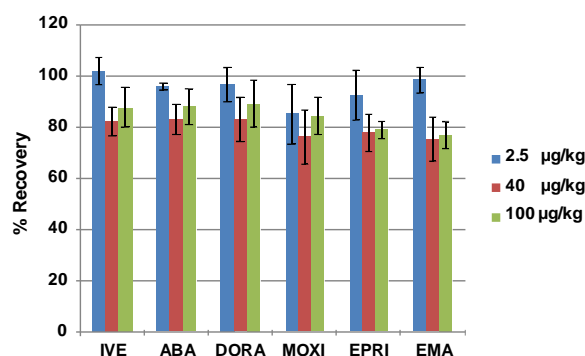


Fig. 1. Extraction absolute recovery rates determined from spiked swine tissues ($n = 3$).

Table 4
Validation results of the QuEChERS HPLC-QqQ-MS/MS method.

Analyte	Level ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Trueness (%)	Precision (RSD)
Ivermectin	2.5	100.1	10.8
	20	100.4	3.7
	40	99.2	5.7
	50	92.5	6.9
	100	103.8	8.7
Abamectin	150	96.2	6.2
	2.5	111.8	12.1
	20	103.7	8.9
	40	99.2	12.0
	50	93.4	10.4
Doramectin	100	102.2	10.8
	150	99.9	9.1
	2.5	114.9	12.6
	20	100.6	4.6
	40	98.5	4.1
Moxidectin	50	97.4	8.2
	100	105.5	14.1
	150	94.6	7.4
	2.5	108.0	8.3
	20	101.4	3.7
Eprinomectin	40	89.3	8.9
	50	96.2	8.7
	100	91.3	13.9
	150	90.7	11.5
	2.5	107.5	13.1
Emamectin	20	102.0	8.5
	40	96.5	11.4
	50	93.3	8.7
	100	102.2	17.3
	150	99.3	9.7
Emamectin	2.5	103.3	8.7
	20	97.4	8.1
	40	96.5	6.8
	50	94.5	6.9
	100	96.6	14.1
150	89.2	12.2	

Specificity was assessed by analysing blank muscle samples from veal, lamb, swine, rabbit and chicken. The absence of background peaks showing a signal-to-noise ratio higher than 3 at the retention times of the target compounds show that the method is free of endogenous interferences.

Samples spiked with decreasing concentrations from 10 to $1 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ were extracted to establish the lower limits of the method. The ion ratio confirmation criterion was considered to assess the limit, and $2.5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ was established as the quantification limit.

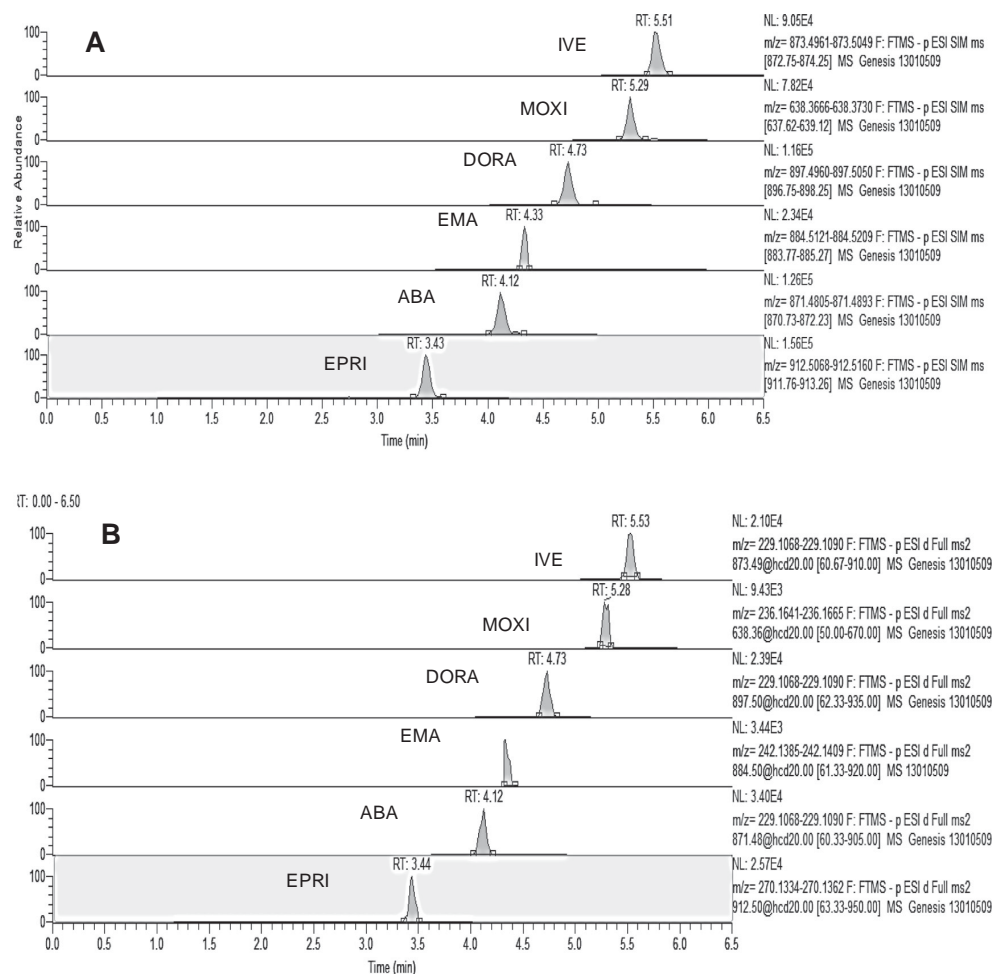


Fig. 2. t-SIM-dd MS/MS (HESI) precursor (A) and product (B) ions chromatograms from swine muscle spiked at $3 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Calibration curves were constructed for each compound using blank samples spiked with the analytes at 6 concentration levels, covering the range $2.5\text{--}150 \mu\text{g kg}^{-1}$. The linear regression analysis was carried out by plotting the peak area ratio of the analyte to IS against the analyte concentration. The calibration parameters showed good linearity with $r > 0.99$ and RSD of the response factors lower than 15%. For each point of the calibration curve, response factors were calculated as the ratio between the signal of the analyte (peak area of the analyte/peak area of the internal standard) and the corresponding concentration of the analyte.

Reproducibility was assessed by analysing 18 samples on 3 different days. Trueness was assessed by quantifying spiked samples against a SMMS calibration curve. The validation results for precision and trueness are given in Table 4.

Various approaches are applied to establish CC_a and CC_b . For permitted substances, the guidelines of the Decision 657/2002/CE are usually followed. In the case of forbidden substances, an extrapolation method (ISO, 1997) is proposed in Decision 657/2002/CE (EU, 2002). However, some authors have criticised this method, mainly because the estimated CC_a values might be too low, non-realistic (SANCO, 2004). Other approaches for forbidden substances have been proposed, such as that of Jülicher, Gowik, and Uhlig (1998), in which no extrapolation of the calibration

curve is performed. In this method CC_a is calculated from the response at the lowest point of the calibration curve and the corresponding standard deviation. This method leads to CC_a values within the calibration curves. This procedure is also described in the European Guidelines published in 2008 (SANCO, 2008).

In the present paper the guidelines of the Decision 657/2002/CE (EU, 2002) for a permitted substance were followed for DORA and IVER, which have MRL for swine muscle. For the analytes with no MRL in swine muscle, which are thus considered forbidden substances, the extrapolation method and that of Jülicher et al. were applied. Table S4 shows the values of CC_a and CC_b obtained. The extrapolation approach gives values between 2 and 5 times lower. These values have been checked routinely in the laboratory, when spiking and extracting samples at these concentration levels and can be considered realistic.

The whole performance of the method was evaluated by participating in four inter-laboratory exercises, organized by Fapas®. Corned beef samples containing IVER, DORA, MOXI and EPRI were analyzed, and excellent results were obtained, with Z-score values ranging from -1.1 to $+0.9$ (Table S5, supplementary data).

Around 20 samples per year were analyzed using the proposed method in 2013 and 2014. No positive results for the presence of avermectins were found.

3.4. UHPLC–HRMS analysis

Finally, we carried out a preliminary exploration to assess the performance of a Q-Orbitrap instrument using two working modes: full MS/AIF and t-SIM-dd MS/MS (Kumar et al., 2013). These working modes were evaluated both in positive and negative polarities. Chromatographic conditions were as explained in Section 2.4.2.

In full scan-AIF acquisition mode, the instrument does not use the quadrupole and all ions are fragmented. In tSIM-dd MS/MS, only the precursor ions in a list are monitored and fragmented. When HESI⁺ is used, [M+H]⁺ or [M+Na]⁺ adducts are selected as precursor ions. In HESI⁻, the [M-H]⁻ ions are monitored.

The Normalized Collision Energy (NCE) was optimized to obtain maximum response for the fragments of the analytes (Table 3).

Spiked samples in the range 3–150 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were extracted and injected in the chromatographic system. Detection was performed in full scan-AIF mode with both polarities. The positive mode showed good results for all analytes. Precursor and product ions were detectable in samples spiked at the lowest level, except the product ion for DORA, which was not detected below 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$. In HESI⁻, the full scan-AIF mode showed lower sensitivity, with the sample spiked at 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ being the lowest concentration at which precursor and product ions were detectable for all analytes.

The more selective working mode, tSIM-dd MS/MS, was also evaluated by injecting samples spiked within the same concentration range (3–150 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Using this working mode, precursor and product ions were detectable at 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$, with both positive and negative ionization. Fig. 2 shows the chromatograms obtained in HESI⁻ at 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for precursor (A) and product ions (B).

The possibility of reaching lower concentrations was further assessed by extracting samples spiked at 1, 0.7, 0.5, 0.3 and 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The results obtained showed that the positive mode was more sensitive than the negative one, and that presence of all analytes could be confirmed at 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. For some analytes (ABA, DORA), concentrations as low as 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ could be confirmed. Thus, in summary, the results obtained with t-SIM-dd MS/MS appear very promising in terms of sensitivity and selectivity, due to the features of the hybrid instrument Q-Orbitrap.

4. Conclusions

We have developed a sensitive high-throughput method for the determination of avermectins and moxidectin residues in meat samples. The method is based on a QuEChERS extraction and LC-QqQ-MS/MS with ESI in negative mode. The QuEChERS procedure enables a simpler approach than traditional methods.

Detection in the negative ESI mode is highly sensitive when using chromatographic mobile phases containing TEA, and analyte can be confirmed and quantified at concentrations as low as 2.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The method performs well at high and low concentrations, as demonstrated by the excellent results in inter-laboratory exercises. The method is currently in the scope of accreditation (ISO 17025) at the laboratory of Agència de Salut Pública de Barcelona. Moreover, the use of a hybrid Q-Orbitrap mass spectrometer, which can be considered a high resolution MS alternative to QqQ instruments, was explored in both positive and negative ionization modes. The acquisition mode t-SIM-dd MS/MS provides excellent results in terms of sensitivity, especially using positive ionization, and analytes can be successfully confirmed at 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ABA and DORA at 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$). This, in addition to the outstanding mass accuracy results, with errors of around 1 ppm, highlights the tremendous potential of this type of mass analyzer.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.067>.

References

- Danaher, M., Howells, L. C., Crooks, S. R. H., Cerkvenik-Flajs, V., & O'Keeffe, M. (2006). Review of methodology for the determination of macrocyclic lactone residues in biological matrices. *Journal of Chromatography B*, 844(2), 175–203.
- Durden, D. A. (2007). Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocides, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *Journal of Chromatography B*, 850(1–2), 134–146.
- EU (2002). Commission Decision 657/2002/CE of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. Official Journal of the European Union, 17.8.2002, L221/8.
- EU (2010). Commission Regulation (EU) 37/2010/CE of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Official Journal of the European Union, 20.1.2010, L 15/1.
- EU (2014a) Commission Implementing Regulation (EU) No 418/2014 of 24 April 2014 amending the Annex to Regulation (EU) No 37/2010 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin, as regards the substance “ivermectin”.
- EU (2014b) Commission Implementing Regulation (EU) No 1390/2014 of 19 December 2014 amending the Annex to Regulation (EU) No 37/2010, as regards the substance “eprinomectin”.
- Gianneti, L., Giorgi, A., Necci, F., Ferretti, G., Buiarelli, F., & Neri, B. (2011). Validation study on avermectin residues in foodstuffs. *Analytica Chimica Acta*, 700(1–2), 11–15.
- Hernando, M. D., Suárez-Barcelona, J. M., Bueno, M. J. M., Garcia-Reyes, J. F., & Fernández-Alba, A. R. (2007). Fast separation liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food. *Journal of Chromatography A*, 1155(1), 62–73.
- Inoue, K., Yoshimi, Y., Hino, T., & Oka, H. (2009). Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 32(21), 3596–3602.
- ISO (1997). ISO/IEC 11843-1 International Standard (1997). Capability of detection. Part 4: Methodology for comparing the minimum detectable value with a given value.
- Jülicher, B., Gowik, P., & Uhlig, S. (1998). Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation concept. *Analyst*, 123, 173–179.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., & Widmer, M. (2011). Quantification of anthelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 85(2), 991–1000.
- Kinsella, B., Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., Furey, A., & Danaher, M. (2009). New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 196–207.
- Kumar, P., Rúbies, A., Centrich, F., Granados, M., Cortés-Francisco, N., Caixach, J., et al. (2013). Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometer: Application to determination of synthetic hormones in animal urine. *Analytica Chimica Acta*, 780, 65–73.
- Lopes, R. P., Reyes, R. C., Romero-González, R., Frenich, A. G., & Vidal, J. L. (2012). Development and validation of a multiclass method for the determination of veterinary drug residues in chicken by ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 89, 201–208.
- Noppe, H., Verheyden, K., Vanden Bussche, J., Wille, K., & De Brabander, H. (2009). Detection of macrocyclic lactones in porcine liver, meat and fish tissue using LC-APCI-MS-MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 26(9), 1232–1238.
- Raich-Montiu, J., Krogh, K. A., Granados, M., Jönsson, J. Å., & Halling-Sørensen, B. (2008). Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fibre-supported liquid membrane extraction and liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187(1–2), 275–280.
- Rudik, L., Cummings, M. R., & Poppenga, R. H. (2002). Isolation and multiresidue detection of macrolide endectocides present in animal matrices. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 14(4), 295–302.
- SANCO (2004). SANCO 2004/2726. Conclusions of the Meeting on the Interpretation of the Implementation of Decision 2002/657/CE. Standing Committee of the Food Chain and the Animal Health, 16, November 2004.
- SANCO (2008). SANCO 2004/2726-rev 4-December 2008. Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC. URL http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/cons_2004-2726rev4_en.pdf. Accessed 12.12.2013.
- Wang, F., Chen, J., Cheng, H., Tang, Z., Zhang, G., Niu, Z., et al. (2011). Multi-residue method for the confirmation of four avermectin residues in food products of animal origin by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants*, 28(5), 627–639.

Determination of avermectins: a QuEChERS approach to the analysis of food samples

A. Rúbies^{a,d (*)}, S. Antkowiak^b, M. Granados^c, R. Companyó^c, F. Centrich^{a,d}

a. Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona. Avinguda Drassanes 13-15. 08001. Barcelona (Spain)

b. Strathclyde University. Department of Pure and Applied Chemistry. Thomas Graham Building. 295 Cathedral Street. Glasgow (United Kingdom). G1 1XL

c. Department of Analytical Chemistry. University of Barcelona. Martí Franquès 1-11. 08028. Barcelona (Spain)

d. CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid. Spain

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1. Clean-up of a muscle extract by d-SPE. Comparison of C18 and C18+PSA. Results are expressed as the peak area ratio $A_{\text{PSA+C18}}/A_{\text{C18}} \times 100$.

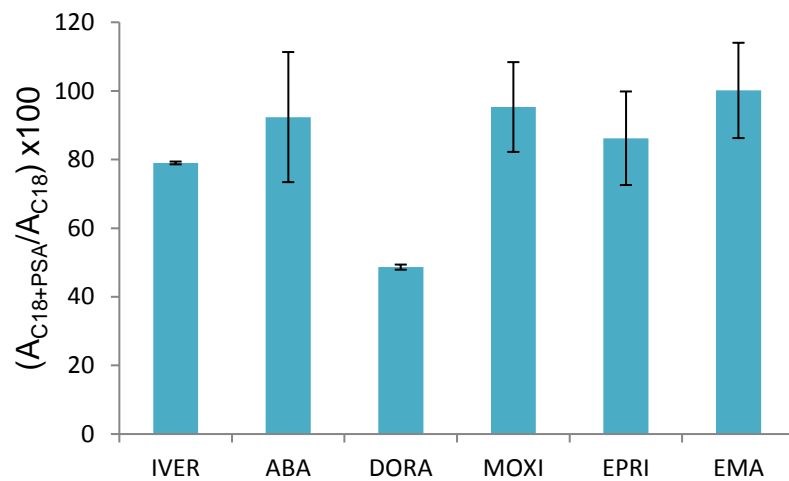


Figure S2. MRM chromatograms (HPLC-QqQ-MS/MS) of extracts from: (A) spiked swine muscle (1 µg kg⁻¹); (B) blank swine muscle.

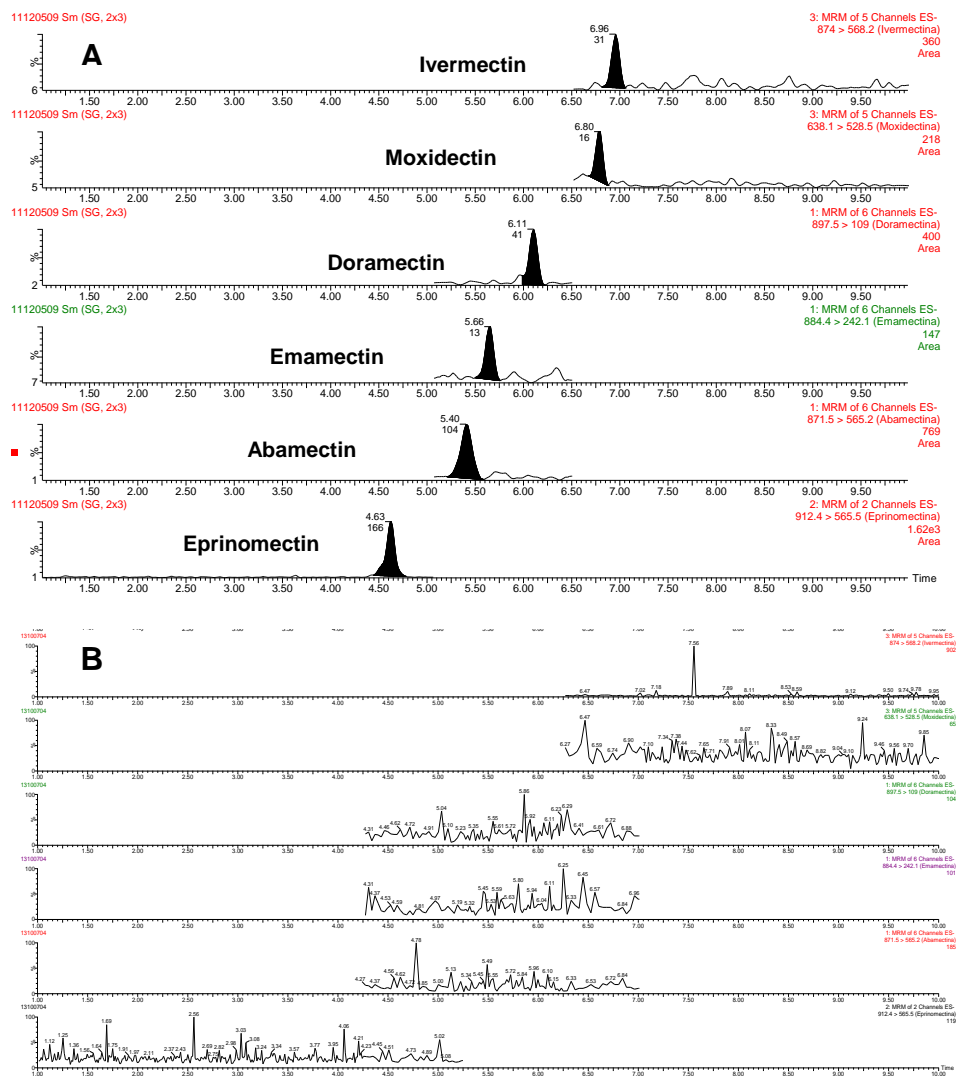


Figure S3. Selamectin peak area in extracts from muscles of different animal species spiked at 333.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

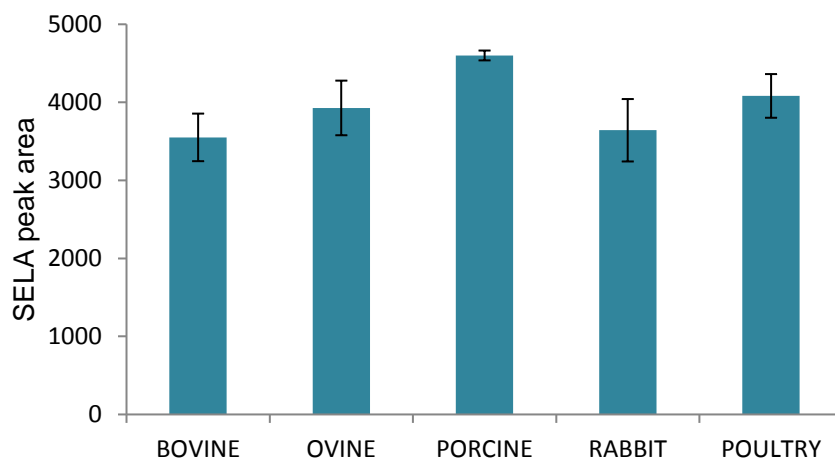


Table S4. CC α and CC β values calculated using different approaches

Analyte	Permitted compound		Forbidden compound (657/2002/UE)		Forbidden compound (Jülicher et al)	
	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Ivermectin	33.7	37.3				
Abamectin			0.65	0.76	3.53	3.55
Doramectin	46.7	53.3				
Moxidectin			2.91	3.01	6.16	6.20
Eprinomectin			2.22	2.33	5.86	5.91
Emamectin			1.62	1.72	4.39	4.41

Table S5. Results of the analysis of avermectines in corned beef by QuEChERS and HPLC-ESI-HPLC-QqQ MS/MS in FAPAS interlaboratory exercises.

Interlaboratory exercise	Analytes	Mean value (μgkg^{-1})	Results ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Z-score
FAPAS 02_175 (*)	IVER	26.3	21.6	-0.8
FAPAS 02_190	IVER	25	28.2	+0.6
	DORA	42.5	46.4	+0.4
FAPAS 02_212	IVER	24.2	25.2	+0.2
	DORA	5.1	3.9	-1.1
	MOXI	68.7	82.3	+0.9
FAPAS 02_234	IVER	28.7	26.1	-0.4
	EPRI	58.0	69.6	+0.9

(*) The sample also contained ABA. At the closing date of the exercise, the analyte was not fully validated, so the value was not submitted for evaluation.

4.2.2. Publicació 2: "High-throughput method for the determination of nitroimidazoles in muscle samples by liquid chromatography coupled to mass spectrometry"

Anal Bioanal Chem (2015) 407:4411–4421
DOI 10.1007/s00216-014-8436-x

RESEARCH PAPER

High-throughput method for the determination of nitroimidazoles in muscle samples by liquid chromatography coupled to mass spectrometry

A. Rúbies · G. Sans · P. Kumar · M. Granados ·
R. Companyó · F. Centrich

Received: 18 October 2014 / Revised: 16 December 2014 / Accepted: 18 December 2014 / Published online: 11 January 2015
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract We present a high-throughput confirmatory method for the analysis of 11 nitroimidazoles in muscle samples (metronidazole, MNZ; dimetridazole, DMZ; ronidazole, RNZ; tinidazole, TNZ; camidazole, CRZ; secnidazole semihydrate, SCZ; omidazole, ORZ; metronidazole-hydroxy, MNZ-OH; ipronidazole, IPZ; ipronidazole-hydroxy, IPZ-OH; and dimetridazole-hydroxy, HMMNI). Extraction with acetonitrile is efficient and simple, with the majority of recoveries ranging between 65 and 101 %, and without the need for clean-up of the extracts. The chromatographic analysis is performed using UPLC-QqQ-MS in the MRM mode, with an electrospray source operated in positive mode. Total chromatographic analysis time is 12 min. This method has been fully validated in muscle according to Decision 657/2002/CE guidelines, and the CC α values obtained were in the range of 0.04–0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. The method is currently used for the analysis of muscle samples and has been tested in other matrices of animal origin, such as kidney, retina and egg, with excellent results.

Keywords Liquid chromatography · Mass spectrometry · Triple quadrupole · Nitroimidazoles · Food samples

Published in the topical collection on *Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis* with guest editors Siska Croubels, Els Daeseleire, Sarah De Saeger, Peter Van Eenoo, and Lynn Vanhaecke.

A. Rúbies (✉) · G. Sans · P. Kumar · F. Centrich
Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona,
Avinguda Drassanes 13-15, 08001 Barcelona, Spain
e-mail: arubies@aspb.cat

G. Sans · P. Kumar · M. Granados · R. Companyó
Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona,
Martí Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

A. Rúbies · F. Centrich
CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP),
Madrid, Spain

Introduction

Nitroimidazoles are a group of compounds with therapeutic effects against some diseases caused by protozoans and anaerobic bacteria; they are effective against amoebiasis, giardiasis and trichomoniasis. They can also prevent histomoniasis and coccidiosis in poultry, as well as hemorrhagic enteritis in pigs. However, these compounds have significant adverse effects: for example, MNZ (see Table 2 for definition of nitroimidazole acronyms) has been shown to be mutagenic in some strains of bacteria. In addition, nitroimidazoles are rapidly metabolised by oxidation of the imidazole ring side chain at C2, giving hydroxy-derivatives, which have shown even higher mutagenic activity in bacterial assays [1].

Because of their side effects and their potential carcinogenic and mutagenic effects, the use of some nitroimidazole compounds, namely MNZ, DMZ and RNZ, has been banned in the EU for food-producing animals [2]. For the remaining compounds in this group, no maximum residue limit (MRL) has been established, and they are therefore considered as banned substances [3]. Thus, laboratories need to be able to detect and confirm nitroimidazoles and their hydroxy derivatives at low concentrations.

In practice, the Community Reference Laboratories (CRLs) in the EU recommend that official control laboratories should be able to monitor forbidden substances such as RNZ, DMZ, MNZ and their hydroxy-metabolites as residue markers at 3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Following these recommendations, the matrices to be tested are plasma, serum, retina, eggs, muscle, milk and honey [4].

Both screening and confirmatory approaches for the analysis of nitroimidazoles in food samples have been reported in the literature (Table 1).

The use of optical biosensors has been proposed for screening purposes [5], whereas the presence of nitroimidazoles in

Table 1 Summary of analysis methods for nitroimidazoles

Matrix	Analytes	Extraction solvent	Clean-up	Separation detection	Quality parameters	Ref.
Kidney, liver, serum, egg, milk	DMZ, RNZ, IPZ, MNZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH	ACN	Microcentrifugation	Biosensor analysis	<1 µg kg ⁻¹	[5]
Poultry, porcine tissues	DMZ, MNZ	Toluene	SPE (amino)	GC-ECNI-MS	LC=1.54–5.00 µg kg ⁻¹	[8]
Egg	DMZ, IPZ, MNZ, RNZ, TNZ, MNZ-OH, IPZ-OH, HMMNI	Buffered trichloroacetic acid 2.5 %	SPE (RP-cation exchange)	UPLC-MS/MS	CCα=0.19–2.62 µg kg ⁻¹	[9]
Egg, muscle	DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH	ACN–NaCl ethyl acetate–0.5 MKH ₂ PO ₄	SPE (polymeric)	HPLC-MS/MS	CCα=0.07–0.36 µg kg ⁻¹	[10]
Muscle	DMZ, RNZ, MNZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH	Ethyl acetate	–	HPLC-MS/MS	CCα=0.29–0.44 µg kg ⁻¹	[11]
Kidney	DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH	Ethyl acetate	SPE (polymeric-SCX)	UPLC-MS/MS	LC=0.1–0.5 µg kg ⁻¹	[12]
Honey, milk	DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH, TRZ (a) ORZ, CRZ, TNZ	ACN–NaCl	Hexane partition	LC-MS/MS	CCα=0.41–1.55 µg kg ⁻¹	[13]
Muscle	DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, HMMNI, IPZ-OH	0.2 M HCl	SPE (polymeric)	LC-MS/MS	LD=0.02–0.2 µg kg ⁻¹	[14]
Muscle, honey, plasma egg, milk, feed	MNZ, RNZ, DMZ, MNZ-OH, HMMNI	ACN, 0.1 % formic acid	SPE (polymeric)	LC-MS/MS	CCα=0.05–0.1 µg kg ⁻¹	[15]
Egg	MNZ, RNZ, DMZ, IPZ, DMZ-OH, MNZ-OH, HMMNI	ACN	MIP ³ , ^a	LC-MS/MS	CCα=0.14–0.73 µg kg ⁻¹	[16]
Egg	DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH, TRZ, ORZ, CRZ, TNZ	ACN–NaCl	Hexane partition	LC-MS/MS	CCα=0.33–1.26 µg kg ⁻¹	[17]
Muscle, plasma, egg	DMZ, RNZ, MNZ, IPZ, MNZ-OH, DMZ-OH, IPZ-OH	ACN, Na ₂ SO ₄	SPE (SCX)	LC-MS/MS	CCα=0.05–0.44 µg kg ⁻¹	[18]
Honey	MNZ, RNZ, DMZ, TNZ	Water	SBSE	HPLC-DAD	LC=1.5–5 µg kg ⁻¹	[19]

TRZ ternidazole, SBSE stir bar sorptive extraction

^a Molecularly imprinted solid-phase extraction

food samples must be confirmed using mass spectrometry (MS) detection [6, 7], in accordance with European legislation. Although nitroimidazoles are polar molecules, and thus quite difficult to determine by gas chromatography (GC), a few number of methods based on GC-MS have also been developed [8].

Currently, most confirmatory methods are based on the use of liquid chromatography (LC) with tandem MS detectors, mainly triple quadrupoles (QqQ) [9–18]. Regarding ionisation modes, it has been reported that electrospray (ESI) and atmospheric pressure chemical ionisation (APCI) sources provide similar results in terms of analytical responses and limits [10]. However, ESI operated in positive mode is the most common ionisation system for nitroimidazoles [9, 11–15, 18].

In order to extract nitroimidazoles from biological matrices, various strategies using a variety of organic solvents have

been developed, the most common being acetonitrile [10, 13, 18], followed by ethyl acetate [11, 12]. When reviewing the clean-up step, some authors use liquid–liquid partition with hexane [13, 17], but solid-phase extraction (SPE) using different sorbents is the method of choice for many authors: hydrophilic–lipophilic balance reversed-phase polymeric sorbents are most commonly used [10, 14] and, rarely, mixed mode polymeric reversed-phase combined with cation exchange [9].

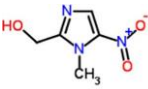
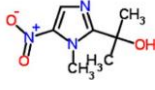
Alternative approaches, including more specific stationary phases such as molecularly imprinted polymers [16] or bar sorptive extraction [19], have also been proposed. Finally, some authors omit the clean-up step [11], a highly attractive option for laboratories with large workloads provided that the performance of the LC-MS instrumentation is not compromised.

In this article, we present a high sample throughput method without a clean-up step for the analysis of 11 nitroimidazoles and related compounds in meat samples. Table 2 shows the structure of the analytes. DMZ and RNZ have a common HMMNI. MNZ is metabolised to MNZO_H and IPZ is metabolised to IPZ-OH [9]. For the rest of analytes, which

Table 2 Structure and molecular formulae of nitroimidazoles

Compound	Acronym	Structure	Molecular formulae
Dimetridazole	DMZ		C ₅ H ₇ N ₃ O ₂
Iprnidazole	IPZ		C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂
Metronidazole	MNZ		C ₆ H ₉ N ₃ O ₃
Ornidazole	ORZ		C ₇ H ₁₀ N ₃ O ₃ Cl
Ronidazole	RNZ		C ₆ H ₈ N ₄ O ₄
Secnidazole	SCZ		C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₃
Tinidazole	TNZ		C ₈ H ₁₃ N ₃ O ₄ S
Carnidazole	CRZ		C ₈ H ₁₂ N ₄ O ₃ S
Metronidazolehydroxy	MNZ-OH		C ₆ H ₉ N ₃ O ₄

Table 2 (continued)

Dimetridazolehydroxy	HMMNI		$C_5H_7N_3O_2$
Ipronidazolehydroxy	IPZ-OH		$C_7H_{11}N_3O_3$

are also metabolised in the liver and excreted in urine [1], no commercially available standards of these metabolites have been found and therefore are not included in the present study.

Experimental

Chemicals and reagents

Standards of MNZ (99.8 %), DMZ (99.9 %), RNZ (99 %), TNZ (99.7 %), CRZ (99.8 %), SCZ semihydrate (99.6 %), ORZ (100 %), MNZ-OH (99.3 %), IPZ (99 %), IPZ-OH (99.8 %), dimetridazol-D₃ (DMZ-D₃) (99.9 %) and ipronidazol-D₃ (IPZ-D₃) (99.7 %) were obtained from Sigma-Fluka-Aldrich (Seelze, Germany); IPZ (99 %) and HMMNI (98.5 %) were obtained from Dr.Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

High-performance liquid chromatography (HPLC)-quality acetonitrile and methanol were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Double deionised water (Milli Q, Millipore, Molsheim, France), 18.2 MΩ cm⁻¹, was used.

Standard solutions were prepared as follows: For individual stock solutions (1000 mg L⁻¹), 10 mg of each compound was weighed and dissolved in 10 mL of methanol using volumetric flasks and stored at -18 °C for up to 1 year. An intermediate standard solution was prepared individually in acetonitrile at a concentration of 20 mg L⁻¹ and stored for up to 6 months at -18 °C. The working solution of each analyte was prepared in acetonitrile at a concentration of 2 mg L⁻¹ and stored for up to 3 months at -18 °C.

Internal standards were prepared as follows: For individual stock solutions (1000 mg L⁻¹), 10 mg of each compound was weighed and dissolved in 10 mL of methanol using volumetric flasks and stored at -18 °C for up to 1 year. An intermediate standard solution was prepared individually in acetonitrile at a concentration of 20 mg L⁻¹ and stored for up to 6 months at -18 °C. The working solution was prepared in acetonitrile at concentration of 0.2 mg L⁻¹ and stored for up to 3 months at -18 °C.

Anhydrous magnesium sulphate was obtained from VWR (Darmstadt, Germany). Sodium chloride, sodium acetate and

potassium hydroxide were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Lichroprep RP-18 (25–40 μm) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and dispersive Bondesil SPE primary-secondary amines (PSA) 40–100 μm was obtained from Varian (currently Agilent Technologies, New Castle, USA).

Whatman Mini-UniPrep PVDF filters with polypropylene housing (0.2 μm) from GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK) were used to filter the samples.

Instrumentation

We used a Waters Acquity UPLC system (Manchester, UK) with a binary pump coupled to a Quattro Premier QqQ mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with an ESI source. All solvents for UPLC operation were filtered through a 0.22-μm filter.

The electrospray ionisation source was operated in positive mode under the following conditions: capillary voltage, 3.0 kV; source block and desolvation temperatures, 120 and 400 °C, respectively; desolvation and nebuliser gas (N₂) flow rates, 650 and 50 L h⁻¹, respectively; and argon pressure in the collision cell, 4 × 10⁻³ mbar. Instrument control and data processing were carried out using Masslynx 4.1 software. Nitrogen was obtained from an Alphagaz N2 Flo nitrogen generator (Air Liquide, Paris, France).

A Hettich refrigerated centrifuge (Tuttlingen, Germany) and a Turbovap LV nitrogen evaporation system from Biotage (Uppsala, Sweden) were used.

An Agytax (Cintra, Spain) mixer was used for vertical mixing, and an ultrasonic bath from Selecta (Barcelona, Spain) and Genius 3 (Ika, Germany) was used for vortex type shaking.

Extraction method

Three grams of minced sample was weighed in a polypropylene tube; internal standard mixture (75 μL of 0.2 mg L⁻¹) was added, and samples were allowed to stand for 30 min. Ten millilitres acetonitrile was then added to all samples as the extraction solvent. After vortexing (1 min), tubes were placed

in an ultrasonic bath (5 min) and centrifuged (3500 rpm, 10 min, 15 °C). The supernatant was transferred to conical glass tubes and evaporated under a N₂ stream at 50 °C. Evaporation residues were reconstituted in 1 mL of double deionised water, filtered using Mini-UniPrep vials and injected into the chromatographic system.

Liquid chromatography/mass spectrometry

A Kinetex XB-C₁₈ (100×2.1 mm) column, 1.7 μm particle diameter, from Phenomenex (Torrance, CA, USA) was used at 40 °C for liquid chromatography. Samples were stored at 15 °C. Flow rate was 0.3 mL min⁻¹. A mobile phase consisting of a mixture of 0.1 % formic acid aqueous solution (A) and acetonitrile containing 0.1 % formic acid (B) was used with the following gradient program (time (min), %A): (0, 100), (6.11, 75), (6.26, 5), (9.5), (9.3, 100) and (12, 100). The injection volume was 10 μL. The parameters of the multiple reaction monitoring method (MRM) for the QqQ mass spectrometer are provided in Table 3.

Calibration

Calibration was performed using surrogate matrix matched standards (SMMS) at five concentration levels in the range of 0.5–10 μg kg⁻¹, according to the recommendation of the Codex Alimentarius Commission [20]. To do so, samples previously found to be free of nitroimidazole residues are spiked with various volumes of standard to obtain SMMS with increasing concentrations. Subsequently, both SMMS and the samples are spiked with the internal standard mixture (75 μL of 0.2 mg L⁻¹) and left for contact during 30 min before extraction.

Results and discussion

Optimisation of mass spectrometry detection

European regulations require at least four identification points to confirm the presence of forbidden substances in food samples. These four points can be obtained when using a QqQ mass spectrometer if two product ions from each target molecule are monitored. In order to obtain these two product ions, the working conditions must be optimised; thus, individual solutions of the standards at a concentration of 2 mg L⁻¹ in methanol were infused mixing them with a mobile phase (water–acetonitrile, 1:1, containing 0.1 % formic acid). The optimal conditions for the mass spectrometer were as follows: source temperature, 120 °C; desolvation temperature, 400 °C; desolvation gas flow, 650 L h⁻¹; and cone gas flow, 50 L h⁻¹. Optimal conditions for cone voltage and collision energy, as well as the quantification and confirmation transitions for each analyte, are shown in Table 3. Other mass spectrometry conditions such as dwell time were also optimised.

Optimisation of chromatographic conditions

Although MS/MS detection is highly selective, for some analytes, it was necessary to achieve a good chromatographic separation since different analytes can provide the same product ion (i.e. SCZ, ORZ and MNZ; Table 3), which could lead to cross-talk problems.

Two different chromatographic columns were assayed: Waters Acquity BEH C₁₈ and Phenomenex Kinetex C₁₈, both with the same dimensions (100×2.1 mm) and particle diameter (1.7 μm). The stationary phases show substantial differences: The former is based on porous silica, while the latter includes core–shell particles covered with porous silica, both containing C₁₈ chains.

Table 3 MRM parameters for UPLC-MS/MS (product ions in italics used for quantitation purposes)

Analyte	Rt (min)	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion ₁ (<i>m/z</i>)	Product ion ₂ (<i>m/z</i>)	Cone voltage (V)	CE ₁ (V)	CE ₂ (V)	Dwell time (s)
MNZ-OH	2.63	188	<i>126</i>	123	25	15	15	0.2
HMMNI	2.98	158	<i>140</i>	55	25	11	17	0.1
MNZ	3.07	172	<i>128</i>	82	22	15	23	0.1
DMZ-D3	3.33	145	<i>99</i>	–	28	15	–	0.1
DMZ	3.38	142	<i>96</i>	81	20	15	22	0.1
RNZ	3.38	201	<i>140</i>	55	18	12	20	0.1
SCZ	4.08	186	<i>128</i>	82	20	15	25	0.25
TNZ	4.53	248	<i>121</i>	82	33	15	33	0.25
IPZ-OH	5.07	186	<i>168</i>	122	25	13	20	0.1
ORZ	5.22	220	<i>128</i>	82	30	15	28	0.1
IPZ-D3	6.32	173	<i>127</i>	–	35	16	–	0.2
IPZ	6.38	170	<i>124</i>	109	35	17	25	0.2
CRZ	6.77	245	<i>118</i>	75	15	10	30	0.25

The mobile phase was a mixture of 0.1 % formic acid in water (A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (B), and various gradient programs were assayed. Figure 1 shows the separation achieved by the columns tested in their optimal working conditions.

RNZ and DMZ could not be separated by any of the columns or assay conditions tested (Fig. 1), so separation of these compounds must be based on mass differences. The Kinetex column showed better results in terms of efficacy and led to a better separation of IPZ-OH and ORZ. The remaining compounds were correctly separated in both columns. Further work was performed using the Kinetex column, according to the procedure described in "Liquid chromatography/mass spectrometry".

Optimisation of the extraction method

The QuEChERS strategy [21] was investigated to establish a simple method of analysis. This strategy is based on extraction, usually with acetonitrile, in the presence of salts, and a clean-up step based on a dispersive SPE (d-SPE). The following issues to be optimised were investigated: the solvent used

in the extraction step (ethyl acetate, acetonitrile and 1 % formic acid in acetonitrile), the shaking process (ultrasonic bath and mechanical shaking), the addition of salts (magnesium sulphate, sodium chloride, sodium acetate, in different percentages), and finally the solid phases used in the d-SPE (C₁₈ and PSA). All experiments were carried out in triplicate. To determine absolute recoveries, concentration results obtained from samples spiked before extraction were compared with those of extracts from blank samples spiked before injection into the UPLC system, which contained the equivalent concentration of analytes.

Regarding the extraction solvent, the mixture of acetonitrile and 1 % formic acid was rejected because cloudy extracts were obtained. Figure 2 shows the absolute recoveries achieved for all analytes using acetonitrile and ethyl acetate. Acetonitrile provided the best results, with extraction recoveries in the range of 52–89 %.

Regarding the shaking systems, no significant differences were observed between sonication in the ultrasonic bath for 5 min and mechanical shaking for 5 min. Further experiments were performed with acetonitrile as the extracting solvent and sonication.

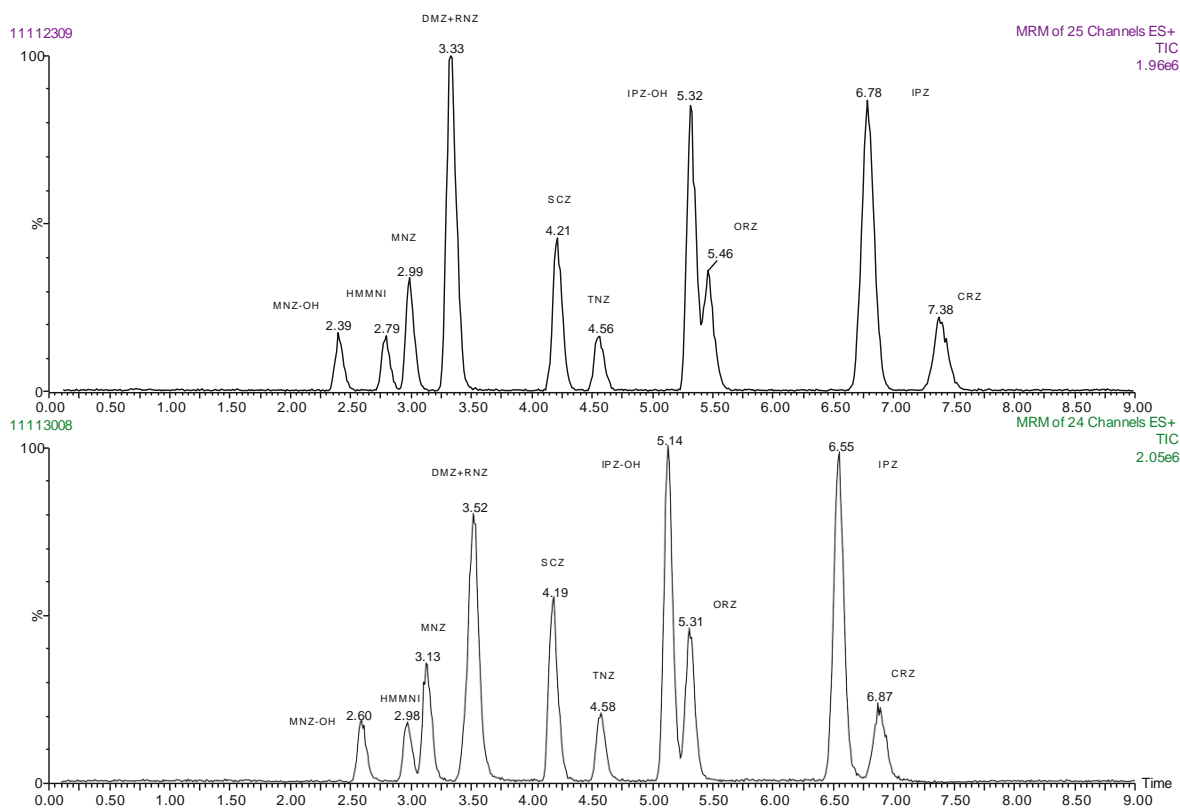
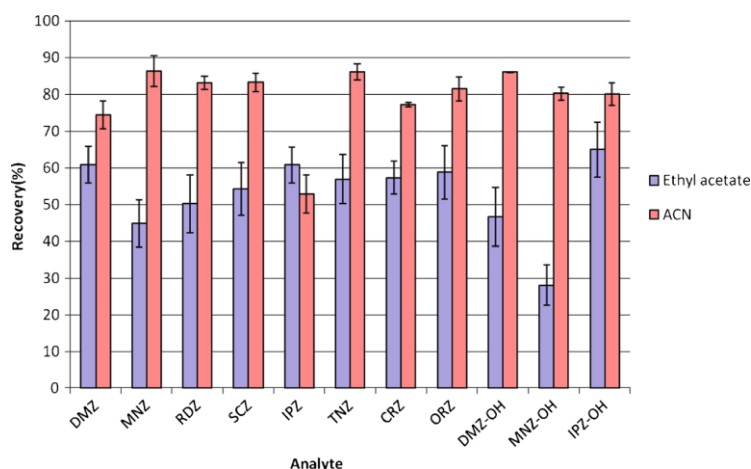


Fig. 1 Separation of a mixture of standards (0.2 mg L⁻¹, 2 µL) achieved by the BEH C₁₈ column at 0.4 mL min⁻¹ (top) and the Kinetex XB-C₁₈ column at 0.3 mL min⁻¹ (bottom)

Fig. 2 Nitroimidazoles extraction recoveries from muscle samples



We evaluated the use of MgSO₄ to eliminate water content from the sample and NaCl to improve phase separation in the extraction step, as well as the use of C₁₈ and PSA in the clean-up step (Table 4).

In these experiments, all analytes showed similar behaviour, and results can be summarised as follows:

(a) Extraction step: The effects of using NaCl or MgSO₄ can be evaluated by comparing experiments 7 and 8. Both salts gave similar recoveries, although the use of NaCl seemed to improve recoveries slightly. The use of sodium acetate (experiment 10) did not improve any of the recoveries tested. In general terms, lower salt concentration

in the extraction step improved recoveries, and the best results were obtained when no salts were used at all (i.e. compare experiment 4 with 6 and 13). Finally, a compromise decision was taken to eliminate all salts from the extraction step in order to simplify the extraction method.

(b) Dispersive clean-up step: Recovery was affected by the chemicals used in the dispersive clean-up step. The effects of using C₁₈ or PSA can be evaluated by comparing experiments 1 and 2. The use of PSA gave slightly better recoveries than C₁₈ (experiment 9 vs 12). Using a mixture of both did not result in better recoveries (experiment 2 vs 3). Finally, based on the results of experiment 13, and in the context of the results of all of the other

Table 4 Experiments carried out to optimise extraction and clean-up, and recovery results for the representative analytes

Experiment	Extraction		Clean-up ^b		Recovery (%)										
	NaCl (g)	MgSO ₄ (g)	C ₁₈	PSA	DMZ	MNZ	RDZ	SCZ	IPZ	TNZ	CRZ	ORZ	HMMNI	MNZ-OH	IPZ-OH
1	1	4	Y	-	37.2	40	40.5	40.1	37.6	42.3	40.9	41.4	39.4	36.5	40.4
2	1	4	-	Y	54.6	59.8	62	60.1	50.5	59.5	53.2	58.1	57.9	57.4	60.2
3	1	4	Y	Y	26.7	29.1	32.3	31.4	25.5	31.1	20.9	29.9	28.5	27.9	30.3
4	1	4	-	-	60.1	59	63.8	63.7	59.7	65.2	62	64	60.5	57.5	63.6
5	0.3	1.2	-	-	74.9	82.3	81.4	81.8	70	85.6	60.7	83	81.2	76	81.2
6	0.3	1.2	-	Y	63.8	69	68.6	69	64.4	69.9	70.1	69.6	69.5	64.3	68.3
7	0.3	-	-	-	83.8	85.3	87.9	88.9	84.2	90.4	91.5	90.5	95.8	78.6	89.4
8	-	1.2	-	-	80.3	76.7	78.5	78.8	76.1	80.1	80.1	79.9	78.5	73	79.3
9	0.3	-	-	Y	59.3	73.6	71.3	68.5	57.3	78.2	83.4	84.2	66.4	63.6	70.8
10	-	- ^a	-	Y	51.3	64.8	64.4	67.6	42.9	75	61.5	71	64.6	49	68
11	0.3	-	Y	Y	62.4	78.6	78.9	77.2	54.2	86.2	75.2	79.8	79.1	70.4	75.5
12	0.3	-	Y	-	53.1	61.2	56.5	57.3	44.9	58.7	39.2	56.1	59.7	54.7	56.4
13	-	-	-	-	74.5	86.3	83	83.2	52.8	86.1	77.2	81.5	86	80.2	80.1

^a Sodium acetate was used instead of magnesium sulphate in experiment no. 10

^b Yyes

experiments, we considered elimination of the clean-up step as the most appropriate option, which also greatly simplifies the analytical method.

Thus, the final method consisted of extraction without salts and without a dispersive clean-up step. Acetonitrile extracts are simply evaporated to dryness under a nitrogen stream in a thermostatic bath at 50 °C, re-dissolved in water and filtered. The pellet remains insoluble, but this does not affect the recovery of nitroimidazoles. The aqueous solution is then injected into the LC system.

In addition to the recovery study, it was considered important to monitor ion suppression or enhancement, since the optimised procedure does not include clean-up. To do so, the response of a set of standards in solvent was compared to the response of standards spiked over extracted meat samples (Fig. 3). From this analysis, we conclude that there is no significant ion suppression, except for RNZ, for which an ion suppression of 9 % was observed. Thus, this very simple procedure provides extracts free from matrix effects.

Having established the most appropriate analytical strategy, meat samples from various species were tested, namely swine, lamb, veal, chicken and rabbit. No significant difference was found between these samples, except for veal, for which extraction recoveries were lower for most analytes (Fig. 4).

We also compared the responses of the internal standards in samples from different species. The relative standard deviation (RSD%) of the response between different species was 14 % for IPZ-D3 and 6 % for DMZ-D3. In conclusion, no significant differences were observed between the species tested.

Thus, for routine control, a single calibration with SMMS can be used for the analysis of nitroimidazoles in muscle samples from different species, with the exception of veal.

This method was also tested in other types of samples of animal origin, such as swine kidney, liver and retina. Similar results were observed for all matrices except liver (Fig. 5), which is one of the most difficult matrices to analyse due to its composition.

These results are consistent with those obtained in previous studies, such as that performed by the Community Reference Laboratory for nitroimidazoles in Berlin (Germany) [22]. These authors showed that species and matrix type had little influence on measurement and that they seemed to be commutable.

Validation of the method

The extraction method was fully validated in swine muscle according to 657/2002/EU [10] Decision rules, and the following parameters were tested: linearity, extraction recovery, intermediate precision, trueness, selectivity, limit of decision (CC α) and detection capability (CC β).

Nitroimidazole standard solutions of 50, 200 and 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ were used to prepare SMMS by spiking swine meat blank samples, which were subsequently extracted and analysed by UPLC-MS/MS.

Linearity Calibration curves for each compound were constructed using SMMS in the range of 0.5–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The correlation coefficient and point-to-point deviation (in per cent, with respect to the theoretical value) were used to evaluate linearity. Linear regression was carried out by plotting the peak area ratio of the analyte and IS against the analyte's concentration. Good linearity was obtained for all analytes: Correlation coefficients were higher than 0.9972, while residuals were below 25 % at the lowest concentration

Fig. 3 Ion suppression/enhancement study. Comparison of standards in solvent to standards extracted from meat samples

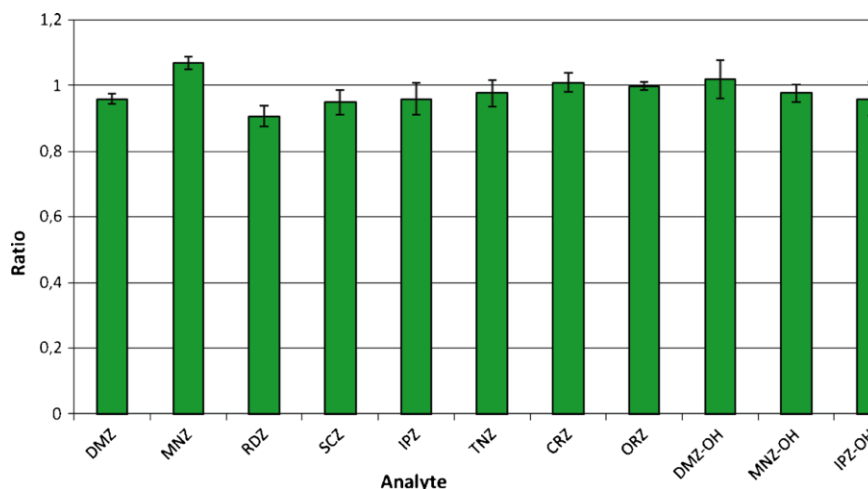
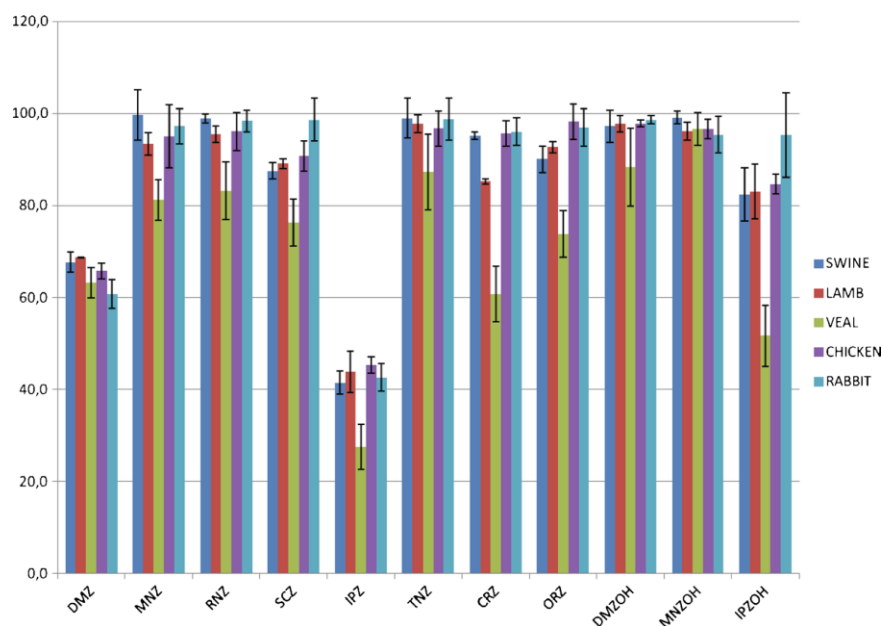


Fig. 4 Comparison of the extraction recovery for muscle samples from various species



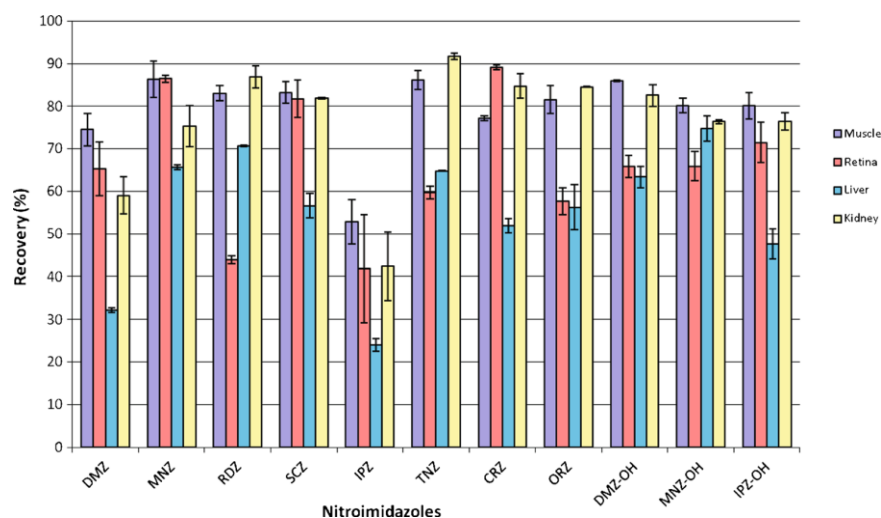
(0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and below 15 % for higher calibration concentrations.

Extraction recovery Samples spiked with nitroimidazole standards between 0.5 and 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were analysed as described in “[Optimisation of the extraction method](#)” on three different days. For most compounds, extraction absolute recovery was >80 %, except for DMZ (68 %) and IPZ (42 %), and absolute recovery reproducibility was good, as shown in Table 5. Although extraction recovery for IPZ was low, it was reproducible (RSD<6 %) and not concentration dependent.

Intermediate precision The study was performed at five concentration levels over 6 days. Three spiked samples were analysed daily at each concentration level. Results were evaluated in terms of relative standard deviation (RSD%). RSD% ranged between 3.7 and 17.9 % and was lower than the value calculated by the Horwitz equation.

Trueness Regarding the determination of trueness, there is no certified material available, so we used the spiked samples approach. The concentration results obtained for the spiked blank samples were compared to the theoretical values and

Fig. 5 Comparison of extraction recovery for different swine matrices



expressed in per cent. Good results were obtained, ranging from 79 to 109 % (Table 5).

Selectivity This parameter was evaluated by analysing blank samples from different animal species (swine, bovine, poultry, ovine and rabbit). According to the resulting chromatograms, no interferences were observed at the retention time of the analytes.

CC α and CC β Since nitroimidazoles are forbidden substances, these parameters must be set at the lowest possible concentration. Two different approaches have been used and compared. The first approach consists of extrapolation of the calibration curve, as described in 657/2002/CE Decision, and is based on the ISO/IEC 11843-1 standard regulation [20]. This procedure usually provides very low results in terms of concentration and has drawn some criticism as a means of calculating CC α , primarily because confirmation at these concentrations is required only in 50 % of samples. Other approaches have been proposed, such as the one published by Jülicher et al. [23] and described in the European Guidelines published in 2008 [24]. In this method, no extrapolation of the calibration curve is performed, but, rather, CC α is evaluated from the response at the first point on the calibration curve. For both approaches, it is essential to build a calibration curve with standards in the low concentration range. In the present study, the SMMS ranged from 0.1 to 0.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and results obtained for CC α and CC β are shown in Table 6. No marked differences in CC α values were observed between the extrapolation and Jülicher method, although the values from the extrapolation method are always lower.

The CC α values obtained with the extrapolation approach were adopted as the decision limits of the method to check the samples compliance.

The CC α values, in the 0.04–0.4 $\mu\text{g kg}^{-1}$ range, demonstrate the suitability of the method for screening the presence

Table 5 Validation results in swine muscle

Analyte	Extraction recovery (%)	Precision (%RSD)	Trueness (%)
DMZ	68	5.4	102
MNZ	95	5.7	105
RNZ	97	6.3	102
SCZ	86	9.6	88
IPZ	42	4.5	103
TNZ	97	6.0	101
CRZ	92	9.9	102
ORZ	87	7.9	100
DMZ-OH	97	6.1	101
MNZ-OH	97	6.3	102
IPZ-OH	87	9.1	98.8

Table 6 CC α and CC β values

Analyte	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	ISO 11843-1 [22]	Jülicher et al. [23]	
DMZ	0.052	0.119	0.285
MNZ	0.042	0.107	0.15
RNZ	0.056	0.125	0.49
SCZ	0.116	0.205	0.119
IPZ	0.141	0.189	0.148
TNZ	0.095	0.154	0.401
CRZ	0.169	0.31	0.569
ORZ	0.131	0.22	0.383
DMZ-OH	0.233	0.308	0.494
MNZ-OH	0.193	0.265	0.512
IPZ-OH	0.426	0.521	0.291

of nitrimidazoles, which require the lowest possible detection and confirmation levels.

Application of the analytical method

We applied external quality control to evaluate the quantification and confirmation capability of our method, by participating in interlaboratory studies. Fapas exercise number 02217 consisted of a sample of chicken egg containing dimetridazole at 0.65 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and hydroxi-dimetridazole at 3.01 $\mu\text{g kg}^{-1}$. The results obtained using the new method were 0.58 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for dimetridazole (Z-score= -0.5) and 3.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for hydroxi-dimetridazole (Z-score=+0.7).

On the other hand, control plans have been implemented for the area of Catalonia, including the analysis in 2013 of 617 samples of muscle from different animal species using the method presented here. In response to the needs of the laboratory, this method has been applied to different matrices, such as egg, with good results.

Conclusions

The proposed method for the confirmatory analysis of nitroimidazoles combines a very simple extraction using acetonitrile, evaporation of the extracts, redissolution with water, and injection into the UHPLC-QqQ-MS system. The new method allows a large number of samples to be processed per day and is a straightforward alternative to previously published methodologies.

Because of the aqueous nature of the extracts and the elimination of salts during the extraction process, this method avoids drawbacks such as matrix precipitation and ion suppression in MS detection, despite omission of the clean-up

step. Thus, large numbers of samples can be analysed without additional maintenance of the mass spectrometer. The method has been fully validated and proven to be sensitive enough to analyse nitroimidazoles in food samples, since $CC\alpha$ values are below $0.6 \mu\text{g kg}^{-1}$. Highly satisfactory results have been achieved in proficiency tests, demonstrating the ability of the method to comply with legal requirements and give accurate quantitative results.

The simplicity, effectiveness and broad scope of the proposed method, in terms of the matrices that can be analysed, makes it very suitable for laboratories with high workloads, and it is currently used for official control analysis in the Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona.

References

- Martindale, The Extra Pharmacopoeia, 37th edn. Royal Pharmaceutical Society, London (UK)
- Commission Regulation (UE) 37/2010/CE (22/12/2009) (2009) On pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Brussels (Belgium)
- Council Regulation (EEC) No. 470/2009 (6 May 2009): (2009) Laying down community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No. 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and the Council and Regulation (EC) No. 726/2004 of the European Parliament and of the Council
- CRL Guidance Paper (2007) CRL's view on the art of analytical methods for national residue control plans
- Thompson C, Traynor I, Fodey T, Crooks S (2009) Improved screening method for the detection of a range of nitroimidazoles in various matrices by optical biosensor. *Anal Chim Acta* 637(1–2):259–264
- Council Directive 96/23/EC (1996) On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decision 89/187/EEC and 91/664/EEC
- Commission Decision 657/2002/CE (2002) Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results
- Ho C, Sin DWM, Wong KM, Tang HPO (2005) Determination of dimetridazole in poultry and porcine tissues by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 530:23–31
- Tamoussiunas V, Padaruskas A (2009) Ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of 5-nitroimidazoles and their metabolites in egg. *Cent Eur J Chem* 7(3):267–273
- Mottier P, Huré I, Gremaud E, Guy P (2006) Analysis of four 5-nitroimidazoles and their corresponding hydroxylated metabolites in egg, processed egg, and chicken meat by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 54: 2018–26
- Zeleny R, Harbeck S, Schimmel H (2009) Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of 5-nitroimidazole drugs and their corresponding hydroxyl metabolites in lyophilised pork meat. *J Chromatogr A* 1216:249–56
- Xia X, Li X, Ding S, Zhang S, Jiang H, Li J, Shen J (2009) Determination of 5-nitroimidazoles and their corresponding hydroxy metabolites in swine kidney by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *J Anal Chim Acta* 637:79–86
- Cronly M, Behan P, Foley B, Malone E, Martin S, Doyle M, Regan L (2010) Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS). *Food Addit Contam A* 27(9):1233–46
- Xia X, Li X, Zhang S, Ding S, Jiang H, Li J, Shen J (2008) Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr* 1208:101–108
- Tölgyesi A, Sharma V, Fekete S, Fekete J, Simon A, Farkas S (2012) Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Pharm Biom Anal* 64–65:40–48
- Mohamed R, Mottier P, Treguier L, Richoz-Payot J, Yilmaz E, Tabet JC, Guy P (2008) Use of molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the determination of four 5-nitroimidazoles and three of their metabolites from egg-based samples before tandem LC-ESIMS/MS analysis. *J Agric Food Chem* 56:3500–08
- Cronly M, Behan P, Foley B, Malone E, Regan L (2009) Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1246:8101–09
- Mitrowska K, Posyniak A, Zmudzki J (2012) Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxyl-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography mass-spectrometry. *Talanta* 81: 1273–80
- Huang X, Lin J, Yuan D (2011) Simple and sensitive determination of nitroimidazole residues in honey using stir bar sorptive extraction with mixed mode monolith followed by liquid chromatography. *J Sep Sci* 34:2138–44
- ISO/IEC 11843-1 International Standard (1997) Capability of detection
- Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ (2003) Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 86:412–431
- Gowik P, Polzer J, Uhlig S (2007) Reference material in residue control: assessment of matrix effects. *Accred Qual Assur* 12:161–166
- Jülicher B, Gowik P, Uhlig S (1998) *Analyst* 123:173–179
- Guidelines for the implementation of Decision 2002/657/EC. (2008) SANCO/2004/2726: rev-4

4.2.3. Publicació 3: Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzers

Anal Bioanal Chem (2016) 408:5769–5778
DOI 10.1007/s00216-016-9679-5



RESEARCH PAPER

Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole versus Q-Orbitrap mass analyzers

Antoni Rúbies¹ Lili Guo^{1,2} Francesc Centrich^{1,3} Mercè Granados²

Received: 10 March 2016 / Revised: 16 May 2016 / Accepted: 1 June 2016 / Published online: 20 June 2016
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract We developed a Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS) method for the high throughput determination of 10 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in milk samples using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) with a triple quadrupole (QqQ) instrument and an electrospray ionization (ESI) source. The new extraction procedure is highly efficient, and we obtained absolute recoveries in the range 78.1–97.1 % for the extraction and clean-up steps. Chromatographic separation is performed in the gradient mode with a biphenyl column and acidic mobile phases consisting of water and acetonitrile containing formic acid. The chromatographic run time was about 12 min, and NSAID peaks showed a good symmetry factor. For MS/MS detection, we used multiple reaction monitoring (MRM) mode, using ESI in both positive and negative modes. Our method has been validated in compliance with the European Commission Decision 657/2002/EC, and we obtained very satisfactory results in inter-laboratory testing. Furthermore, we explored the use of a hybrid high resolution mass spectrometer, combining a quadrupole and an Orbitrap

mass analyzer, for high resolution (HR) MS/MS detection of NSAIDs. We achieved lower NSAID quantification limits with Q-Orbitrap high resolution mass spectrometry (HRMS/MS) detection than those achieved with the QqQ instrument; however, its main feature is its very high selectivity, which makes HRMS/MS particularly suitable for confirmatory analysis.

Keywords Liquid chromatography · Mass spectrometry · Triple quadrupole · Q-Orbitrap · Milk · Non-steroidal anti-inflammatory drugs

Introduction

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used for their anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic properties. The most common side effects of NSAIDs are related to gastric and intestinal disturbances, but allergies and other effects involving the hepatic, renal, hematopoietic, or central nervous systems may also occur [1].

In the European Union (EU), some NSAIDs are authorized for administration to food-producing animals. Since residues of these compounds in edible products are a potential risk to consumers, the EU has established maximum residue limits (MRLs) for several NSAIDs in food products of animal origin [2]. Furthermore, the EU Community Reference Laboratories have proposed recommended concentrations (RC) for NSAID without MRL, and also for diclofenac [3]. These RCs are guidance values that laboratories need to achieve in order to ensure effective control. Table 1 shows MRL and RC values for NSAIDs in milk.

According to EU legislation, plans for controlling the presence of NSAID residues in food of animal origin are mandatory and, therefore, control laboratories require reliable, high throughput analytical methods. Few confirmatory methods

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-9679-5) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Antoni Rúbies
arubies@aspb.cat

¹ Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avinguda Drassanes 13-15, 08001 Barcelona, Spain

² Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí Franquès 1-11, 08028 Barcelona, Spain

³ CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), 28029 Madrid, Spain

Table 1 Maximum residue limits (MRLs) and recommended concentrations (RCs) for NSAIDs

Compound	MRL in milk ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)		RC in milk ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
	Bovine	Caprine	
5-Hidroxyflunixin	40		
Diclofenac	0.1		5
Meloxicam	15	15	
Phenylbutazone			5
Oxyphenbutazone			5

have been developed for analyzing NSAID in milk samples. They are normally based on liquid chromatography (LC) coupled to mass spectrometry (MS), mostly using triple quadrupole (QqQ) instruments [4–9], although the use of high resolution mass spectrometry (HRMS, i.e. time of flight MS) and gas chromatography coupled to MS have also been described [10, 11].

NSAIDs are a heterogeneous group of drugs with multiple chemical structures, which can be classified into several groups (Table 2). This makes the development of NSAID multi-residue methods a challenging task, especially in terms of sample treatment (i.e., extraction and clean-up).

Few solvents have been proposed for NSAID extraction. Acetonitrile, the effect of which on protein precipitation facilitates efficient extraction, is the most widely used solvent [4–6, 11]. However, methanol [7] as well as acetonitrile/methanol [12] or acetonitrile/ethyl acetate mixtures [9] are also employed, and good overall recovery values have been reported for all systems. A controversial issue concerning the extraction step is the addition of ascorbic acid to prevent oxidation of pyrazolones (e.g., phenylbutazone and oxyphenbutazone [11, 12]). Some authors report that it does not improve recovery [5] and may even have a detrimental effect on MS detection of other analytes [7]. The use of ascorbic acid at low concentration levels could solve this drawback [9].

Since LC-MS is susceptible to matrix effects, and milk is quite a complex matrix, most methods include some clean-up of the extracts. Several strategies have been described, such as a liquid–liquid extraction with hexane to eliminate fat content [4, 9], but most of the methods apply solid phase extraction (SPE) with different sorbents, depending on the set of compounds included in the method, such as amino [6], octadecyl [12], or polymeric phases [5]. In general, the clean-up step is the bottleneck of the procedure. The methods proposed by Dubreil-Chéneau et al. [7] and van Pamel and Daeseleire [8] are exceptions, and no clean-up was applied after extraction with methanol and acetonitrile, respectively.

LC-MS is clearly the technique of choice for confirmatory NSAID residue detection methods. Chromatographic separation is usually performed with octadecyl columns and mobile

phases, mostly based on acetonitrile/water mixtures prepared at acidic pH. Regarding MS detection, most of the methods use a QqQ instrument with an ESI source, in positive or negative mode, depending on the compound.

The overall aim of this study was to develop a reliable and straightforward methodology for the analysis of NSAID residues in milk that is suitable for routine use in laboratories with high workloads. Table 2 shows the chemical structure and molecular formula of the representative compounds from diverse NSAID families included in the present study. We present a new method based on the Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) strategy [13] and LC-QqQ-MS/MS to analyze 10 NSAIDs in milk. We also evaluated the detection by HRMS/MS with a Q-Orbitrap instrument.

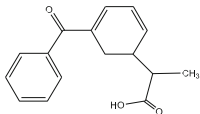
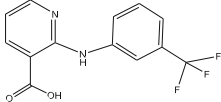
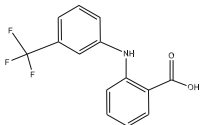
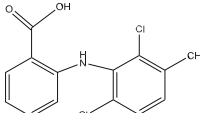
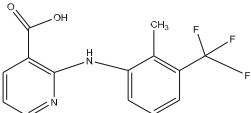
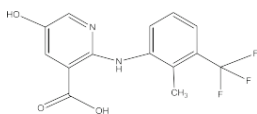
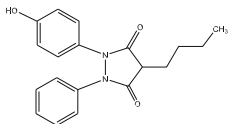
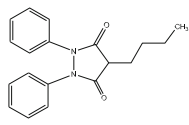
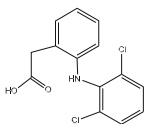
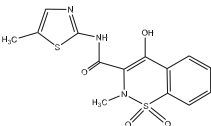
Materials and methods

Reagents

All standards had over 98 % purity. Standards of ketoprofen (KTP), niflumic acid (NFL), flufenamic acid (FLF), meclofenamic acid (MEC), flunixin (FLU), 5-hydroxyflunixin (5-FLU), oxyphenbutazone (OPB), phenylbutazone (PBZ), diclofenac (DCF), and meloxicam (MLX) were obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). We used meloxicam-D₃ (MLX-D₃), niflumic acid-¹³C₆ (NFL-¹³C₆), flufenamic acid-¹³C₆ (FLF-¹³C₆), phenylbutazone-¹³C₁₂ (PBZ-¹³C₁₂), also from Sigma-Aldrich, as internal standards (ISs). Acetonitrile and methanol (HPLC quality) were obtained from Panreac (Barcelona, Spain). Acetonitrile of hypergrade quality was obtained from Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Double deionized water of 18.2 MΩ · cm⁻¹ was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA). Other chemicals were of analytical reagent grade. Acetic acid and anhydrous sodium sulfate were obtained from Panreac. Ammonium acetate, ascorbic acid, and magnesium sulfate were obtained from Merck Millipore. Formic acid was obtained from Sigma-Aldrich (Seelze, Germany). Hydrochloric acid (32 %) was obtained from Fisher Chemical (Suwanee, GA, USA). Lichroprep RP-18 (25–40 μm) was obtained from Merck Millipore, and Bondesil primary-secondary amines (PSA) 40–100 μm was obtained from Agilent Technologies, (New Castle, DE, USA); 0.22 μm nylon membrane filters were obtained from Merck Millipore.

Standard solutions were prepared as follows: individual stock solutions (1000 mg · L⁻¹): 10 mg of each compound was weighed and dissolved in 10 mL of methanol using volumetric flasks, and stored at -18 °C for up to 1 y. An intermediate standard solution at a concentration of 20 mg · L⁻¹ was prepared in methanol and stored for up to 6 mo at -18 °C. Working solutions at concentrations of 5, 2, and

Table 2 Structure and molecule formulae of NSAIDs

Compound	Acronym	Structure	Molecular formulae (monoisotopic molecular mass)
Ketoprofen	KTP		$C_{16}H_{14}O_3$ (254.094299)
Niflumic acid	NFL		$C_{13}H_9F_3N_2O_2$ (282.061615)
Flufenamic acid	FLF		$C_{14}H_{10}F_3NO_2$ (281.066376)
Meclofenamic acid	MEC		$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ (295.016693)
Flunixin	FLU		$C_{14}H_{11}F_3N_2O_2$ (296.077271)
5-hydroxyflunixin	5-FLU		$C_{14}H_{11}F_3N_2O_3$ (312.072174)
Oxyphenbutazone	OPB		$C_{19}H_{20}N_2O_3$ (324.14739)
Phenylbutazone	PBZ		$C_{19}H_{20}N_2O_2$ (308.152466)
Diclofenac	DCF		$C_{14}H_{11}Cl_2NO_2$ (295.016693)
Meloxicam	MLX		$C_{14}H_{22}N_3O_4S_2$ (351.40072)

0.4 mg · L⁻¹ of each analyte were prepared in 0.1 % formic acid in ultrapure water and stored for up to 3 mo at -18 °C.

IS solutions were prepared in the same way as the stock standard solutions. The working solution had a concentration of 20 mg · L⁻¹.

Solutions of ascorbic acid 0.02 M, hydrochloric acid 0.24 M, and formic acid 0.1 % were prepared using double deionized water as solvent.

Instrumentation

For sample preparation, we used a multi-tube vortex (VWR, DVX-2500), a laboratory centrifuge HettichRotanta 460R (Tuttingen, Germany), a vertical agitator Agitax (Cisco Systems, Spain), a Turbovap nitrogen evaporator from Biotage (Uppsala, Sweden), and an ultrasonic bath (Ultrasons-H) from Selecta (Barcelona, Spain).

LC-QqQ-MS/MS

The LC system consisted of an Agilent Technologies 1290 coupled to an Agilent QqQ 6460 mass spectrometer with electrospray ionization (ESI), used in both positive and negative modes. The ESI source was operated under the following conditions: capillary voltage: -3.0 kV (ESI-) and 3.5 kV (ESI+); sheath gas temperature: 375 °C; gas temperature: 180 °C; gas flow (N₂): 5 L · min⁻¹, sheath gas flow (N₂): 11 L · min⁻¹; nebulizer gas (N₂) pressure: 45 psi. Nitrogen was obtained from a Peek nitrogen generator (Air Liquid,

Paris, France). Instrument control and data processing were carried out using Masshunter B.07.00 software.

A gradient using 0.1 % formic acid in water (mobile phase A) and 0.1 % formic acid in acetonitrile (mobile phase B) at a flow of 0.4 mL/min was used to separate the NSAIDs on a Phenomenex Kinetex Biphenyl column (2.6 μm, 100 × 2.1 mm); the column temperature was kept at 40 °C and the injection volume was 20 μL. The gradient program was the following: (time, %A): (0, 90), (10, 45), (10.1, 90), (14, 90). The total runtime was 14 min.

We monitored two transitions per compound and one transition for the internal standards. Table 3 shows the MS/MS parameters for each compound.

LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS

The HRMS instrument was a hybrid Q-Exactive from Thermo Scientific (Bremen, Germany). A Thermo Accela UHPLC system coupled to a Maylab Switch column manager and to the Q-Exactive mass spectrometer was used. The chromatographic system was coupled to the MS with a heated electrospray ionization source II (HESI II). HESI II conditions were: spray voltage +3.5 kV (positive ionization) or -3 kV (negative ionization); sheath gas flow rate (N₂), 35 (arbitrary units); capillary temperature, 300 °C; S-lens rf level, 50; heater temperature, 350 °C. Nitrogen obtained from a nitrogen generator Zefiro (Clantecnologica, Seville, Spain) was employed as both the collision and damping gas.

Mass calibration for Orbitrap was performed daily to ensure a working mass accuracy lower than or equal to 5 ppm.

Table 3 Optimized MS parameters for QqQ and Q-Orbitrap

Analyte	QqQ						Q-Orbitrap						
	ESI+/ESI-	Rt (min)	Precursor ion (m/z)	Fragmentor energy(V)	Production 1 (m/z)	CE (V)	Production 2 (m/z)	CE (V)	HESI+/HESI-	Rt (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	NCE (%)
KTP	ESI+	7.11	254.8	130	105	15	77	50	HESI+	5.12	255.1012	209.0948	20
NFL	ESI-	7.39	280.6	130	176.8	15	237	35	HESI-	8.36	281.0543	237.0642	20
FLF	ESI-	9.32	280.0	130	236.0	25	215.0	15	HESI-	10.64	280.0591	236.0683	10
MEC	ESI+	5.89	296.7	110	278.9	15	263.8	40	HESI-	10.79	294.0096	258.0324	20
FLU	ESI-	5.89	294.5	70	251	15	208.9	35	HESI-	5.55	295.0700	251.0798	25
5-FLU	ESI+	5.49	312.7	110	295	25	279.9	35	HESI-	4.37	311.0650	267.0750	20
OPB	ESI-	7.29	323.0	130	295	15	134	15	HESI-	5.37	323.1402	295.1448	32
PBZ	ESI-	9.47	307.0	130	279.1	15	131	15	HESI-	9.44	307.1452	280.1524	10
DCF	ESI-	8.84	293.8	90	250.1	10	293.8	-	HESI-	8.54	294.0096	250.0191	10
MLX	ESI+	7.51	351.6	130	115	15	141	25	HESI+	5.54	352.4202	115.0326	15
MLX-D ₃	ESI+	7.49	354.6	130	115	15	—	—	HESI+	5.58	355.0587	—	—
NFL ¹³ C ₆	ESI-	7.39	287.8	130	270	25	—	—	HESI-	8.41	287.0752	—	—
FLF ¹³ C ₆	ESI-	9.324	286.1	130	242.1	15	—	—	HESI-	10.73	286.0793	—	—
PBZ ¹³ C ₁₂	ESI-	9.53	320.8	130	166.1	25	—	—	HESI-	9.43	319.1862	—	—

CE collision energy, NCE normalized collision energy, *In bold* quantitation product ion

Pierce LTQ Velos ESI Positive ion and Pierce LTQ Velos ESI Negative ion calibration solutions (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) were used to calibrate the mass spectrometer. The resolution was set at 70,000 (m/z 200, FWHM) at a scan rate of 2 Hz, and the automatic gain control (AGC) was set at $2e^5$ with a maximum injection time set at 100 ms. Xcalibur 2.2 and Trace Finder 3.2 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) were used for LC-HRMS control and data processing, respectively.

A gradient using aqueous 0.1 % formic acid (mobile phase A) and acetonitrile hypergrade with 0.1 % formic acid (mobile phase B) at a flow of $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ was used to separate the NSAIDs on a Phenomenex Kinetex XB C18 column ($1.7 \mu\text{m}$, $100 \times 2.1 \text{ mm}$); the column temperature was kept at 40°C and the injection volume was $10 \mu\text{L}$. The gradient program was as follows; (time, %A): (0, 70), (10, 45), (10.1, 70), (12, 70). Total runtime was 12 min.

Specific detection conditions when using HRMS are given in Table 3.

Sample treatment

Five g of milk sample was weighed in a centrifuge tube and $100 \mu\text{L}$ of a $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ solution of IS was added. Subsequently, 10 mL of 5 % acetic acid in ACN, 1 g of ammonium acetate, 4 mL of ascorbic acid 0.02 M in HCl 0.24 M and 5 g of Na_2SO_4 were added. The sample was shaken for 5 min using multi-tube vertical shaker, sonicated for 5 min and subsequently centrifuged (3000 rpm, 10°C , 10 min). The supernatant was transferred to a centrifuge tube containing 150 mg of C18 and 1 g of MgSO_4 and the mixture was shaken for 5 min (vortex), sonicated for 5 min, and centrifuged under the aforementioned conditions. Then, the supernatant was evaporated to around $250 \mu\text{L}$ under a N_2 stream at 40°C , diluted to $500 \mu\text{L}$ with 0.1 % formic acid and filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ nylon filter membrane.

Calibration

The quantification of NSAIDs in milk samples was based on the use of surrogate matrix matched standards (SMMS). SMMSs consisted of blank milk samples spiked with known amounts of NSAIDs and $100 \mu\text{L}$ of IS. After spiking, SMMSs were left for contact during 30 min before proceeding to the extraction, according to the extraction protocol described above. Linear regression was performed by plotting the peak area ratio of the analyte to IS against the analyte concentration. ISs were assigned to analytes as follows: MLX- D_3 for MLX, DCF, and KTP, NFL- $^{13}\text{C}_6$ for NFL and MEC, FLF- $^{13}\text{C}_6$ for FLF, 5-FLU, FLU, and PBZ- $^{13}\text{C}_{12}$ for PBZ and OPB. Calibration with SMMS provides quantification of the sample automatically corrected by the recovery value.

Results and discussion

Method development

LC-QqQ-MS/MS

The multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for quantification and confirmation. Thus, to optimize MS detection and select precursor and product ions for each analyte, standard solutions of $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ in methanol were infused into the mass spectrometer, and spectra were acquired using the ESI source operating in positive or negative mode. The mobile phase consisted of water:acetonitrile (1:1).

The Fragmentor parameter was optimized in the 70–130 V range to obtain maximum response for precursor ions. Collision energy was optimized in the range 5–35 V to obtain maximum response for the product ions. The final selection of ESI polarity and MRM transitions for each NSAID was based on both sensitivity and selectivity criteria. The mass spectrometer was quick enough to switch polarity without compromising sensitivity. Two transitions of the precursor ion were selected to achieve enough identification points to confirm the identity of the analytes (Table 3). The most intense transition (in bold) was used for quantification, and the ion ratio parameter for confirmation. Although MS detection is a selective technique, good chromatographic separation is advisable. The chromatographic separation of NSAIDs is usually performed in reversed mode on C8 or C18 columns. In this study, we assayed two chromatographic columns (Kinetex XB C18, $1.7 \mu\text{m}$ and Kinetex biphenyl, $2.1 \mu\text{m}$, both solid core type). The biphenyl stationary phase behaves similarly to C18 but with enhanced aromatic selectivity, so that deeper interaction with the aromatic rings of the analytes is achieved. We used mobile phases based on water-acetonitrile mixtures and tested several gradient programs at $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, starting at 10 % to 40 % acetonitrile and reaching 55 % acetonitrile in 6 to 10 min.

We observed some changes in the elution order between the columns: C18 column, MLX, 5-FLU, KTP, MEC, FLU, FLF, NFL, OPB, DCF, and PBZ; biphenyl column, 5-FLU, MEC, FLU, KTP, OPB, NFL, MLX, DCF, FLF, and PBZ. Some overlapping peaks were obtained with both columns, but the NSAID peaks obtained with the biphenyl column showed a better symmetry factor than those obtained with the C18 column and, thus, the biphenyl column was selected for further assays. When injecting milk extracts, NSAID retention times showed poor reproducibility when comparing injections of standards in solvent and standards in extracted matrix. Adding formic acid to the mobile phase resolved this issue, leading to reproducible retention times. The addition of acidic media did not result in loss of sensitivity for the compounds monitored in negative mode. After adjusting gradient conditions for the biphenyl phase (described in the Materials and methods Section), we achieved good chromatographic

separation in a total run time of 14 min, including equilibration time (Fig. 1).

Extraction method

Various approaches have been proposed for extracting NSAIDs from milk samples. Acetonitrile has been found to provide efficient extraction and quite clean extracts because of its deproteinizing effect. Methanol is less commonly used, but is also effective. Regardless, most methods include a clean-up step, based on either solid phase extraction or liquid-liquid extraction with hexane, or a combination of both, before the chromatographic analysis. The aim of this study was to develop a simple but reliable extraction method, suitable for laboratories with high workloads.

Thus, we carried out preliminary studies using the QuEChERS approach, and also applied the methods proposed by Jedziniak et al. [6] (extraction with acetonitrile containing ammonia and clean-up by SPE with amino cartridge), and by Moragues et al. [14] (extraction with methanol and clean-up by SPE with C18 cartridge). In the QuEChERS assays, the extraction step was based on acetonitrile containing 5 % acetic acid to ensure protonation of carboxylic acids. We also added sodium chloride and magnesium sulfate. After shaking and centrifugation, the organic layer underwent a clean-up step by dispersive solid phase extraction (d-SPE) with C18. We analyzed the

extracts by LC-QqQ-MS/MS, and compared NSAID peak areas using the three methodologies. Overall, none of the methods assayed provided optimal results for all compounds, but yielded similar results when compared globally. Thus, the simplicity and speed of the QuEChERS methodology was a significant differentiating factor, so we focused our efforts on optimizing a new method based on this approach.

We compared two distinct dispersive media for the d-SPE step, C18 and PSA, and found better recoveries for the majority of analytes when using C18 (see Electronic Supplementary Material (ESM) Fig. S1). We also investigated to omit the clean-up step in order to speed up the analysis, but we obtained unsatisfactory results, with low signals for almost all analytes (see ESM Fig. S1)

Although the results achieved using the QuEChERS approach were satisfactory overall, MS signals for PBZ and OPB were low and poorly reproducible, both with C18 and PSA. These compounds may readily undergo oxidation, and the addition of ascorbic acid to prevent their oxidation has been proposed. However, this antioxidant reagent may have deleterious effects on MS/MS detection of NSAIDs [7], which can be prevented by using a relatively low concentration of ascorbic acid [9]. Adding 0.006 M ascorbic acid to the acetonitrile extraction solution markedly improved the results of PBZ and OPB, and with no relevant adverse effects on the signals of other NSAIDs.

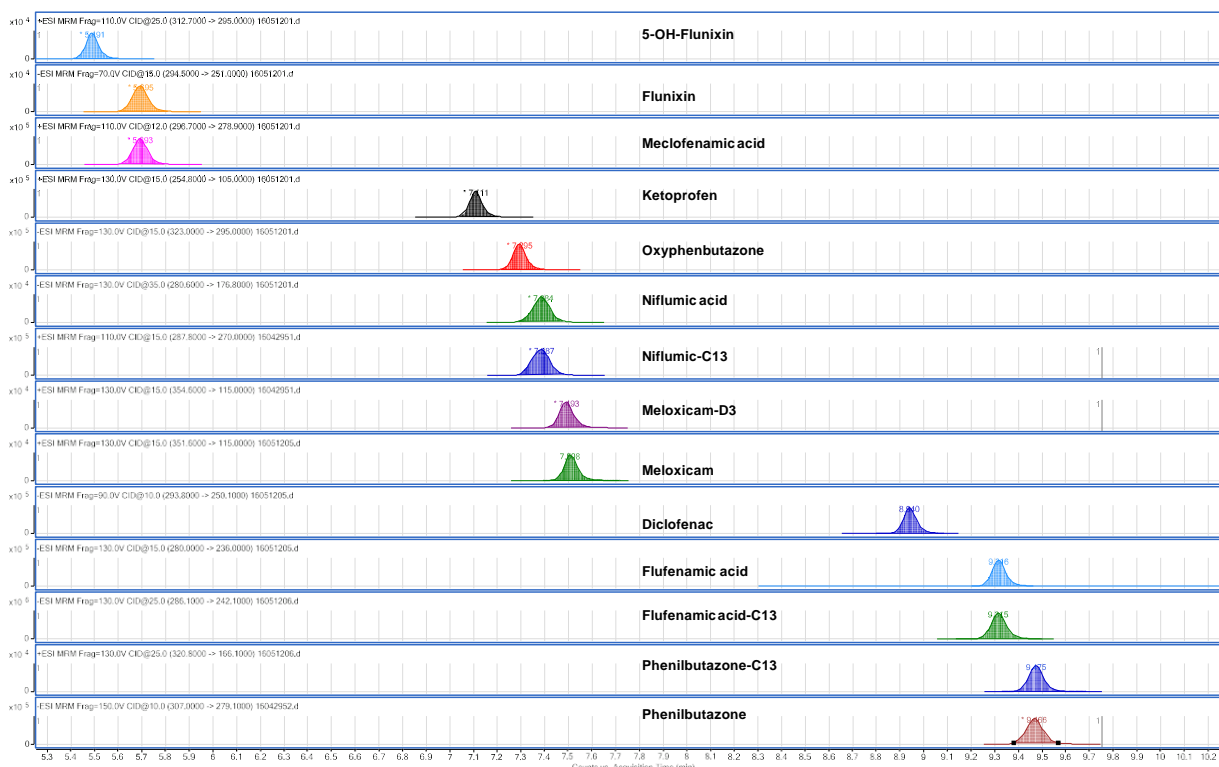


Fig. 1 LC-QqQ-MS/MS chromatograms of a standard mixture of 0.4 mg · L⁻¹ of NSAIDs and internal standards

Finally, we substituted sodium chloride with ammonium acetate in the extraction solution, and obtained lower baseline noises, thus allowing lower detection limits. The final conditions adopted for the QuEChERS extraction and clean-up by d-SPE with C18 are reported in the Sample treatment Section. The absolute recoveries for the QuEChERS method obtained at $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ are shown in Fig. S2 (ESM). These results, in the 78–96 % range, are very satisfactory, making this a suitable and simple new method for routine laboratory testing.

Method validation

We validated the QuEChERS LC-QqQ-MS/MS method in milk according to the European Commission Decision 657/2002/EC guidelines [15], and tested the following parameters: linearity, extraction recovery, intermediate precision, trueness, selectivity, ruggedness, limit of decision ($CC\alpha$), and detection capability ($CC\beta$).

Linearity

We built calibration curves for each compound using SMMS in the $2.5\text{--}25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ range, except for FLU, for which calibration curves reached $60 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. We used the correlation coefficient and point-to-point deviation (in %, with respect to the theoretical value) to evaluate linearity, and obtained good linearity for all analytes: correlation coefficients >0.99 for all the compounds except for ketoprofen, which showed correlation coefficient >0.95 . Residuals were always $<25\%$ at the lowest concentration ($2.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and $<15\%$ for higher calibration concentrations.

Extraction recovery

Before extraction, we spiked a set of blank samples in the range $2.5\text{--}40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and extracted. Then, we extracted and spiked a second set of blank samples after extraction and clean-up, and calculated absolute recovery for sample treatment steps by comparing the results. The experiment was repeated three times on three different days. Absolute recoveries for the extraction and clean-up steps ranged from 78.1 to 97.1 % (Table 4).

Intermediate precision

The study was performed at four concentration levels over 3 d, with six spiked samples analyzed daily at each concentration level. Results were evaluated in terms of relative standard deviation (%RSD), which ranged from 1.7 to 16.9 %, and were always below the value calculated by the Horwitz equation.

Trueness

There is no certified material available for determining trueness, so we used the spiked samples approach. We compared the concentrations obtained for the spiked blank samples with the theoretical values from a SMMS calibration curve, expressed in %, and obtained good results, ranging from 84.1 to 108.8 % (Table 4).

Selectivity

We evaluated this parameter by analyzing different blank samples, and in all cases we observed no interferences at the retention time of the analytes. In addition, we found no relevant differences between the IS responses in all blank samples, with %RSD below 20 %.

Ruggedness

We evaluated critical steps of the method by introducing minor changes and evaluating the results. The parameters evaluated were the use of different samples, the effect of drying on the extracts, and the effect of the evaporation temperature. Moreover, the use of different instruments (vertical agitators and evaporators) was considered. Different operators carried out the experiments. No significant differences were found for the studied parameters, except for the evaporation step: when reaching dryness of the extracts, we obtained low responses for KTP, OPB, and PBZ.

$CC\alpha$ and $CC\beta$

MRL has only been established in milk for three of the studied compounds, namely FLU (expressed as 5-FLU), MLX, and DCF. For MLX and 5-FLU, $CC\alpha$ and $CC\beta$ were determined around these limits as described in [15], and results are shown in Table 4. However, for DCF, the MRL has been set at such a low concentration ($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) that the method was not suitable. In fact, very few methods have reported in the literature as being able to confirm the presence of DCF at $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ [6, 8, 9].

We proceeded with DCF as for NSAIDs with no published MRL, with $CC\alpha$ and $CC\beta$ were established at the lowest possible concentration level. Thus, we determined $CC\alpha$ and $CC\beta$ by extrapolating the calibration curve as described in 2002/657/EC Commission Decision [15], based on the ISO/IEC 11843–2 standard regulation [16]. In the present study, the SMMS calibration curves ranged from 2.5 to $25 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Results for $CC\alpha$ and $CC\beta$ ranged from 0.4 to $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for $CC\alpha$ and from 0.8 to $1.9 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ for $CC\beta$ (Table 4).

To assess the performance of the method and the consistency of the calculated $CC\alpha$, blank milk samples were spiked at 0.5, 1, and $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and analyzed using the new method. The NSAIDs were detected in all cases.

Furthermore, we participated in the inter-laboratory exercise Fapas number 02274 (NSAIDs in bovine milk), with very satisfactory results: the sample contained $7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ of PBZ and a Z-score = 0 was obtained, proving the suitability of the proposed method.

Analysis of NSAIDs in milk
by UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS/MS

The new generation of HRMS instruments, such as Orbitrap-based mass spectrometers, are a powerful tool for enhancing the selectivity of analytical methods because of their high

resolution power and sensitivity. In the food safety field, approaches using these types of instruments are increasingly being used to confirm the results of low resolution mass spectrometers (LRMS), and also as a tool for routine analysis. They seem especially suited for highly demanding scenarios, such as the analysis of DCF in milk, because of its very low MRL ($0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$). We used a hybrid Q-Orbitrap instrument coupled to a UHPLC system. The chromatographic separation of NSAIDs was performed in the gradient elution mode on a Kinetex XB C18 column as described in the Materials and methods Section. Total run time was 15 min and retention times for NSAIDs ranged between 5.6 and 11 min.

Table 4 Validation results in milk

Analyte	Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	Extraction recovery (%) (n=3)	Precision (RSD%) (n=18)	Trueness (%) (n=18)	CC α ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) CC β ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
KTP	2.5	81.0	10.4	87.6	0.4
	5.0	95.6	12.0	97.8	
	10.0	92.2	10.7	98.8	
	25.0	87.5	8.6	103.1	
NFL	2.5	93.4	9.2	108.4	1.0
	5.0	90.6	7.8	107.4	
	10.0	93.4	10.1	94.0	
FLF	2.5	96.0	10.3	108.8	0.8
	5.0	90.9	7.9	108.0	
	10.0	96.5	8.3	95.5	
MEC	2.5	91.2	10.8	105.6	0.5
	5.0	90.4	10.4	102.8	
	10.0	93.3	10.4	84.1	
FLU	2.5	92.9	10.3	97.6	1.5
	5.0	90.2	13.5	94.6	
	10.0	95.2	7.9	105.1	
5-FLU	2.5	89.7	14.3	91.2	41.2
	5.0	87.1	9.7	103.8	
	10.0	88.2	11.5	85.7	
	25.0	88.2	10.0	101.1	
DCF	2.5	92.3	9.2	92.4	1.5
	5.0	91.0	8.8	100.0	
	10.0	97.1	12.8	102.0	
	25.0	90.9	12.2	90.8	
DCF	2.5	92.3	9.2	92.4	1.5
	5.0	91.0	8.8	100.0	
	10.0	97.1	12.8	102.0	
	25.0	90.9	12.2	90.8	
OPB	2.5	94.7	11.7	103.2	0.9
	5.0	89.3	13.1	94.6	
	10.0	91.1	12.2	98.8	
	25.0	85.6	13.7	100.7	
PBZ	2.5	78.1	16.9	98.8	0.4
	5.0	89.1	12.6	101.8	
	10.0	95.3	11.8	99.1	
	25.0	86.1	14.9	88.9	
MLX	2.5	94.4	15.2	98.0	15.8
	5.0	92.5	9.0	102.8	
	10.0	92.0	7.8	102.0	
	15.0	91.2	3.0	103.1	
	25.0	90.5	12.2	104.3	

Standards of $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were injected into the UHPLC-Q-Orbitrap system to optimize the analytical response, for both precursor and product ions of NSAIDs. The working mode was product reaction monitoring (PRM) with a mass width for the precursor ion selection set at 1 Da and resolution set at 70,000 (m/z 200, FWHM). We selected mild conditions for collision energy, allowing both precursor and product ion monitoring, and operational parameters were optimized (shown in the Materials and methods Section). Comparing QqQ and Q-Orbitrap spectrometer working conditions, some compounds differ in polarity (i.e., MEC and 5-FLU). The majority of NSAIDs ionize in both positive and negative mode, and our criterion was to select conditions that provided the optimal response for each instrument to achieve the lowest concentrations.

Following chromatographic and MS optimization, we injected extracted milk samples to test the performance of the method. We analyzed SMMs in the concentration range $2.5\text{--}40 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ and obtained good linearity, with correlation factors higher than 0.99. All NSAIDs were detected and confirmed at the lowest calibration level.

Finally, we tested the performance of the UHPLC-HRMS/MS system at sub- $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ level. For this purpose, blank milk samples were spiked with NSAIDs at 1, 0.7, 0.5, 0.3, 0.1, and $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. All NSAIDs were detected at 1 and $0.7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (both precursor and product ions were present); precursor ions were detectable at lower concentrations, even at $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, except for MEC. However, confirmation at this level was only possible for KTP, NFL, FLF, FLU, 5-FLU, OPB, DCF, and MLX (Fig. 2). These results show that confirmatory analysis of DCF is possible at the MRL level. The mass

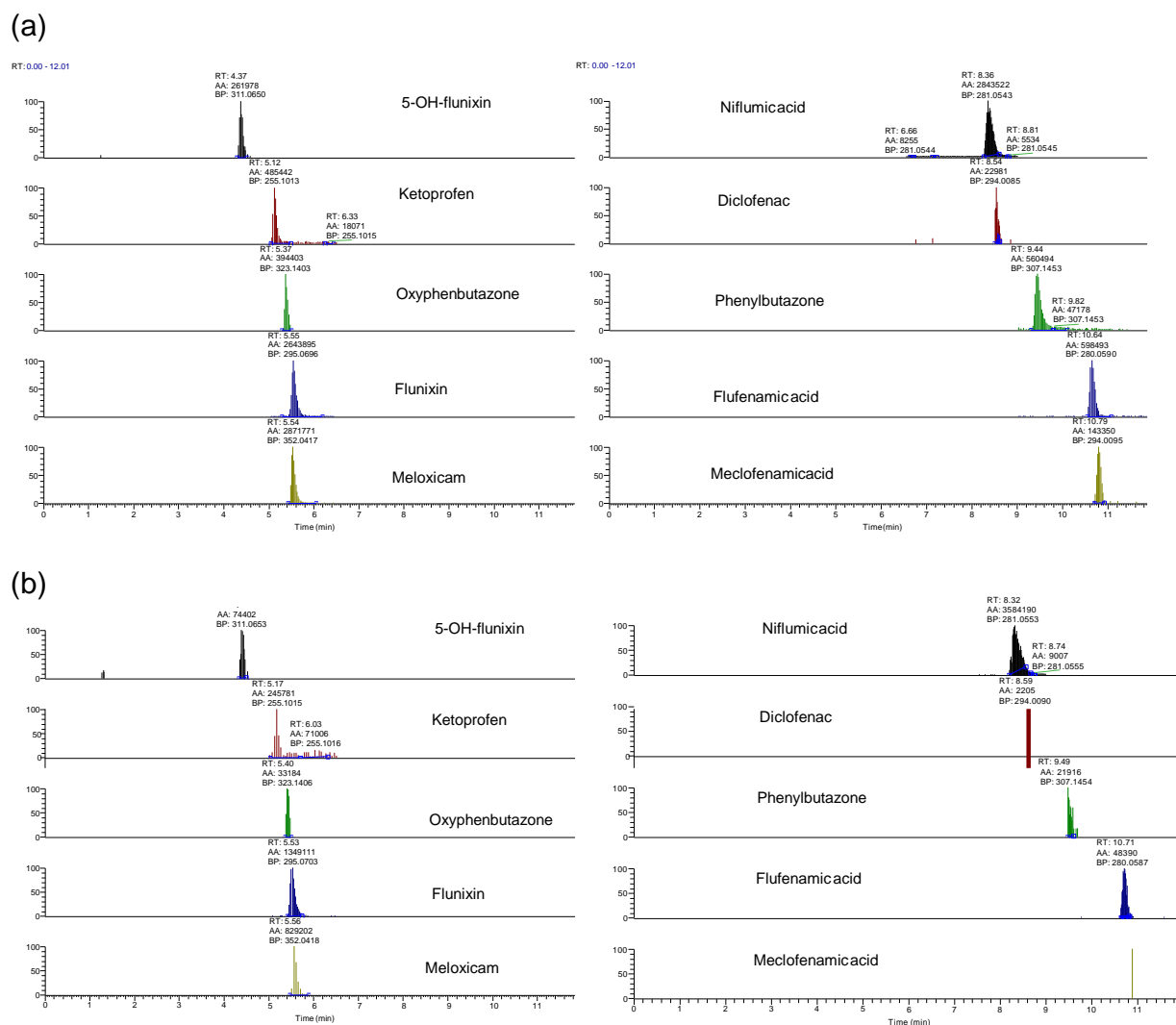


Fig. 2 LC-HRMS/MS chromatograms of precursor ions. Milk samples spiked at: (a) $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; (b) $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$

accuracy was below 5 ppm in all cases. Figure 2 shows the chromatograms of NSAID precursor ions from a milk sample spiked at 0.5 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (a) and at 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (b).

Conclusions

The QuEChERS methodology has proven to be a reliable strategy for analyzing NSAIDs in milk samples using LC-MS/MS. The new method allows high sample throughput thanks to its simplicity and effectiveness, and is very suitable for control laboratories. The method has been validated, and its successful performance in proficiency tests demonstrates its ability to provide accurate results.

We have also investigated the use of HRMS/MS. The high accuracy, resolution, and sensitivity provided by the Q-Orbitrap instrument is especially suitable for reliable analysis at very low concentrations, such as that required for diclofenac, the MRL of which is established by EU legislation at 0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Although this instrumentation still has a limited presence in food safety testing laboratories, it is useful for routine analysis and may become an excellent tool for complex samples, and an alternative to triple quadrupole mass spectrometers.

The new method is currently used in control plans implemented in the area of Catalonia, and was used to analyze more than 50 samples of milk from different animal species in 2015.

Acknowledgments The authors thank Jojo Tibon for his contribution to the HRMS experiments.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Sweetman SC, editor. Martindale. The Complete Drug Reference. 37th ed. London: Pharmaceutical Press: Royal Pharmaceutical Society; 2011.
- Commission Regulation (EU) Nr. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off J Eur Union. 2009; L 15/1.
- CRL Guidance Paper. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. 2007. http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/EURL_Empfehlungen_Konzentrationsauswahl_Methodenvalidierungen_EN.pdf?sessionid=75F6F1917236B2A4DBC5145859A6C22.2_cid332?blob=publicationFile&v=2%EF%BB%BF. Accessed 29 Feb 2016.
- Malone EM, Dowling G, Elliot CT, Kennedy DG, Regan L. Development of a rapid, multiclass method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009;1216:8132–40.
- Gentili A, Caretti F, Bellante S, Mainero Rocca L, Curini R, Venditti A. Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Anal Bioanal Chem*. 2012;404:1375–88.
- Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Pietruk K, Sledzińska E, Zmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403(10): 2955–63.
- Dubreil-Chéneau E, Pirotais Y, Bessiral M, Roudaut B, Verdon E. Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011;1218:6292–301.
- Van Pamel E, Daeseleire E. A multiresidue liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk. *Anal Bioanal Chem*. 2015;407:4485–94.
- Peng T, Zhu AL, Zhou YN, et al. Development of a simple method for simultaneous determination of nine subclasses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B*. 2013;933:15–23.
- Stolker AAM, Rutgers P, Oosterink E, et al. Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391:2309–22.
- Dowling G, Gallo P, Fabroccino S, Serpe L, Regan L. Determination of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac, and phenylbutazone in bovine milk by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A*. 2008;25:1497–508.
- Gallo P, Fabroccino S, Vinci F, Fiori M, Danese V, Serpe L. Confirmatory identification of sixteen non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2008;22:841–54.
- Anastassiades M, Lehota SJ, Stajnbauer D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in procedure. *J AOAC Int*. 2003;86:412–43.
- Moragues F, Igualada C, León N. Qualitative confirmatory method for determination of Phenylbutazone and 11 prohibited NSAIDs in animal tissue and milk by UPLC-MS/MS. Prague: Recent Advances in Food Analysis; 2013.
- Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Union. 2002; L 221/8–36.
- ISO 11843-2. Capability of detection. Part 2: Methodology in the linear calibration case. 2nd ed. International Organization for Standardization; 2000.

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry: triple quadrupole vs QOrbitrap mass analyzers.

Rúbies, A.^{a(*)}; Guo, L.^{a,b}; Centrich, F.^{a,c}; Granados, M.^b

a. Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona. Avinguda Drassanes 13-15. 08001 Barcelona (Spain)

b. Department de Química Analítica. Universitat de Barcelona. Martí Franquès 1-11. 08028 Barcelona (Spain)

c. CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid. Spain
e-mail address of the corresponding author: arubies@aspb.cat

SUPPLEMENTARY DATA

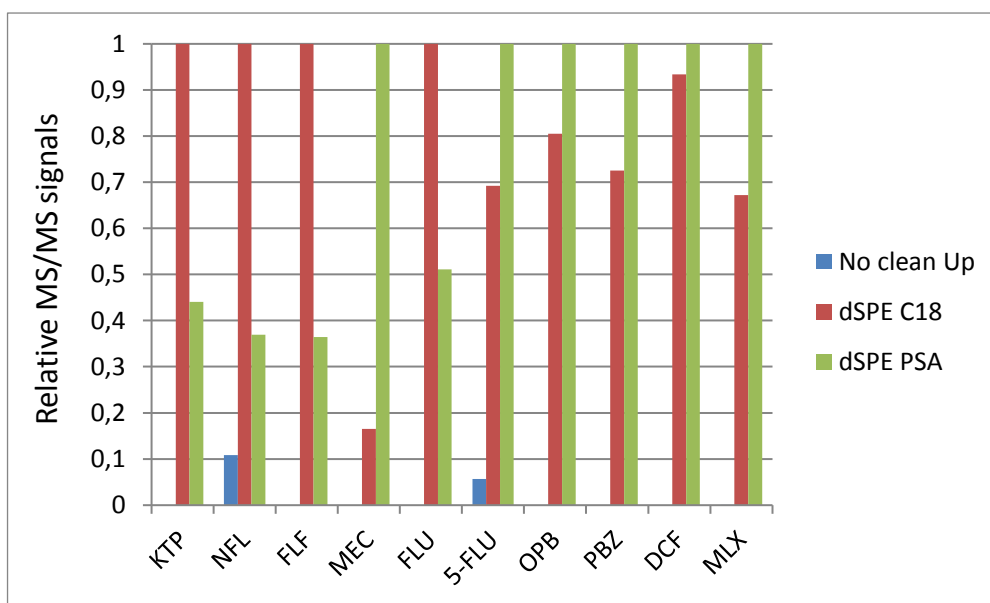


Figure S1 Comparison of MS/MS response of different QuEChERS strategies relative to the maximum signal for each analyte: milk samples spiked at 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

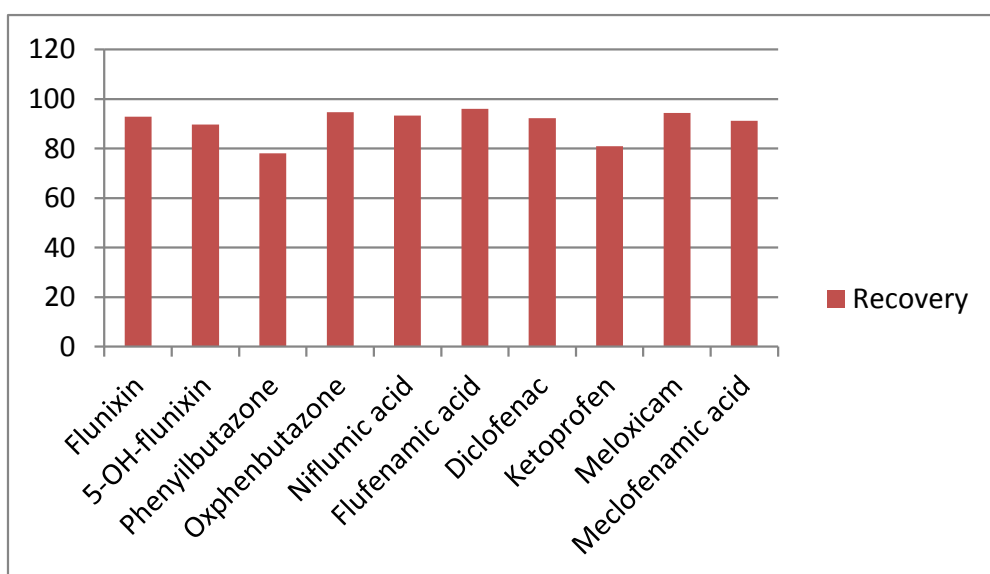


Figure S2 Absolute recoveries for the final conditions of the QuEChERS extraction method. Milk samples spiked with NSAIDs at 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (n=3)

4.3. Discussió de resultats

L'objectiu del present estudi és el d'establir metodologia analítica fiable i d'alt rendiment per a una sèrie de famílies de compostos per a les que no es disposa de massa estudis sobre la seva anàlisi en les diferents matrius per a les que han estat regulades. En concret, s'han desenvolupat mètodes per a l'anàlisi confirmatòria d'ivermectines en múscul, de nitroimidazols en múscul de diferents espècies animals i d'antiinflamatoris no esteroideus en llet de boví. En tots els treballs presentats en aquesta memòria s'ha partit de la premissa d'intentar aplicar l'estratègia QuEChERS, adaptant-la a les característiques de cadascuna de les famílies.

En la cerca bibliogràfica realitzada no s'han trobat articles que apliquin l'estratègia QuEChERS a l'extracció de les famílies esmentades, per tant, la seva aplicació als compostos estudiats ha estat considerada per primera vegada en el present treball. Tanmateix, sí que hi ha treballs publicats on s'aplica l'estratègia QuEChERS a altres compostos com els productes medicamentosos amb efecte antiparasitari [56], tranquil·litzant [57], etc.

D'altra banda, en els mètodes d'anàlisi estudiats, s'ha inclòs a part de la determinació per espectrometria de masses de baixa resolució, amb instruments de triple quadrupol, la confirmació de resultats dubtosos usant l'espectrometria de masses d'alta resolució amb l'analitzador Orbitrap®.

Aquesta proporciona resultats amb un elevat grau de fiabilitat i permet resoldre dubtes obtinguts en l'ús de l'espectrometria de masses de baixa resolució.

La discussió detallada de cada mètode es pot trobar al corresponent article publicat i inclòs en la memòria. En aquesta secció es farà la discussió integrada de tots els mètodes publicats i s'aniran comentant de forma esglaonada, segons la seqüència lògica de l'anàlisi: primerament l'extracció, després la separació cromatogràfica, seguidament la determinació per espectrometria de masses, la validació dels mètodes presentats i finalment la seva aplicació a l'anàlisi de mostres de diferents tipus. A més, s'ha tingut en compte la perspectiva de l'anàlisi en un laboratori de control oficial, on hi ha unes necessitats específiques que cal integrar als mètodes, com ara la gran quantitat

de mostres a processar, la variabilitat de les matrius a investigar i la rapidesa en l'entrega de resultats.

4.3.1 Extracció i clean-up

Tal com dèiem anteriorment, el mètode QuEChERS s'ha anat modificant en cada cas per adaptar-lo a les característiques dels compostos a estudiar. En l'àmbit de l'anàlisi dels medicaments d'ús veterinari, els medis més habituals per extreure els compostos són dissolvents orgànics tipus metanol, acetonitril o bé tampons, tipus fosfat, acetat, etc. En el cas del mètodes que ens ocupen, el medi d'extracció ha estat l'acetonitril en tots els casos, tot i que s'han assajat i comparat altres dissolvents. Quan es fan extraccions amb metanol, s'observa sovint el resultat d'extractes bruts ja que aquest dissolvent extreu, a part dels anàlits, molta part de la matriu, com per exemple proteïnes i fosfolípids, així com altres components indesitjats, que posteriorment poden provocar embrutament dels equips i augmentar la dificultat de la determinació instrumental. D'altra banda, l'acetonitril té propietats desproteïnitzants (de precipitació de la proteïna), per la qual cosa s'obtenen extractes més nets.

En el cas de l'anàlisi d'ivermectines i d'antiinflamatoris no esteroideus (NSAIDs) es va afegir les sals necessàries per provocar l'efecte de salament ("salting-out") que té a veure amb l'increment de la força iònica del medi aquós, afavorint l'extracció, a més de separar millor la fase orgànica de l'aquosa.

En l'adaptació del mètode a l'anàlisi d'ivermectines, es va assajar l'ús d'acetonitril i sals com el $MgSO_4$, el NaCl i l'acetat de sodi i es va veure que la millor combinació era la de 3 grams de mostra, 2 grams de $MgSO_4$ i 0,5 g. de NaCl. Monitoritzant el patró intern (selamectina) es va observar que en les extraccions hi havia una gran variabilitat de la resposta d'aquest compost, que es va atribuir a l'efecte del pH d'extracció no controlat. Amb l'addició d'una mica d'amoniac per obtenir un medi alcalí controlat, la resposta va ser molt més estable.

Aquest punt va ser també molt estudiat en el mètode d'anàlisi de nitroimidazols, on es va comparar l'ús de l'acetonitril amb l'acetat d'etil, i d'acetonitril amb àcid acètic (1%). Comparativament, es va observar que el millor dissolvent per

l'extracció era l'acetonitril, ja que precipitava la proteïna i donava extractes menys tèrbols, comparats amb els que contenien un 1% d'àcid. A més quan es comparava la recuperació obtinguda usant acetat d'etil o acetonitril s'observava que aquest últim donava percentatges de recuperació més elevats. Es va poder comprovar a més, que els extractes es podien portar a sequedat, ja que les recuperacions dels nitroimidazols no es veien afectades. Pel que fa a les sals a addicionar, es van provar $MgSO_4$, NaCl, la combinació d'ambdós en diferents proporcions i l'acetat de sodi en combinació amb el NaCl. Les millors recuperacions es van obtenir quan no es va addicionar cap sal, ja que l'elevada polaritat dels anàlits feia innecessària d'addició de sals.

Dels 3 casos considerats, l'anàlisi de NSAIDs és el més complex, a causa de les nombroses famílies que componen el grup i, a l'estudi s'ha inclòs com a mínim, un representant de cadascuna d'elles (derivats de l'àcid propiònic, derivats de l'àcid antranílic, derivats de l'àcid nicotínic, pirazolones, derivats de l'àcid acètic i oxicams).

A l'anàlisi dels NSAIDs, l'extracció amb acetonitril proporcionava recuperacions poc reproduïbles i va ser necessari addicionar medi àcid a l'acetonitril. Així els NSAIDs s'extreien amb acetonitril amb un 5% d'àcid acètic. Aquest medi àcid assegura que els anàlits es trobin en la seva forma protonada i passin al medi orgànic d'extracció. En el cas de l'anàlisi dels NSAIDs, les sals afegides van ser acetat amònic i sulfat sòdic; es va demostrar que l'ús de l'acetat amònic millorava la relació senyal-soroll de la resposta instrumental.

Pel que fa al pas de purificació, la majoria de mètodes d'anàlisi de les famílies de medicaments estudiats en aquesta tesi inclouen una purificació dels extractes usant extracció en fase sòlida (SPE). Aquesta etapa permet, a la vegada que eliminar interferències, concentrar els extractes i baixar per tant límits de detecció i de quantificació. El tipus de cartutx a usar depèn de la natura dels anàlits d'interès. Tot i l'exposat anteriorment, en aquesta memòria es presenten mètodes que no usen la SPE, ja que aquesta forma de clean-up és bastant laboriosa, requereix de cartutxos, que poden ser poc econòmics i de vegades la seva reproduïbilitat depèn fortament de l'habilitat de l'operador.

En tots els mètodes posats a punt en aquesta tesi s'ha avaluat el clean-up mitjançant una extracció en fase sòlida dispersiva (d-SPE) amb C18 o PSA (amines primàries-secundàries). Aquesta neteja té per objectiu retenir els compostos més apolars (C18) i els àcids orgànics (PSA). Aquest pas depèn molt de la natura dels analits i de la matriu i trobem el cas dels nitroimidazols, que no requerien cap tipus de clean-up (s'obtenia millor resposta sense dur a terme aquest pas) o el de les avermectines i els NSAIDs, en què si calia fer-ho. Per l'anàlisi de les avermectines en mostres de múscul, es van obtenir bons resultats amb una d-SPE amb C18 en presència de $MgSO_4$ i es va concloure que l'addició de PSA en aquesta etapa no proporcionava cap millora a la resposta.

Pels NSAIDs es va assajar no fer clean-up i es va concloure que era necessari dur a terme el pas amb una d-SPE amb C18, i addicionant àcid ascòrbic per prevenir l'oxidació de la fenilbutazona i de l'oxifenbutazona, compostos sensibles a aquesta reacció.

En conjunt, les recuperacions absolutes dels mètodes posats a punt es troben en els intervals següents: per avermectines: 74-102%, per nitroimidazols: 42-80% i per NSAIDs: 78-98%, i es van obtenir reproduïbilitats molt satisfactòries, inferiors al 17% per les avermectines, al 18% pels nitroimidazols o al 17% pels NSAIDs.

4.3.2 La separació cromatogràfica

Pel que fa a la separació cromatogràfica dels compostos inclosos en cada grup, aquesta ha estat optimitzada provant columnes amb diferents fases estacionàries, sempre amb una temperatura del forn de 40°C.

Per a l'anàlisi de les avermectines es va usar una columna amb rebliment C18 tipus Luna (2)-HST (Phenomenex) (50 x 2,1 mm), de 2,5 µm de diàmetre de partícula. La fase estacionària Luna (2)-HST és recomanada per a la separació de compostos hidrofòbics, produïda sobre silice porosa "end-capped", tractada per substituir els silanols per grups trimetil-silil. Es tracta d'un tema rellevant ja que la fase mòbil usada en la separació de les avermectines és bàsica (trimetilamina 10 mM) i és molt propícia a la formació de cues en els pics

cromatogràfics. Hi ha autors que duen a terme la separació d'aquests compostos amb fases mòbils àcides i monitoritzen adductes en mode positiu amb Na^+ o NH_4^+ [67, 80, 98], però en el mètode posat a punt dins de la present memòria, les millors condicions eren en mode negatiu, monitoritzant els compostos desprotonats, $[\text{M-H}]^-$. Injectant les dissolucions individuals dels anàlits inclosos a l'estudi, es va observar que era necessari aconseguir una bona separació cromatogràfica, en especial per l'abamectina i l'eprinomectina, que comparteixen ions producte ($m/z=565$) i podrien donar lloc a problemes de cross-talk a la cel·la de col·lisió, ja que no es podrien diferenciar els que provenen d'un o de l'altre ió precursor. La separació es va aconseguir amb fases mòbils d'acetonitril i aigua 10mM en trietilamina, amb un gradient que partia d'un 55% d'acetonitril i arriba al minut 5 al 90% de modificador orgànic.

Pel que fa a l'anàlisi dels nitroimidazols, es van avaluar 2 columnes cromatogràfiques C18 amb la mateixa geometria (100 x 2,1 mm) i diàmetre de partícula (1.7 μm). Concretament es van comparar la columna Acquity BEH (Waters) i Kinetex-XB (Phenomenex). El primer tipus de fase estacionària està basat en una sílice porosa, mentre que la 2^a és de nucli sòlid, és a dir conté partícules de nucli no porós recobert d'una pel·lícula de 0.23 μm de gruix de sílice porosa funcionalitzada amb C18. S'ha establert la separació dels nitroimidazols en medi àcid, usant acetonitril i aigua amb àcid fòrmic al 0.1%. També en aquest cas és important aconseguir una bona separació cromatogràfica, ja que hi ha anàlits que comparteixen ió producte ($m/z=128$ per ornidazol, secnidazol i metronidazol o bé $m/z=140$ per ronidazol i pel metabòlit del dimetridazol, HMMNI) i poden donar lloc, a l'igual que en el cas de les avermectines, a fenòmens de cross-talk a la cel·la de col·lisió. Cal fer esment que el dimetridazol i el ronidazol donen lloc al mateix metabòlit hidroxilat, el dimetridazol hidroxil o HMMNI [70].

La columna Kinetex va proporcionar millors resultats en termes d'eficàcia, amb pics millor resolts i menors temps de retenció. També destaca la millor separació de l'ipronidazol-hidroxil i l'ornidazol (pics no resolts completament,

veure figura 4.3.1), i per tant va ser l'escollida a l'hora de posar a punt el mètode. La Figura 4.3.1 mostra la separació obtinguda en ambdues columnes.

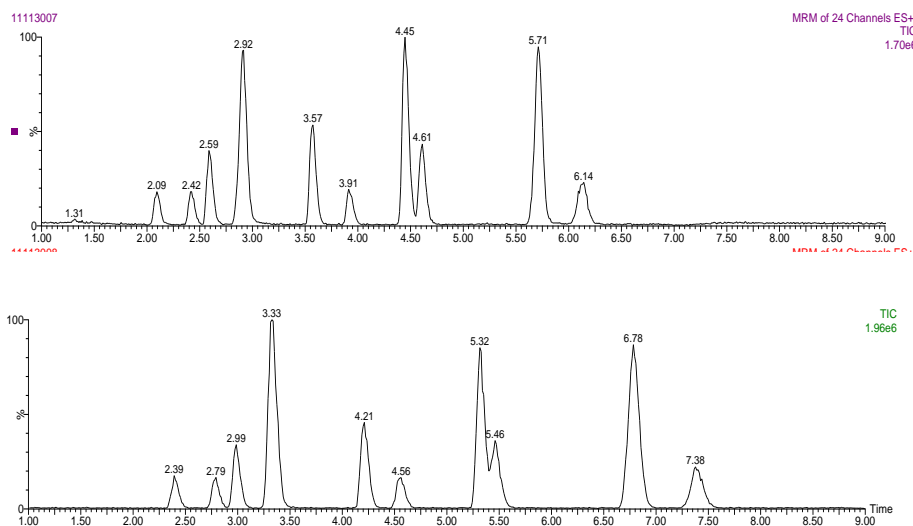


Figura 4.3.1: Separació de nitroimidazols obtinguda amb columnes cromatogràfiques C18 (100 x 2.1mm) i diàmetre de partícula 1.7 μm , amb fase mòbil ACN:H₂O amb 0.1% d'àcid fòrmic. Cabal: 0.4 ml/min. Superior: Phenomenex Kinetex. Inferior: Waters BEH.

En cap de les columnes asajades ha estat possible separar el dimetridazol (DMZ) i el ronidazol (RNZ), que elueixen en un únic pic cromatogràfic; tot i així, donat que fragmenten de forma diferent, la separació es pot resoldre mitjançant l'ús de l'espectrometria de masses.

Finalment en el mètode posat a punt per a l'anàlisi de NSAIDs, es van comparar dues columnes de naturalesa diferent, Kinetex-XB C18 (diàmetre de partícula 1.7 μm) i Kinetex bifeníl (diàmetre de partícula de 2.6 μm), ambdues de nucli sòlid amb les mateixes dimensions (100 x 2.1 mm). En les 2 columnes l'ordre d'elució d'alguns anàlits era diferent, evidenciant els diferents fenòmens en què es basa la separació. La fase estacionària bifeníl ofereix una selectivitat millorada, respecte les fases C18 pels compostos amb anells aromàtics, com és el cas del NSAIDs.

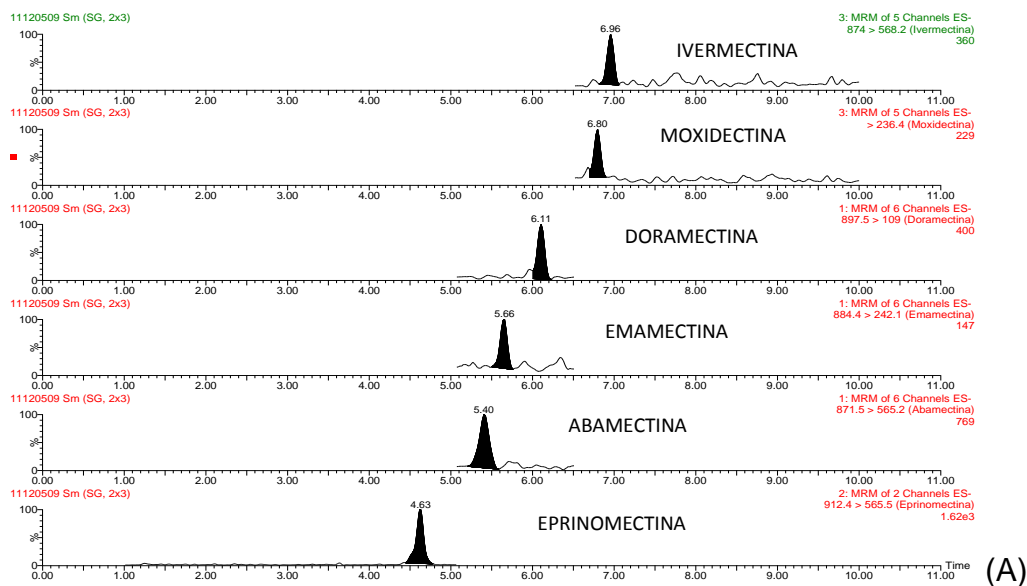
En el cas de l'anàlisi d'aquests compostos es va treballar amb fases mòbils que contenien àcid fòrmic al 0.1%, donat que s'aconseguia millorar l'eficàcia de la

separació i la simetria dels pics, en comparació amb les separacions obtingudes en absència d'àcid a la fase mòbil. Aquest estudi ens mostra la importància de les fases estacionàries escollides per a la separació cromatogràfica. En qualsevol cas, els cabals usats han estat sempre en el interval 0.3-0.4 mL/min. La separació cromatogràfica va ser adequada en tots els casos, excepte en el cas del flunixin (ESI-) i de l'àcid meclofenàmic (ESI+), que coelueïen a $t_r = 5,7$ min.

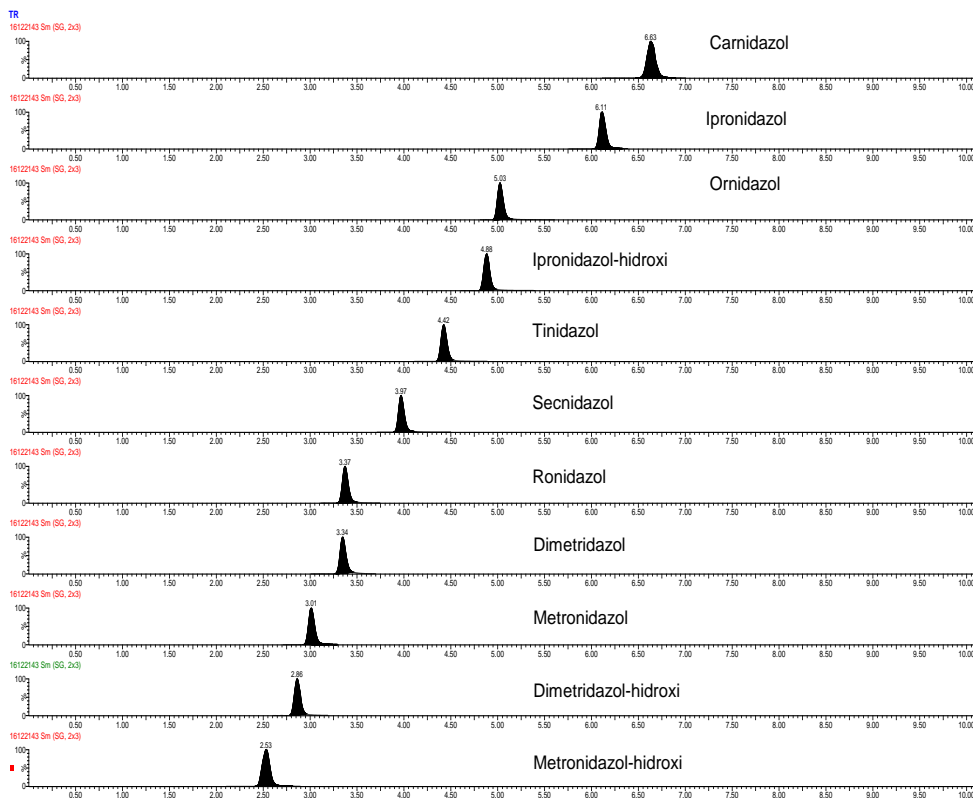
Finalment, pel que fa als mètodes LC-HRMS/MS per a les avermectines i NSAIDs, les separacions cromatogràfiques no coincideixen amb les optimitzades en espectrometria de masses de baixa resolució. L'anàlisi de mostres en el laboratori es duu a terme fonamentalment en baixa resolució i la injecció en sistemes HRMS es realitza només en cas d'haver de resoldre dubtes. Les columnes instal·lades en el sistema HRMS són usades per diferents separacions cromatogràfiques i no són específiques d'un mètode analític concret. Així tenim que tant per l'anàlisi d'avermectines com pels NSAIDs es va usar una columna Kinetex-XB de (100 x 2,1 mm) i de diàmetre de partícula 1,7 μm .

Podem apuntar que, tot i que cada mètode s'ha optimitzat en una columna cromatogràfica diferent, les fases mòbils optimitzades són força transversals al treball de laboratori. La fase mòbil àcida, basada en l'addició d'àcid fòrmic a una concentració del 0,1% tant per l'aigua com pel dissolvent aquós és molt habitual en el treball en cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses. A la figura 4.3.2 es poden veure els cromatogrames de les separacions optimitzades en mostres dopades al LQ i extretes. (A): avermectines, (B): nitroimidazols, (C): NSAIDs.

Anàlisi de residus de medicaments d'ús veterinari



(A)



(B)

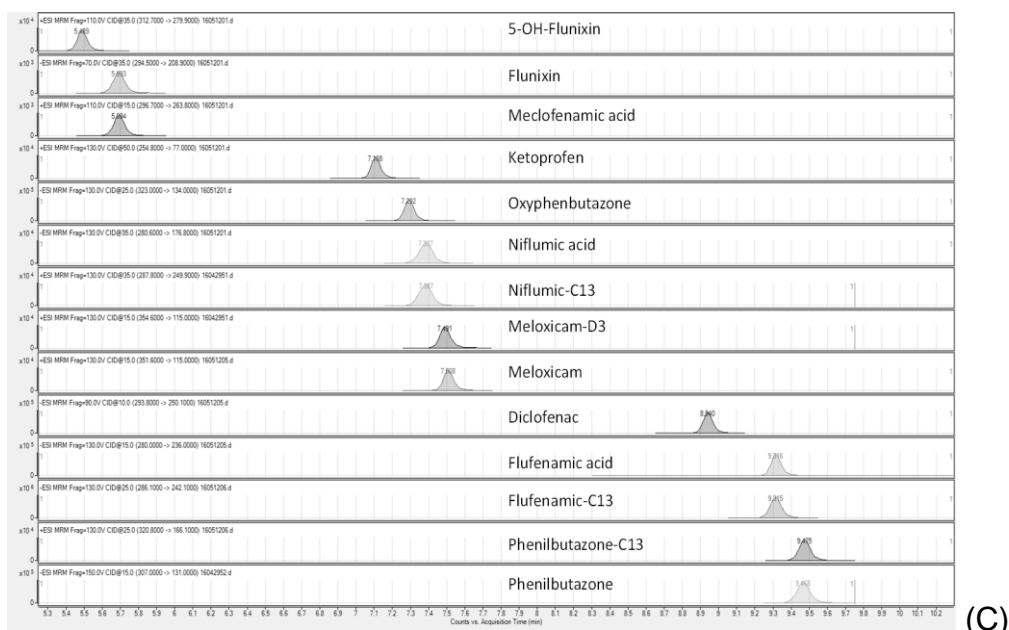


Figura 4.3.2: Cromatogrames dels mètodes LC-QqQ-MS/MS desenvolupats. (A): avermectines en mostra de múscul a 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; (B): nitroimidazols en mostra de múscul a 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$; (C): NSAIDs en mostra de llet a 2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

4.3.3 Caracterització per espectrometria de masses.

En aquest apartat es comentaran les diferents etapes de la determinació per MS/MS, concretament la ionització, la selecció d'ions i la determinació dels compostos, així com la confirmació de resultats dubtosos per espectrometria de masses d'alta resolució.

Els anàlits han estat infusióats en els diferents instruments usats amb la finalitat d'establir les condicions òptimes de determinació.

En el cas de les avermectines, la determinació pot ser tant usant polaritat positiva com negativa. D'entre els treballs publicats se'n van trobar alguns que usaven la sonda APCI [44], que va ser descartada en favor de la sonda ESI, donada la facilitat d'ús d'aquesta última. A la bibliografia hi ha tota una sèrie de treballs publicats en què es monitoritzen en mode positiu, els adductes de les avermectines amb sodi o amoni [67, 80, 98], depenent de l'autor i sempre en mode positiu. Quan es va intentar reproduir aquestes condicions al laboratori, no es va arribar a resultats satisfactoris. Per exemple, seleccionant l'ió de l'adducte de la ivermectina amb sodi ($m/z=898.3$) es va trobar que calien voltatges molt elevats per poder fragmentar-lo i obtenir ions producte

característics (per exemple el de $m/z=755$), la qual cosa és coherent amb el fet ja descrit que els adductes són molt estables i fragmenten amb dificultat. D'altra banda, no es van obtenir altres ions producte i els resultats monitoritzant l'ió $m/z=755$ van ser força variables. Seguidament es va intentar monitoritzar els adductes amb amoni, tal com proposen Ionue et al [67] o Durden et al [59], amb diferents concentracions d'ió amoni a la fase mòbil, però en cap cas es van obtenir resultats satisfactoris. Finalment es va abandonar la idea d'ionitzar les avermectines en mode positiu i les condicions adoptades van ser en mode negatiu, usant fases mòbils bàsiques, concretament amb mesclures de trietilamina 0.1% en aigua i acetonitril, tal com proposa Durden [59], que rendia resultats satisfactoris, amb una fragmentació adequada dels ions precursors.

Quan es van establir les condicions de detecció per espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS), es va observar que les avermectines, al contrari del que ocorre amb el QqQ, ionitzen i es poden detectar tant en mode positiu com en mode negatiu, la qual cosa indica que la ionització té lloc en condicions diferents; l'espectròmetre Q-exactive disposa d'una font d'ionització HESI, és a dir Heated Electrospray, que millora el rendiment de la ionització. A més a més, la determinació es basa en premisses diferents ja que després de la selecció al quadrupol, els ions segueixen uns processos de fragmentació previs a l'anàlisi d'alta resolució. Aquests processos expliquen les diferències en la determinació dels anàlits.

En els cas dels QqQ, existeixen diferents modes de treball (scan de precursors, scan de productes, neutral loss, MRM), però el millor en termes de sensibilitat és aquest últim. A l'equip Q-Exactive, els modes de treball, tal com s'ha descrit a la introducció, són diferents (Full scan, All-ion-fragmentation, t-SIM, t-SIM-data dependent, t-MS/MS, etc). En els mètodes posats a punt en el present treball, s'han explorat diferents modes de treball amb l'objectiu final d'obtenir la màxima sensibilitat i eliminar la major part possible d'interferències.

En el cas de l'anàlisi d'avermectines es va treballar primerament en mode Full scan, tant en mode negatiu, com en mode positiu, determinant els adductes amb Na^+ a una resolució de 70.000 i treballant amb un error de massa inferior a 5 ppm. Tan sols l'abamectina, la doramectina i la ivermectina van donar un bon

senyal de l'adducte amb sodi. En mode negatiu, tots els anàlits van donar bona resposta.

Es va comprovar la sensibilitat del mètode treballant en Full scan per veure si era possible arribar als nivells de concentració del límit de quantificació establert per les avermectines amb el triple quadrupol. En mode positiu i en mostres de múscul dopades a 2.5 µg/kg, es podien detectar tots els ions precursors, però a l'hora de confirmar amb productes de fragmentació, no s'obtenia senyal per la doramectina i altres compostos, com l'emamectina donaven resposta poc intensa. En mode negatiu, alguns dels precursors ja ni tan sols es detectaven, com és el cas de la moxidectina, la doramectina i l'emamectina, per tant calia provar altres modes de treball de l'espectròmetre.

Es va provar a usar un mode de selecció (t-SIM-ddpp) i es va comprovar que en mode negatiu es podien arribar a confirmar per presència d'ions producte tots els anàlits en mostra dopada a nivell de 3 µg/kg. Havent vist que aquest mode de treball és força més sensible, es van explorar els límits de la tècnica dopant mostres en concentracions decreixents i injectant els extractes; concretament els nivells de dopatge van ser: 1 µg/kg, 0.7 µg/kg, 0.5 µg/kg, 0.3 µg/kg i 0.15 µg/kg. Els resultats de l'estudi van mostrar que en mode negatiu el senyal per l'emamectina es perdia a la concentració de 0.7 µg/kg, és a dir, que s'obtenia un límit de quantificació confirmable a nivell de 1 µg/kg. En mode positiu es confirmaven mitjançant la presència d'ió producte tots els anàlits fins al nivell de 0.5 µg/kg. La conclusió de l'estudi va ser la major sensibilitat de l'HRMS a causa de la millora de la relació senyal/soroll, per l'eliminació d'interferències i la millor resposta del mode positiu, que permetia baixar nivells de concentració confirmables de l'ordre de 5 vegades (2.5 µg/kg en LRMS front a 0.5 µg/kg en HRMS).

La conclusió de l'estudi fet amb HRMS és que la tècnica, donada la seva elevada selectivitat, pot arribar a millorar la sensibilitat del mètode en comparació amb els resultats obtinguts en baixa resolució i és aplicable a l'anàlisi de mostres de forma rutinària. A més a més, monitoritzar ions en alta resolució aporta una gran fiabilitat als resultats.

La figura 4.3.3 mostra el cromatograma d'una mostra de múscul dopada amb avermectines al nivell de 0.5 µg/kg.

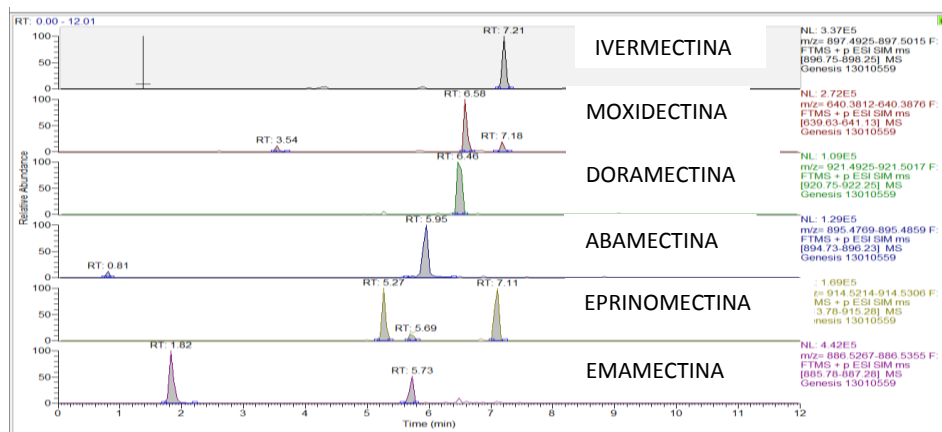


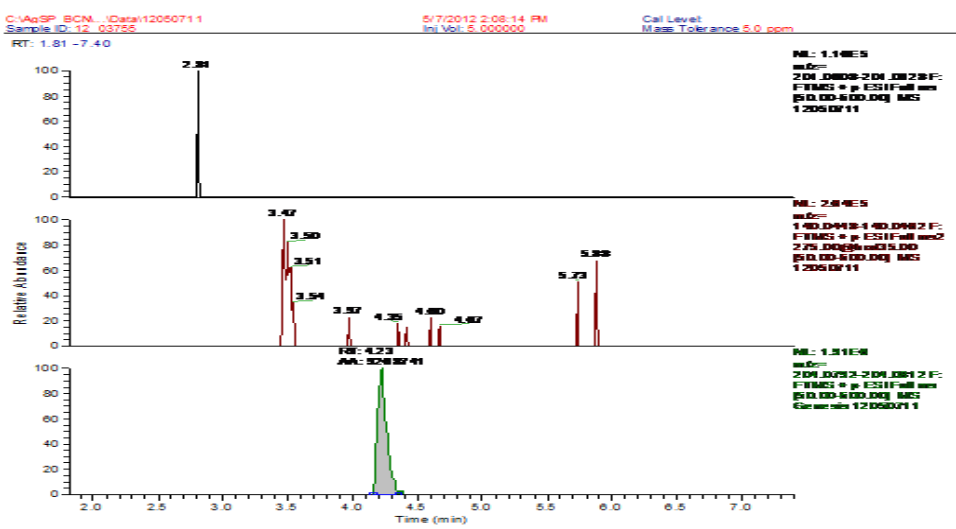
Figura 4.3.3. Cromatograma LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS d'ions precursors en HESI+ en mostra de múscul dopada a nivell de 0.5 µg/kg amb mescla d'avermectines.

Pel que fa a l'anàlisi dels nitroimidazols, són compostos que s'ionitzen en mode positiu i per tant, es va treballar en LRMS sempre amb la sonda ESI+ i amb una fase mòbil que contenia àcid fòrmic al 0.1%, tant en la part aquosa com en l'acetonitril, per afavorir la protonació dels anàlits. Tot i que els nitroimidazols responen adequadament en baixa resolució, i habitualment, les mostres analitzades no mostren presència d'aquests anàlits, de vegades és necessari confirmar resultats usant HRMS.

Seguidament es presenten dos exemples de l'aplicació de la HRMS per a la confirmació de resultats en l'anàlisi de nitroimidazols.

Els nitroimidazols són compostos prohibits i normalment les mostres analitzades no mostren presència d'aquests anàlits. Tot i això, de vegades durant l'anàlisi rutinària de mostres mitjançant UHPLC-QqQ-MS/MS s'observa algun pic al temps de retenció d'algun dels anàlits que compleix el criteri de l'ion ratio, tal com estableix la Decisió 657/2002. Per confirmar que no es tracta de cap interferència isobàrica amb el mateix temps de retenció, sinó que realment es tracta de la presència d'un compost prohibit, amb totes les implicacions que això comporta, convé confirmar mitjançant UHPLC-HRMS/MS els resultats.

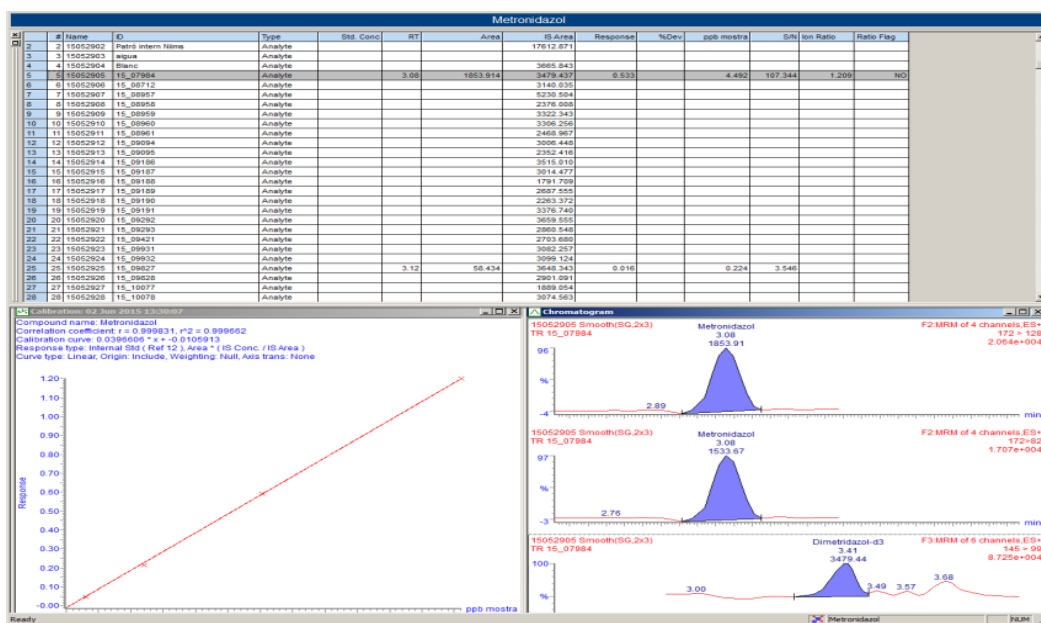
Anàlisi de residus de medicaments d'ús veterinari



(b)

Figura 4.3.4. Cromatograma d'una mostra de múscul oví sospitosa de contenir ronidazol: (a) LC-QqQ-MS/MS, i (b) LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS (error <5 ppm i Rs=140.000)

El segon exemple és el d'una mostra analitzada per LC-QqQ-MS/MS (Figura 4.3.5 (a)), que mostrava presència de metronidazol, tant a la transició principal com la secundària i que es confirmava mitjançant ion ratio; al ser un resultat no habitual, es va analitzar per LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS (Figura 4.3.5 (b)), confirmant-se el resultat positiu, ja que amb un error de massa < 5 ppm i a una resolució de 70.000, s'hi observa tant l'ió precursor com l'ió producte, amb la relació d'abundàncies que confirma la presència de metronidazol.



(a)

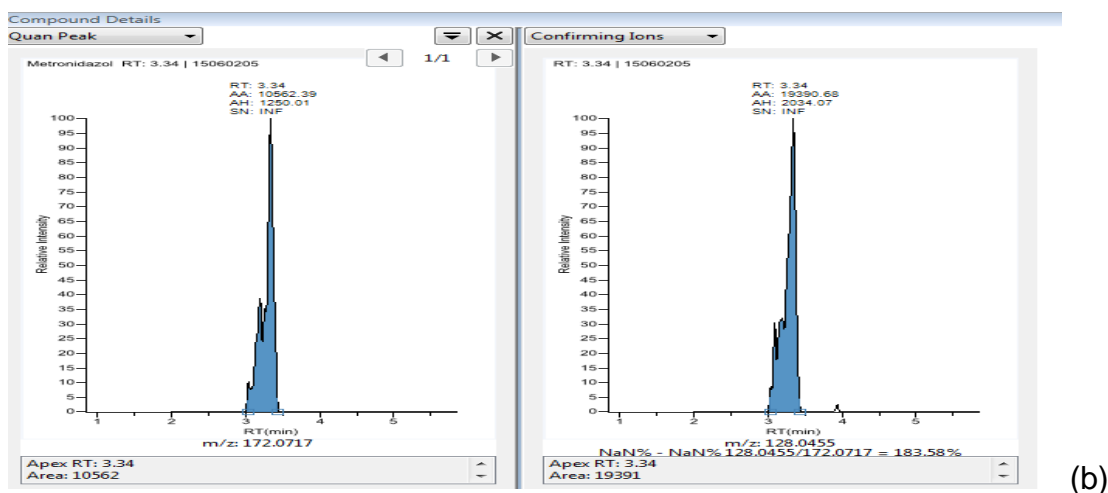


Figura 4.3.5. Cromatogrames d'una mostra amb presència de metronidazol: (a): LC-QqQ-MS/MS, (b): LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS (error massa < 5 ppm i RS= 70000), ió precursor (esquerra) i ió producte (dreta)

Finalment, pel que fa referència als antiinflamatoris no esteroideus, al ser un grup compost per nombroses substàncies pertanyents a diferents famílies, ja en l'optimització de les condicions d'espectrometria de masses es va veure que calia treballar amb canvis de polaritat dins la mateixa injecció cromatogràfica, amb l'objectiu d'evitar haver de fer doble injecció de cada mostra (en mode positiu i mode negatiu). Per tant, calia tenir, com en els casos anteriors, una bona separació cromatogràfica i usar un espectròmetre que fos prou ràpid en el canvi de polaritat. L'espectròmetre utilitzat, un Agilent QqQ 6460 té com a característica un temps de 30 ms necessari pel canvi de polaritat, que calia fer compatible amb l'elució dels diferents compostos. L'amplada de pic en aquest cas era a l'entorn de 12-18 segons a la base del pic. Aquesta amplada permetia uns 400 canvis de polaritat aproximadament durant l'elució del pic cromatogràfic, la qual cosa permetia detectar els pics en mode positiu i negatiu simultàniament de forma adequada, amb suficient nombre de punts per pic.

Pel que fa a l'aplicació de l'espectrometria de masses d'alta resolució a l'anàlisi dels NSAIDs, cal dir que la majoria dels anàlits ionitzen tant en mode positiu com en mode negatiu, i que es van escollir les condicions òptimes per a cada compost i sobre tot, amb la intenció de baixar el LQ del diclofenac per assolir el nivell de concentració legislat (0.1 µg/kg). El mode de treball escollit de l'equip és el t-MS/MS, en què s'utilitza una energia de col·lisió intermitja que permeti monitoritzar ions precursor i producte a la vegada, no fragmentant

completament el precursor. La confirmació dels compostos es fa mitjançant la relació d'abundància producte/ precursor.

Per comprovar la capacitat del mètode per a l'anàlisi confirmatòria a nivells baixos de concentració, es van dopar mostres de llet a 1 µg/kg, 0.7 µg/kg, 0.5 µg/kg, 0.3 µg/kg, 0.1 µg/kg i 0.05 µg/kg de NSAIDs. Com a conclusió, es pot esmentar que tots els compostos es van confirmar al nivell de 1 i de 0.7 µg/kg. A nivell de 0.1 µg/kg, no es va detectar l'àcid meclofenàmic, però sí la resta de compostos i es van poder confirmar els anàlits: ketoprofè, niflúmic, flufenàmic, flunixin, 5-OH-flunixin, oxfenbutazona, diclofenac i meloxicam i treballant a una resolució de 70.000 i permetent un error de massa, de com a màxim 5 ppm. És especialment important el fet que usant HRMS s'arribi a poder confirmar el DC a nivell de 0.1 µg/kg, cosa que no va ser possible amb l'ús d'espectrometria de masses de baixa resolució (LRMS).

La figura 4.3.6 mostra el cromatograma d'una mostra de llet dopada a 0.1 µg/kg.

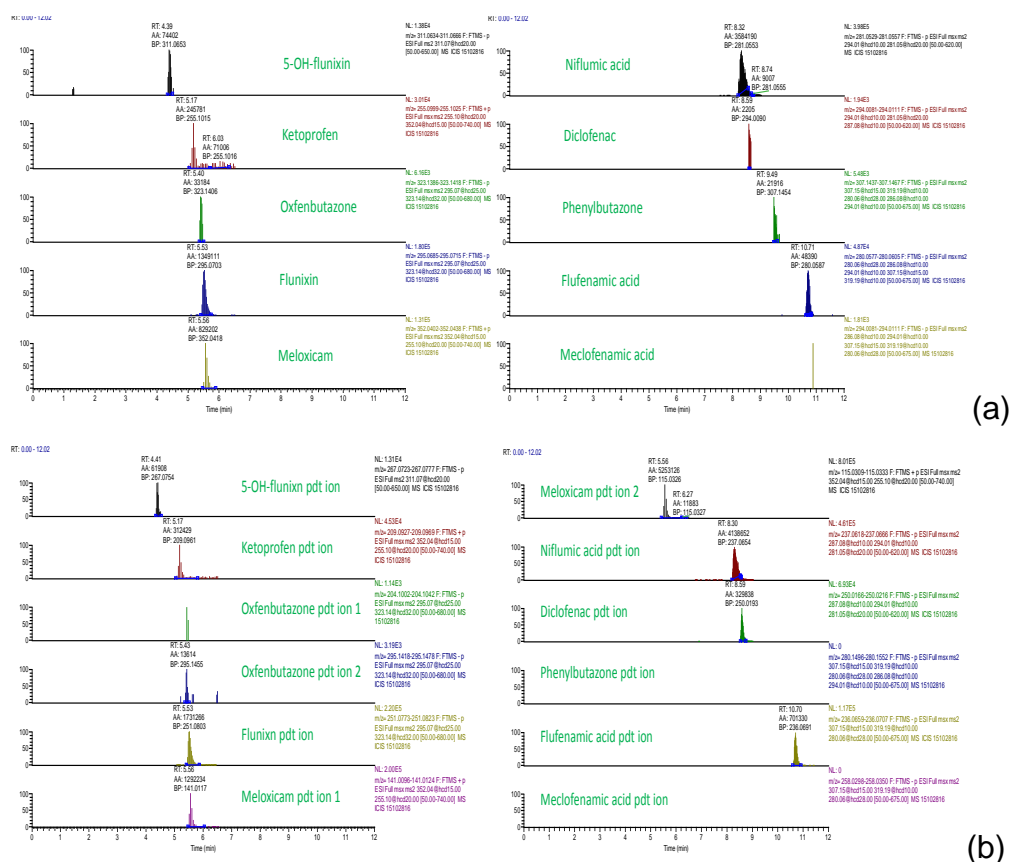


Figura 4.3.6: cromatograma LC-Q-Orbitrap-HRMS/MS d'una mostra de llet dopada amb NSAIDs (0.1 µg/kg): (a): ions precursors; (b): ions producte.

4.3.4 Validació

Els mètodes presentats en aquesta memòria han estat validats segons les directrius marcades per la Decisió 657/2002/CE amb resultats satisfactoris. Les matrius usades per a la validació han estat representatives del treball al laboratori.

En el cas de l'anàlisi d'ivermectines es van validar completament les matrius múscul i greix, tot i que el mètode s'ha aplicat posteriorment a altres matrius (llet i fetge) ja que al laboratori es treballa en un abast d'acreditació flexible sota la norma ISO/IEC/17025 [100], descrit a la norma tècnica NT-18 d'ENAC [101], la qual cosa implica que es poden emetre resultats amb segell d'acreditació si es duen a terme unes determinades comprovacions del mètode analític, encara que aquestes matrius no hagin estat incloses en l'abast previ d'acreditació del laboratori, ni hagin estat completament validades.

En el cas de l'anàlisi de nitroimidazols, la matriu validada va ser el múscul comprovant diferents espècies (porc, xai, vedella, pollastre i conill). De l'estudi es va concloure que no hi havia diferències significatives entre espècies, excepte en el cas de múscul de vedella, per al que s'obtenien recuperacions inferiors quan es quantificava amb patrons preparats amb matriu de múscul de porcí. També es va comprovar el funcionament del mètode amb altres tipus de matriu d'espècie porcina: fetge, ronyó i retina. Es va observar que les recuperacions en múscul i en ronyó són similars i que en la matriu fetge són inferiors (Figura 4.3.7), la qual cosa posa de manifest que per analitzar mostres de fetge cal calibrar amb patrons preparats amb la matriu fetge.

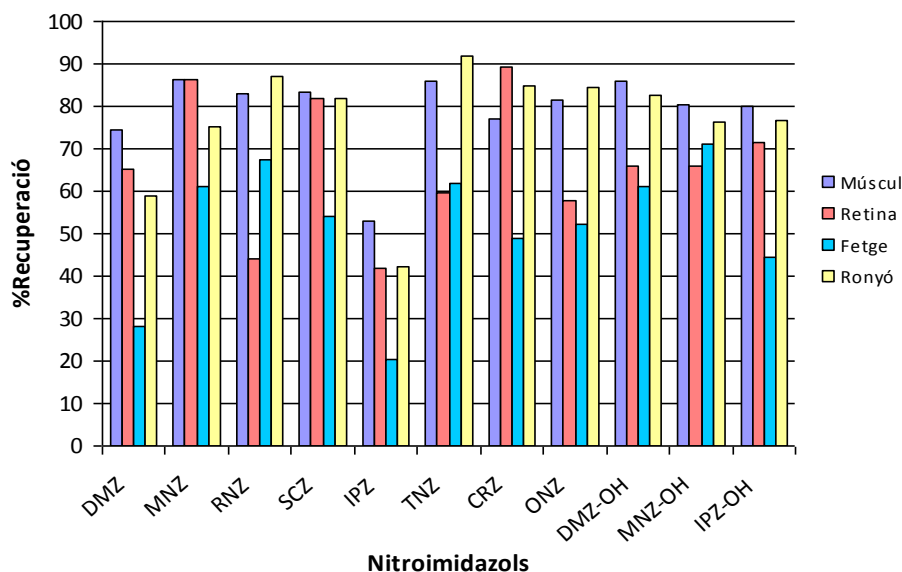


Figura 4.3.7: recuperacions en diferents tipus de matriu.

Finalment, el mètode d'anàlisi de NSAIDs es va validar sobre llet semi-desnatada, comprovant prèviament l'equivalència entre altres matrius de treball del laboratori: llet desnatada i llet sencera.

4.3.5 Control de qualitat extern

La participació en exercicis interlaboratori és una eina fonamental per assegurar la qualitat dels resultats; en el cas dels mètodes presentats en aquesta memòria, s'ha participat en els exercicis organitzats per Fapas i pel Laboratori Nacional de Referència.

No sempre les matrius dels exercicis són les que han estat validades. Així, el mètode d'anàlisi d'ivermectines s'ha provat d'aquesta manera en matriu múscul, fetge, llet i peix. El mètode d'anàlisi de nitroimidazols s'ha provat en matriu ou i el mètode d'anàlisi de NSAIDs s'ha provat en matriu ronyó. Els resultats obtinguts han estat molt satisfactoris (taula 4.3.1), la qual cosa demostra la transversalitat dels mètodes per a ser aplicats a altres matrius. Destacar que únicament hi ha un resultat amb $Z < -3$ per a la determinació de metronidazol en ou de gallina, a l'exercici 02268 per l'anàlisi de nitroimidazols organitzat per Fapas.

Taula 4.3.1. Resultats dels exercicis interlaboratori en què s'ha participat amb els mètodes d'anàlisi proposats.

Mètode	Organit-zador	Exercici.	Matriu	Anàlit	Resultat lab. (µg/kg)	Z
Avemec-tines	Fapas	02190	Múscul boví	doramectina	46.4	+0.4
				ivermectina	28.2	+0.6
	Fapas	02263	Fetge porcí	ivermectina	118.7	+0.2
	Magrama (*)	---	Llet bovina	abamectina	7.1	+0.3
				moxidectina	41.7	-0.69
	Fapas	02260	Peix	emamectina	174.6	+0.9
				ivermectina	12.6	0.0
	Fapas	02234	Carn en llauna (boví)	ivermectina	26.1	-0.4
eprinomectin				69.6	+0.9	
Nitroimi-dazols	Fapas	02268	Ou gallina	dimetridazol	1.2	+0.2
				metronidazol	1.2	-3.8
				dimetridazol-hidroxi	6.4	+0.4
	Fapas	02304	Ou gallina	dimetridazol	1.08	-0.5
				dimetridazol hidroxi	7.1	+1.8
				ipronidazol hidroxi	5.1	+2.3
NSAIDs	Fapas	02274	Llet bovi	fenilbutazona	7.0	0.0

(*) Magrama: Ministeri d'Agricultura i Alimentació.

5. ANÀLISI DE TOXINES MARINES
LIPOFÍLIQUES

5.1. Introducció

En aquest capítol es presenta el mètode desenvolupat per a l'anàlisi de toxines marines lipofíliques en bivalves. El mètode consta d'una extracció basada en la metodologia QuEChERS [55] i la determinació mitjançant cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem d'alta resolució amb un equip tipus Q-Orbitrap. Aquests trets fonamentals representen una novetat als mètodes analítics aplicats fins al moment.

El grup de compostos inclosos en el present estudi són les toxines lipofíliques legislades per la UE que tenen un pes molecular entre 600 i 2000 Da: el grup de l'àcid okadaic (OA) i les dinofisistoxines (DTXs), les pectenotoxines (PTXs), els azaspiracids (AZAs), les imines cícliques (CIs) i el grup de les yessotoxines (YTXs).

El mètode és una proposta alternativa al mètode establert pel Laboratori Europeu de Referència per a Toxines Marines (SOP-EURLMB [102]), amb seu a Vigo (Galícia, Espanya), que es fonamenta en una extracció amb metanol, seguida de la injecció de l'extracte al cromatògraf de líquids acoblat a espectròmetre de masses de baixa resolució, tipus triple quadrupol (QqQ), obviant el pas de la purificació dels extractes.

El capítol està estructurat en una introducció a les toxines marines i una revisió de la metodologia analítica existent, una part de resultats, en què s'inclou la publicació científica on es descriu el mètode d'anàlisi posat a punt, i una discussió dels resultats obtinguts.

Tal com s'ha comentat en el capítol 3 de la present memòria, les toxines marines són contaminants naturals produïts per microalgues del tipus dinoflagelats en determinades condicions climàtiques. Les microalgues formen part de la dieta dels mol·luscs bivalves i, moltes de les biotoxines que generen, en tenir caràcter lipòfil, s'acumulen majoritàriament en el seu hepatopàncrees. Les toxines marines no són compostos tòxics per als mol·luscs però sí ho són per als humans que consumeixen bivalves contaminats.

L'anàlisi de toxines marines va adquirint progressivament més importància degut a factors com el canvi climàtic, que ha fet que episodis de proliferació d'algues, anomenats popularment com "marees roges", siguin cada cop més

freqüents (Fig 5.1.1). Aquestes marees roges són capes d'algues, bàsicament dinoflagelats, que posseeixen la característica de tenir molta mobilitat i que poden desplaçar-se fàcilment, tendint a viure en les capes més superficials. L'escalfament progressiu del planeta, l'alteració dels ecosistemes a causa de la pesca massiva, etc. afavoreixen aquests episodis, i són particularment importants a llocs com el Golf de Mèxic o Nova Zelanda, encara que es produeixen al llarg de totes les costes del món.



Figura 5.1.1. Imatge d'un episodi de marea roja

En la introducció general s'ha fet una revisió del marc legislatiu europeu relacionat amb l'anàlisi de les toxines marines en aliments d'origen marí. Fins fa pocs anys, el control es duia a terme usant mètodes biològics [34], que implicaven l'experimentació amb animals de laboratori, però aquests mètodes han estat posats en qüestió per diferents motius, no solament d'origen ètic [103]. El Reglament 15/2011 de la UE ha fet obligatori, a partir de 2015, el control usant mètodes LC-MS/MS [36].

5.1.1. Toxines marines estudiades i mecanisme d'acció.

Les toxines marines es classifiquen tradicionalment segons la seva lipoficitat (toxines hidrofíliques i toxines lipofíliques) o bé segons els seus efectes en la salut humana; així trobem les toxines paralítiques (PSP), les amnèsiques (ASP), les diarriques (DSP), les neurotòxiques (NSP), etc [28, 104].

Les toxines marines hidrofíliques tenen una massa molecular inferior a 500 Da; estan representades bàsicament per toxines que tenen efectes amnèsics o ASP, com l'àcid domoic (DA) (Figura 5.1.2), o de tipus paralitzant o PSP, com la saxitoxina (SXs), la neosaxitoxina (NSXs) i les goniautoxines (GNTXs) (Figura 5.1.3).

S'han identificat fins ara 8 isòmers de l'àcid domoic (isodomoic A-H) i un diastereòmer (C5'-Diastereòmer), que presenten toxicitat molt menor que l'àcid domoic [29, 126].

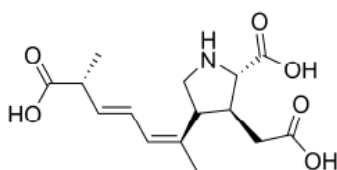


Figura 5.1.2: Àcid domoic

Les toxines PSP constitueixen un grup de compostos amb una estructura molt semblant, derivats de la tetrahidropurina; es divideixen en 4 subgrups segons els radicals: a) carbamat (STX, neoSTX i gonyautoxines (GNTX1-4); b) N-sulfo-carbamoil (GNTX5-6, C1-4); c) decarbamoil (dc-): (dcSTX, dcneoSTX, dcGNTX1-4); d) desoxidecarbamoil (do-): (doSTX, doneoSTX i doGNTX1).

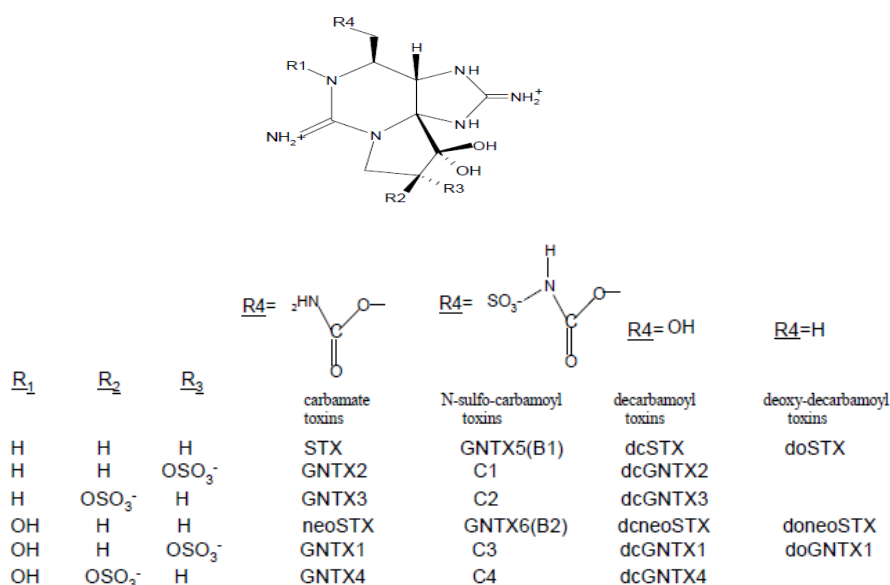


Figura 5.1.3: Estructura de les toxines PSP

Pel que fa a les toxines lipofíliques, hi ha diferents grups. Entre ells podem citar el grup de les brevetoxines (amb efectes DSP), les de la família de l'àcid okadaic, que causen la síndrome DSP, els azaspiracids, que causen la síndrome AZP, les yessotoxines, els espiròlids i les gimnodimidines.

Les brevetoxines actuen sobre les cèl·lules, obrint els canals de sodi i provocant que el sodi del medi entri dins la cèl·lula i bloquegi el mecanisme d'excitació neuronal. S'han descrit episodis d'intoxicació no solament per ingestió sinó també per inhalació d'aerosols produïts per onades a la costa [35]. Als Estats Units la quantitat legislada és de 800 µg FET de brevetoxina-2 (PbTX-2)/ kg bivalve. La UE no ha establert legislació per aquests tipus de toxines, ja que fins al moment no han estat detectades a Europa [35]. A la figura 5.1.4, es mostra la brevetoxina-2, compost al qual es refereix la toxicitat de la resta de compostos de la família

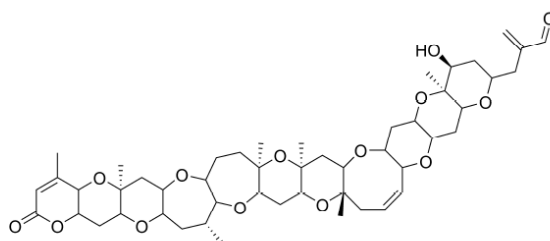
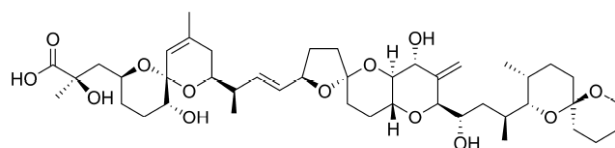
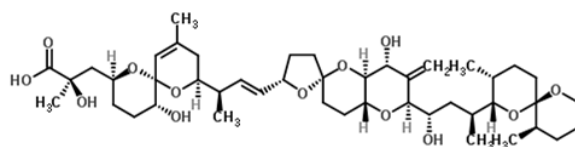


Figura 5.1.4. Brevetoxina-2 (PbTX-2)

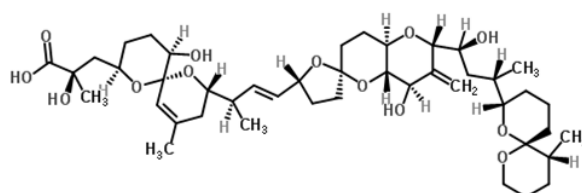
Les toxines DSP del grup de l'àcid okadaic, que inclou a més de l'àcid okadaic (OA), les dinofisistoxines DTX-1 i DTX-2 i les formes esterificades (DTX-3), inhibeixen la serina i la treonina fosfatasa. Aquesta inhibició porta a una hiperfosforilització de les proteïnes que regulen la permeabilitat de la cèl·lules, amb resultat de pèrdua de fluids cel·lulars. A més de tenir efectes gastrointestinals, s'ha demostrat que són promotors de tumors en ratolins [35]. La figura 5.1.5 mostra les estructures de les toxines del grup, així com una forma esterificada del grup DTX-3, resultat de l'esterificació de la DTX-1 per transformació metabòlica.



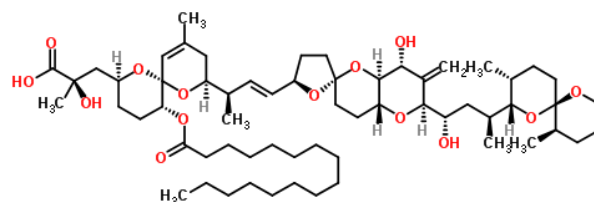
Àcid okadaic (OA)



Dinofisistoxina-1 (DTX-1)



Dinofisistoxina-2 (DTX-2)



Dinofisistoxina-3 (DTX-3)

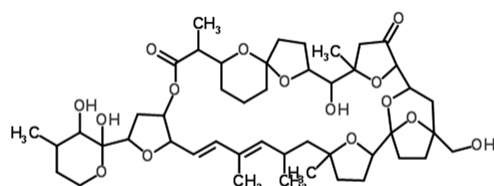
Figura 5.1.5. Estructura de toxines marines del grup de l'àcid okadaic

La legislació europea estableix que els resultats de les anàlisis s'han d'expressar en equivalents d'àcid okadaic, el compost més tòxic del grup.

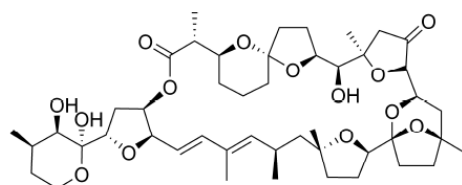
La normativa 15/2011/CE estableix que a més de les toxines del grup de l'OA cal determinar els seus ésters, per tant, una part de l'extracte haurà de ser hidrolitzada a una temperatura de 76°C en medi bàsic durant 40 minuts per determinar el DTX-3. S'injecta la mostra hidrolitzada, es compara l'àrea de la

DTX-1 en les 2 injeccions i s'observa si existeix creixement del pic. L'augment de l'àrea serà atribuïda a la presència de DTX-3 en la mostra.

Les pectenotoxines (PTX) s'inclouen sovint en el grup de les toxines diarreiques, DSP, ja que normalment apareixen conjuntament amb l'OA i les DTX; tot i així, intrínsecament, les PTX no tenen efectes gastrointestinals; se n'han descrit més de 15 anàlegs. Les espècies predominants a Europa són la pectenotoxina-2, la pectenotoxina-2 seco-àcid i 7-epi-pectenotoxina-2 seco-àcid. El compost de referència respecte el qual cal expressar el resultat de les anàlisis dels compostos d'aquesta família és la pectenotoxina-2 (PTX-2 equivalents), ja que és el compost predominant i a partir d'aquesta es formen la resta de toxines per reaccions d'oxidació, segons l'EFSA [42]. Tot i així, la concentració dels metabòlits és molt menor en relació a la PTX-2 i no hi ha constància d'episodis d'intoxicació en humans a causa de la presència de toxines d'aquest grup. La figura 5.1.6 mostra l'estructura de les pectenotoxines estudiades en aquesta tesi.



Pectenotoxina-1(PTX-1)

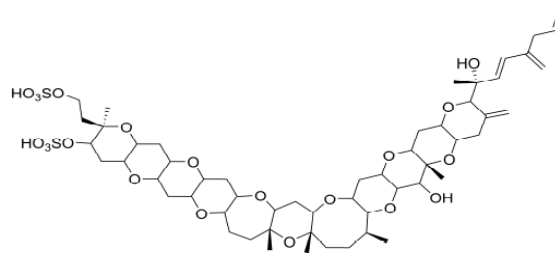


Pectenotoxina 2 (PTX-2)

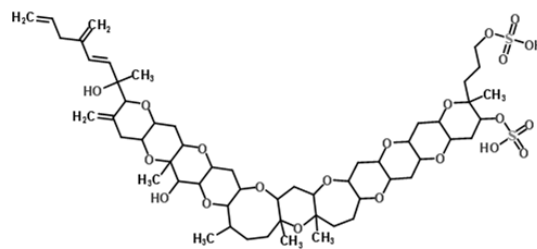
Figura 5.1.6. Estructura de les pectenotoxines PTX-1 i PTX-2

Les yessotoxines (YTXs) són un grup de toxines del que se n'han descrit més de 90 anàlegs. Les toxines més importants del grup segons l'EFSA [105] són la

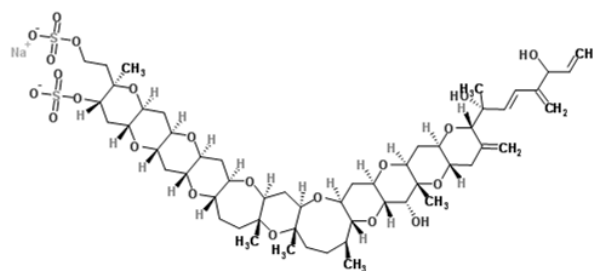
yessotoxina, el seu metabòlit 45-hidroxi i el seu anàleg 1 (homoyessotoxina) [42]. La seva toxicitat en ratolins és elevada, mostrant efectes cardiotòxics, hepatotòxics i neurotòxics, però en humans no s'han observat aquests efectes. De fet, no s'han donat casos a Europa d'intoxicacions en humans per yessotoxines [35]. Com en els cas de les pectenotoxines, s'inclouen sovint en el grup de les DSP, encara que no tinguin aquest tipus d'efecte, per la seva ocurrència conjunta amb l'OA i les DTX. La figura 5.1.7 mostra l'estructura dels compostos més abundants de la família.



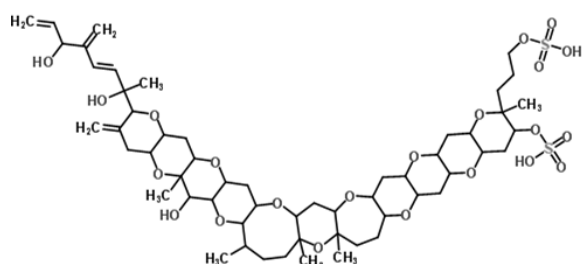
Yessotoxina (YTX)



Homoyessotoxina (hYTX)



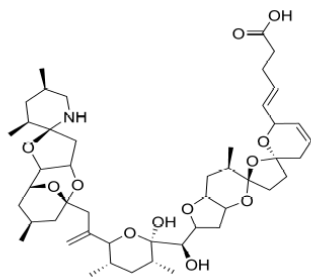
45-Hidroxi-yessotoxina (45-OH-YTX)



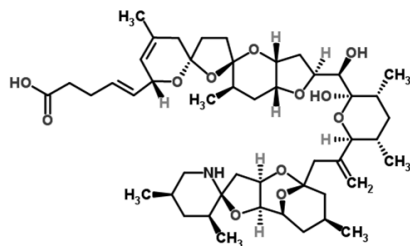
45-Hidroxi-homoyessotoxina (45-OH-hYTX)

Figura 5.1.7. Estructura de les yessotoxines

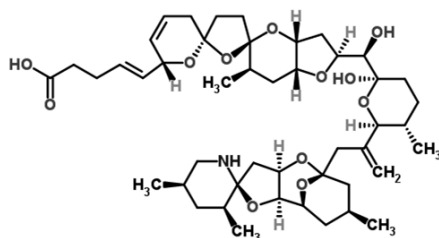
Pel que fa als azaspiràcids (AZAs), se n'han descrit 24 anàlegs diferents, tot i que els més abundants són AZA-1, AZA-2 i AZA-3, tots ells inclosos en el present estudi. La seva toxicitat està relacionada amb efectes diarreics, però a més, en el cas dels ratolins, provoquen una paràlisi que progressa lentament. La seva concentració s'expressa com equivalents d'AZA-1. El nivell màxim admissible segons la legislació europea és 160 µg equivalents d'AZA-1/kg bivalve, tot i que l'EFSA ha emès una opinió en què considera com a nivell més segur 30 µg AZA-1/kg bivalve [106]. La figura 5.1.8 mostra l'estructura dels azaspiràcids estudiats en aquesta tesi.



Azaspiracid-1(AZA-1)



Azaspiracid-2(AZA-2)



Azaspiracid-3(AZA-3)

Figura 5.1.8. Estructura dels azaspiràcids

Pel que fa a les imines cícliques (IC), el grup inclou els espiròlids (SPX) i les gimnodimidines (GYM). Se n'han descrit fins a 15 compostos diferents, i el seu mecanisme d'acció no és conegut. Se les coneix com toxines ràpides ja que la injecció d'extractes d'aquestes toxines en ratolins provoca la mort de l'animal en qüestió de minuts [35]. Tot i aquests efectes tan ràpids, no s'han descrit intoxicacions en humans. Les toxines SPX (figura 5.1.9) han estat trobades en aigües de països de la UE, en canvi les gimnodimidines només han estat trobades a Nova Zelanda. A la UE no s'ha establert un nivell màxim admissible, tot i que hi ha una opinió de l'EFSA publicada l'any 2010 [107], on es recull l'estat de la qüestió fins al moment, que es pot resumir en el següents punts:

- Només s'han detectat SPX en 3 països d'Europa; no s'ha detectat GYM.
- No hi ha informació sobre l'efecte del processat dels bivalves en la concentració de les IC.
- No hi ha suficients dades per establir una Dosi de Referència Aguda (ARD) pels diferents grups de IC.
- Cal desenvolupar mètodes d'anàlisi alternatius al bioassaig; seria particularment interessant poder desenvolupar mètodes basats en LC-MS/MS, però això depèn en gran part de la disponibilitat de patrons o materials de referència.

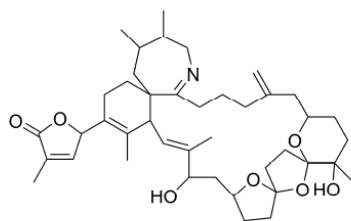


Fig 5.1.9. Estructura del 13-Desmetil Espiròlid (SPX-1)

Tal com s'ha dit a la introducció general, els límits màxims permesos per les toxines marines es troben recollits de forma específica en els Reglaments 853/2004/CE [40] i 786/2013/CE [41] i s'expressen en funció del compost base de cada família de toxines; la resta de toxines del grup s'expressen en termes del compost base utilitzant els anomenats factors d'equivalència tòxica (FET). Per exemple, en el cas de la família de l'àcid okadaic (OA) i les dinofisistoxines (DTXs), el compost base és OA, se li atorga un FET= 1. A la resta de compostos de la família (DTXs) se'ls atribueix una toxicitat relativa a l'OA, determinada amb el bioassaig en ratolins, tal es descriu en el butlletí de l'EFSA [42]. És una forma de calcular la toxicitat global de la mostra no tenint tan sols en compte la concentració de les substàncies presents en l'aliment, sinó també la seva toxicitat, i s'usa també en altres camps, com per exemple les dioxines. Aquesta és una forma de fer l'avaluació del risc del consum de bivalves, però en l'opinió publicada per l'EFSA es reconeix que no es tracta de FETs robustos, avaluats per ingesta sinó de valors trobats per injecció intraperitoneal en ratolins [42]. L'EFSA reconeix que els valors FETs hauran de ser revisats quan es disposi de prou dades trobades a partir de estudis de toxicitat oral aguda. La taula 5.1.1 mostra els FET publicats a dia d'avui, i els límits màxims permesos, que s'han establert considerant que la quantitat diària ingerida (ració gran) de mol·luscs bivalves és com a màxim una porció de 400 grams.

Taula 5.1.1: Límits permessos per les toxines marines en mol·luscs bivalve segons legislació europea usant els FET i la forma d'expressió de resultats definits per l'EFSA el 2009 [42].

Biotoxina (Grup)	Límit permès	Analèg	FET
OAs (OA equiv.)	160 µg/Kg OA equiv.	OA	1
DTXs (OA equiv.)	160 µg/Kg OA equiv.	DTX1	1
		DTX2	0.6
PTXs (PTX2 equiv.)	160 µg/Kg OA equiv.	PTX1	1
		PTX2	1
		PTX3	1
		PTX4	1
		PTX6	1
		PTX11	1
YTXs (YTX equiv.)	3.75 mg/kg YTX equiv.	YTX	1
		homo-YTX	1
		45-OH-YTX	1
		45-OH-hYTX	0.5
AZAs (AZA equiv.)	160 µg/Kg d'AZA equiv.	AZA1	1
		AZA2	1.8
		AZA3	1.4
STXs (STX equiv.)	800 µg/kg	STXs	1
		NeoSTX	1
		GTX1	1
		GTX2	0.4
		GTX3	0.6
		GTX4	0.7
		GTX5	0.1
		GTX6	0.1
		C2	0.1
		C4	0.1
		dc-STX	1
		cd-NeoSTX	0.4
		dc GTX2	0.2
		Dc GTX3	0.4
DA (DA/kg)	20 mg/kg	DA	

OA= Okadaicacid, DTX= dinofisistoxina, PTX= pectenotoxina, YTX= yessotoxina, 45-OH-YTX= 45-hidroxi-yessotoxin, AZA= azaspiracid, STX= saxitoxina, DA= domoicacid, GTX= goniautoxina, dc-GTX= decarmamoil-goniautoxina, dc-STX= decarbamoil-saxitoxina

5.1.2. Mètodes d'anàlisi

Els mètodes per a l'anàlisi de les toxines marines contempnen estratègies tant biològiques com químiques. No hi ha una solució definitiva, ja que els mètodes

biològics són altament inespecífics i els mètodes químics estan afectats per la manca d'estàndards i materials de referència comercials.

Donada la complexitat de les estructures moleculars de les toxines marines, els estàndards s'aïllen de mol·luscs contaminats o bé d'algues [37, 38, 39]. Per aquest motiu, hi ha pocs patrons comercials i el seu preu és elevadíssim. Alguns grups de recerca han intentat sintetitzar toxines marines al laboratori i, tot i que és possible, s'ha conclòs que el procés és massa llarg i costós; es requereix un grup de químics experts en síntesi orgànica i purificació i, per exemple, per a la síntesi de la AZA-1 calen més de 40 reaccions de síntesi, havent de purificar i caracteritzar el producte després de cada reacció [108, 109].

5.1.2.(a) Mètodes biològics:

El mètode biològic és diferent segons es vulgui determinar les toxines hidrofíliques o lipofíliques. Per a les hidrofíliques, tipus PSP (paralítiques) i ASP (amnèsiques), consisteix en una extracció en medi aquós acidificat i la injecció de l'extracte en un ratolí de 20 grams. Si es tracta d'extractes molt tòxics, cal diluir per tal que la mort de l'animal es produeixi entre 5 i 15 minuts. Els resultats s'expressen en unitats ratolí (MU), essent una MU, la quantitat mínima de toxina que provoca la mort de l'animal en 15 minuts. Per exemple, 1 MU equival a 0,18 µg de Saxitoxina (SX) [104].

Per l'anàlisi de les toxines lipofíliques, tipus DSP (diarriètiques), s'extreu la mostra amb acetona, s'evapora el dissolvent, es redissol en Tween 60 a l'1%. S'injecta l'extracte al ratolí i es registra la mort en 24h. En aquest cas la MU és la quantitat mínima de toxina que provoca la mort en 24 hores. Aquest mètode detecta totes les toxines tipus DSP (àcid okadaic, dinofisistoxines, pectenotoxines, yessotoxines), encara que no produeixin diarrea, com les yessotoxines i les pectenotoxines [104].

Pel que fa a les toxines de la família dels azaspiracids, l'extracte és el mateix que en el cas anterior (acetona) i el test monitoritza els efectes en l'animal. En la intoxicació per azaspiracids, experimenten una paràlisi progressiva, atípica

de les DSP. La mort de l'animal arriba com molt aviat, en 35 minuts [104]. En aquest cas, 1 MU equival a 4 µg d'AZA-1 [110].

En el cas d'altres toxines lipofíliques no incloses en el present treball, com les brevetoxines, l'extracció es duu a terme amb dietilèter. S'estima que 1 MU equival a 4 µg de Brevetoxina-2 [111]. A part de ser un mètode molt inespecífic, hi ha estudis que també indiquen que el dietilèter no extreu de forma eficient totes les brevetoxines i s'han publicat estudis en què s'apunta que cal fer extractes de les mostres amb altres dissolvents [103].

En els bioassajos comentats fins ara, la toxicitat s'avalua a partir d'una injecció intraperitoneal, quan el que es busca és avaluar la toxicitat oral. Per tal d'evitar injectar l'extracte en l'animal i haver de suposar que l'efecte és el mateix que la ingesta, s'han desenvolupat altres mètodes, que es basen en experimentar amb rates (Rat Bioassay, RA), sotmetent-les a dejuni perllongat (24h) i alimentant-les després amb extracte de bivalves, per comprovar quin efecte produeix en l'animal: diarrea, paràlisi, etc. El mètode és semiquantitatiu i detecta bé les toxines DSP, excepte les pectenotoxines i les yessotoxines, que no produeixen diarrea; també pot emprar-se per detectar les toxines AZAs. És un mètode oficial a la UE, però fins al 2015 únicament era usat als Països Baixos [35].

5.1.2.(b) Mètodes biomoleculars:

Aquests mètodes inclouen els assajos de citotoxicitat, els immunoassajos i els biosensors. Cal matisar que, globalment, els mètodes presentats en aquest apartat tenen enfocaments força innovadors i, a dia d'avui, no són d'us generalitzat als laboratoris de control.

Assajos de citotoxicitat. Estan basats en l'alteració que provoquen les toxines marines sobre l'activitat o la morfologia cel·lular i permeten la detecció de toxines desconegudes. En el cas de modificar l'activitat, les toxines actuen sobre els canals de sodi de cèl·lules.

Hi ha toxines bloquejadores dels canals de sodi (saxitoxines i tetrodotoxines, que tenen com a conseqüència la supervivència de la cèl·lula), i toxines

activadores dels canals (brevetoxines i ciguatoxines, que tenen com a conseqüència la mort de la cèl·lula) [112]. El mecanisme es basa en la unió de les toxines als canals de sodi de les membranes de les cèl·lules nervioses, alterant-ne l'activitat normal. Els problemes associats a aquest tipus d'assaig són, entre d'altres, la inespecificitat, ja que no distingeixen entre les diferents toxines, ni entre els seus metabòlits i els llargs temps d'incubació requerits per arribar a sensibilitats adequades. A més s'ha demostrat que són més sensibles als anàlisis més lipòfils, tal com ocorre amb els assajos biològics amb ratolins.

Per l'anàlisi de brevetoxines, s'ha desenvolupat un mètode basat en la mesura de la unió d'una brevetoxina marcada amb triti (^3H -PbTX-3) als canals de sodi en membranes del cervell de rates o en preparacions de cèl·lules. És un mètode en format competitiu, és a dir, es mesura la toxina no marcada detectant el descens de radioactivitat resultant de la competició amb toxina marcada pels llocs receptors. Es tracta d'un mètode senzill que podria substituir els assajos amb ratolins i a més ha demostrat tenir reactivitat creuada amb les ciguatoxines [112]. Un d'aquests tipus de mètodes (unió de les toxines a receptors específics) és oficial als USA per l'anàlisi de les toxines tipus PSP (STX, GTX), (mètode oficial de l'AOAC 2011.27) [113, 114]. El mètode es basa en la competència de la saxitoxina marcada amb radionuclis amb la saxitoxina nativa per la unió a receptors específics en preparacions de membranes.

També s'ha desenvolupat un assaig d'aquest tipus per l'àcid domoic, basat en la competència per l'enllaç amb el receptor de cainat/ quiqualat-glutamat amb l'àcid cainic radiomarcant- ^3H , i es tracta d'un assaig adequat per determinar DA en extractes d'algues i mariscs [104, 115].

Pel que fa als assajos basats en els canvis morfològics de les cèl·lules, hi ha diferents línies d'investigació; entre elles es troben les que estudien hepatòcits frescos i les que estudien les cèl·lules KB (línia cel·lular humana derivada del carcinoma epidermoide). En la primera línia d'investigació existeixen tests en què s'observen els canvis en hepatòcits frescos de rata exposats a aquestes toxines. Aquest tipus d'assaig permet diferenciar toxines DSP; així, l'OA i la DTX-1 provoquen la formació de bombolles d'aire a la superfície. Les PTX

provoquen la formació de vacuoles en superfície, mentre que les YTX no produeixen canvis aparents [104].

D'altra banda, respecte la línia de recerca dels assajos de citotoxicitat basada en l'ús de les cèl·lules KB, es basa també en l'observació en microscopi dels canvis induïts per les biotoxines en la morfologia de les cèl·lules. Els resultats d'aquests assajos de citotoxicitat mostren una bona correlació amb els resultats obtinguts mitjançant cromatografia de líquids per OA i DTX-1.

Els mètodes basats en citotoxicitat no han estat encara prou estudiats, com per plantejar la substitució dels bioassajos amb ratolins [104].

Pel que fa als immunoassajos es tracta de mètodes in vitro molt específics i sensibles, basats en el reconeixement de l'estructura del compost a determinar per part d'anticossos [112]. S'han desenvolupat diferents immunoassajos per la detecció de toxines marines de diferents famílies. Els RIA (Radio Immunoassay) es basen en l'ús d'anticossos marcats amb un isòtop radioactiu i els ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) es basen en l'ús d'anticossos lligats a un enzim. Aquests anticossos són específics per les toxines marines d'interès.

Aquests assajos poden arribar a nivells de detecció comparables als de la tècnica LC-MS/MS [115]. L'especificitat, que presenta innegables avantatges, pot ser també un inconvenient d'aquests mètodes, ja que anticossos molt específics per certes toxines, com per exemple les brevetoxines del tipus B, tenen poca activitat creuada amb altres toxines marines i fins i tot amb brevetoxines d'altres grups, com les brevetoxines del tipus A (A-PbTx [112]).

A dia d'avui no hi ha kits ELISA comercials que permetin la detecció de toxines de diverses famílies a la vegada; solament existeixen per la detecció de grups de compostos per separat (per exemple, Abraxis comercialtza ELISAs per brevetoxines, àcid domoic, àcid okadaic o saxitoxines). Això fa que aquests tipus de tests no puguin ser usats en la determinació de la toxicitat de mostres alimentàries i requereixen altres tipus de mètodes confirmatoris; és a dir, un resultat conforme en un test ELISA per a una determinada família de toxines no

implica que la mostra estigui lliure de toxines d'altres famílies i pugui, per tant ser consumida sense risc.

Finalment, els biosensors per a les toxines marines basats en la ressonància de plasmons de superfície, que també usen reaccions on participen anticossos, són els sistemes desenvolupats més recentment, concretament des de 2009.

S'han descrit aplicacions per a l'anàlisi de diferents grups de toxines marines. La tècnica té avantatges, com ara l'elevada sensibilitat, però, té també desavantatges, com l'elevat preu de l'equip o la poca capacitat d'analitzar un elevat nombre de mostres [104].

Per últim, cal indicar que hi ha pocs mètodes biomoleculars orientats a l'anàlisi de pectenotoxines, azaspiracids o espirolids [35].

5.1.2.(c) Mètodes químics:

Els mètodes químics sempre comprenen, com a primera etapa, una extracció, seguida de vegades, d'una etapa de clean-up i finalment d'una separació cromatogràfica i d'una mesura. Com a dissolvents per l'extracció s'ha descrit l'ús de metanol [29, 102, 116] i de mescles metanol:aigua (80:20) [31].

El clean-up, quan s'aplica, sol consistir en una extracció en fase sòlida (SPE) amb cartutxos de fase reversa de naturalesa polimèrica, com ara Strata-X [31, 117], Oasis HLB o PolyLC INC [31, 117, 118], o bé de base sílice, tipus C18 [114].

Cal esmentar que hi ha estudis publicats en què s'han desenvolupat columnes d'immunoafinitat (IAC) per la determinació de toxines marines usant com a base els anticossos monoclonals anti-àcid okadaic, per a la retenció específica de les toxines del grup de l'OA [104]. En aquests estudis s'observava bona reactivitat creuada entre els anticossos esmentats i la DTX1 i DTX2.

Tot i que s'han descrit alguns mètodes basats en la cromatografia en capa fina (TLC [104]), els mètodes actuals utilitzen la cromatografia de líquids. La separació en els mètodes de cromatografia de líquids es duu a terme, majoritàriament, mitjançant l'ús de columnes del tipus C18, [29, 30, 102].

Els detectors UV o de fluorescència (FLD) són poc usats en l'anàlisi de les toxines marines lipofíliques; tan sols en el cas de les toxines hidrofíliques, com l'àcid domoic, els detectors UV o de sèries de díodes (DAD) són abundantment usats. L'ús de FLD implica un pas intermedi de derivatització de les toxines. Això pot dur-se a terme mitjançant l'ús del carbamat de dietilamino-cumarina, per exemple [112].

LC-MS/MS: El Reglament europeu 15/2011/CE per a la determinació de toxines marines lipofíliques marca que l'ús de la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses és obligatori, i per tant, la major part de mètodes desenvolupats en l'última dècada es basen en l'ús d'aquest tipus d'instrumentació. Es tracta de mètodes molt específics i selectius, i les fonts d'ionització majoritàriament utilitzades són les d'electrosprai en mode positiu o negatiu, depenent del compost a determinar, i pel que fa als espectròmetres, s'utilitzen fonamentalment els de triple quadrupol en mode MRM [114, 37, 116, 114, 119, 120]. L'ús de l'espectrometria de masses d'alta resolució ha estat també descrita en alguns treballs recents [29, 30, 31, 121, 120, 122], ja sigui amb analitzadors tipus orbital, temps de vol o en tàndem, combinant quadrupols i analitzadors d'alta resolució, tipus Orbitrap i q-TOF.

Autors, com Gerssen et al [121], en la seva aplicació a l'anàlisi de les toxines marines, ja van fer una comparació de diferents tipus d'espectròmetres de masses l'any 2008: TOF, q-TOF, QqQ i IT (trampa d'ions), arribant a conclusions ja previsible: l'equip més sensible és el triple quadrupol i, d'altra banda, la combinació dels resultats de la trampa d'ions i els del q-TOF és una forma molt efectiva de conèixer les rutes de fragmentació de les toxines. Els instruments d'alta resolució emprats en aquest treball tenien llavors importants, com el no poder fer canvis de polaritat dins d'una mateixa injecció cromatogràfica. En l'actualitat, aquestes limitacions han estat ja superades per l'evolució tecnològica.

En aquest sentit, Zendong et al [29] han comparat resultats d'anàlisi de BTXs obtinguts usant espectròmetres de baixa i d'alta resolució: concretament un triple quadrupol, un q-TOF (quadrupol-temps de vol) i un Orbitrap. Els autors

han analitzat mostres de complexitat força diferent: d'una banda musclos, que poden ser considerats mostrejadors actius de biotoxines, i d'altra resines, que han estat utilitzades com a mostrejadors passius. Les conclusions de l'estudi són que els efectes matriu són presents en tots els equips i que depenen fonamentalment del tipus de mostra, essent els efectes molt més notoris en les mostres de musclo usant HRMS van poder demostrar que hi havia un problema d'interferències coeluent atribuïbles a la matriu en la detecció dels ions corresponents a les toxines. La forma més efectiva de disminuir les interferències era per dilució dels extractes.

El SOP-EURLMB no descriu cap tipus de clean-up, carregant sobre la instrumentació la selectivitat del mètode; tot i així, deixa oberta l'opció que es dugui a terme aquesta etapa si el laboratori ho considera necessari. Alguns dels autors que han avaluat diferents tipus d'espectròmetres de masses buscant incrementar la selectivitat del mètode amb una estratègia instrumental, han conclòs que per eliminar interferències; és més efectiu incloure una etapa de clean-up en la part d'extracció que fer recaure en l'espectròmetre la solució al problema de les interferències.

En aquesta línia, Kilcoyne i Fux [120] comparen resultats de QqQ amb q-TOF, i conclouen que per sí mateixa l'alta resolució no és capaç d'eliminar totes les interferències de la matriu i que és necessari realitzar un clean-up.

Ciminiello et al [31], en el seu estudi sobre anàlisi de palitoxines en musclos, usen un espectròmetre LTQ-Orbitrap XL, un instrument híbrid que combina la trampa d'ions i l'analitzador Orbitrap, en el mode full-MS (sense selecció d'ions). Conclouen que el nivell màxim proposat per l'EFSA (30 µg/kg) és força baix i l'única forma d'aconseguir confirmar els anàlits a aquest nivell de concentració és fent un clean-up dels extractes.

5.1.3 Calibratge

El SOP-EURLMB proposa calibrar amb patrons en dissolvent i indica que cal obtenir la recta de calibratge durant la tanda d'anàlisis i, a més, injectar cada

patró per duplicat, avaluant les diferències intra-batch, que no poden superar el 25% de diferència entre les respostes.

El SOP-EURLMB afirma que, quan no existeixin patrons en el mercat, es poden suposar respostes equimolars per a compostos de la mateixa família i especifica que aquest és el cas de la recta de l'àcid okadaic, que pot ser usada per quantificar DTX-1 i DTX-2, de la recta de la PTX-2 que pot ser usada per quantificar PTX-1 i de la recta de AZA-1, que pot ser usada per AZA-2 i AZA-3. En el cas de la yessotoxina, la seva recta es pot usar per quantificar les toxines del seu grup (45-YTX, homo-YTX, i 45-hYTX).

El calibratge amb patrons en dissolvent suposa que l'efecte matriu és negligible i és necessari que cada laboratori avaluï la recuperació del seu mètode analític i determini si li cal aplicar recuperacions per corregir els seus resultats analítics. La forma d'avaluar recuperacions és usant un material de referència certificat (CRM); actualment en el mercat es troben CRMs per OA, AZA-1, PTX-2 i YTX. En cas que no es disposi de CRM, les recuperacions s'hauran de determinar a partir de mostres addicionades amb patrons.

D'altra banda no és possible usar un patró intern marcat isotòpicament, ja que no existeixen toxines comercialitzades marcades isotòpicament; per tant, la forma habitual de treball en el calibratge a LC-MS/MS no és aplicable a l'anàlisi de les toxines marines lipofíliques.

Finalment, indicar que alguns dels treballs revisats [29, 30, 31, 118, 120] usen un calibratge amb patrons "matrix matched", és a dir que preparen els patrons dopant extractes de mostres blanques, amb la intenció que el calibratge que inclogui l'efecte matriu. Tot i així, es troben força treballs publicats que preparen el patrons en dissolvent, seguint el SOP-EURLMB pel que fa a la forma de calibratge [102, 116, 122].

Cal destacar que en cap cas s'ha descrit el calibratge amb patrons SMMS, que són els que s'obtenen a partir de mostres blanques a les que s'addicionen els patrons i seguidament es processen de la mateixa manera que les mostres. Val a dir que l'ús de SMMSs presenta els avantatges innegables, ja comentats al capítol anterior, de proporcionar resultats corregits per la recuperació del procediment i per l'efecte matriu. Tanmateix, en el cas de l'anàlisi de biotoxines

marines, el cost econòmic de la preparació del patrons és molt elevat i és un handicap important a considerar.

5.2. Resultats

5.2.1. Publicació 4: New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach.

Journal of Chromatography A, 1386 (2015) 62–73



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

Journal of Chromatography A

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



New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: A quick, easy, cheap, efficient, rugged, safe approach



A. Rúbies^{a,c,*}, E. Muñoz^{a,c}, D. Gibert^b, N. Cortés-Francisco^{a,d}, M. Granados^b, J. Caixach^d, F. Centrich^{a,c}

^a Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avinguda Drassanes 13-15, 08001, Barcelona, Spain

^b Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí Franquès 1-11, 08028, Barcelona, Spain

^c CIBER of Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Madrid, Spain

^d Mass Spectrometry Laboratory/Organic Pollutants, IDAEA-CSIC, c/Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, Spain

article info

Article history:

Received 13 November 2014

Received in revised form 27 January 2015

Accepted 30 January 2015

Available online 7 February 2015

Keywords:

Liquid chromatography

High resolution mass spectrometry

Bivalves samples

Lipophilic marine biotoxins

abstract

A new method for the analysis of lipophilic marine biotoxins (okadaic acid, dinophysistoxins, azaspiracids, pectenotoxins, yessotoxins, spirolids) in fresh and canned bivalves has been developed. A QuEChERS methodology is applied; *i.e.* the analytes are extracted with acetonitrile and clean-up of the extracts is performed by dispersive solid phase extraction with C₁₈. The extracts are analyzed by ultra-high performance liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer, operating in tandem mass spectrometry mode, with resolution set at 70,000 (*m/z* 200, FWHM). Separation of the analytes, which takes about 10 min, is carried out in gradient elution mode with a BEH C₁₈ column and mobile phases based on 6.7 mM ammonia aqueous solution and acetonitrile mixtures. For each analyte the molecular ion and 1 or 2 product ions are acquired, with a mass accuracy better than 5 ppm. The quantification is performed using surrogate matrix matched standards, with epinomectin as internal standard. The high-throughput method, which has been successfully validated, fulfills the requirements of European Union legislation, and has been implemented as a routine method in a public health laboratory.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Marine biotoxins (MBTXs) are produced by microalgae. Depending on climatic conditions algae blooms can occur and consequently, in these scenarios, the concentration of these toxins in sea water increases considerably. During these events, filter feeding bivalve molluscs can accumulate relatively high concentration levels of toxins. Although MBTXs are not toxic to these species, they may produce severe effects on humans if seafood contaminated with MBTXs is consumed.

MBTXs can be classified according to polarity into two major groups, *i.e.* hydrophilic and lipophilic toxins. Hydrophilic toxins, such as domoic acid and saxitoxins can produce amnesic shellfish poisoning or paralytic shellfish poisoning respectively [1]. Lipophilic toxins comprise several families of compounds, such as azaspiracids (AZAs), pectenotoxins (PTXs), spirolids (SPXs), yessotoxins (YTXs), brevetoxins (BTXs), ciguatoxins (CTXs) or okadaic acid group (OA), which comprises dinophysistoxin derivatives (DTXs). Their toxic effects are diverse [1], including gastrointestinal disorders or neurological symptoms.

To protect public health, maximum concentration limits for some MBTXs in bivalves, as well as official control programs, have been set up in many countries. In the European Union, Regulations (EC) No 853/2004 [2] and (EU) 786/2013 [3] establish the permitted limits of lipophilic MBTXs in live bivalve molluscs (Table 1).

Mouse bioassay has been the reference method for the official control of lipophilic MBTXs [4]. This assay provides information

*Corresponding author at: Laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, Avinguda Drassanes 13-15, 08001, Barcelona, Spain. Tel.: +34 934439400x216; fax: +34 93 441 35 24.

E-mail address: arubies@aspb.cat (A. Rúbies).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.088>

0021-9673/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1
Limits for lipophilic MBTXs in bivalve mollusks according to European regulations [2,3] and toxicity equivalence factors (TEF), as defined by EFSA [5].

Marine biotoxins	Permitted limit	Toxicity equivalence factor		Results expression
		Analogue	TEF	
Okadaic acid, Dinophysistoxins Pectenotoxins	160 µg kg ⁻¹ of OA equivalents	OA	1	µg OA equivalents kg ⁻¹
		DTX1	1	µg OA equivalents kg ⁻¹
		DTX2	0.6	µg OA equivalents kg ⁻¹
		PTX1	1	µg PTX equivalents kg ⁻¹ *
		PTX2	1	µg PTX equivalents kg ⁻¹ *
Yessotoxins	3.75 mg kg ⁻¹ of YTX equivalents	YTX	1	mg YTX equivalents kg ⁻¹
		hYTX	1	mg YTX equivalents kg ⁻¹
		45-OH-YTX	1	mg YTX equivalents kg ⁻¹
		45-OH-hYTX	0.5	mg YTX equivalents kg ⁻¹
Azaspiracids	160 µg kg ⁻¹ of AZA equivalents	AZA1	1	µg AZA equivalents kg ⁻¹
		AZA2	1.8	µg AZA equivalents kg ⁻¹
		AZA3	1.4	µg AZA equivalents kg ⁻¹

* To express the results according to EU legislation, under the guidance of the EU Reference Laboratory on MBTXs, PTXs are considered equivalent to OA, and thus the TEF for PTX1 and for PTX2 is taken as 1, expressed as µg OA equivalents kg⁻¹.

about total toxicity, but has several drawbacks; in addition to bioethical issues, the method lacks selectivity, the sensitivity for some compounds is rather limited (e.g. okadaic acid group), and the reproducibility of results is poor [5].

Due to these reasons, in 2011 the European Regulation (EU) 15/2011 [6] established that official controls should be performed with analytical methods based on liquid chromatography (LC) with tandem mass spectrometry (MS/MS) detection, which is now considered the reference technique, and from 2015 LC-MS/MS is mandatory for official controls.

Several LC-MS methods for lipophilic MBTXs analysis in shellfish samples have been reported (Table 2). The extraction of analytes from tissue is performed with methanol [7–18]. Some methods avoid the clean-up step [7–12], but others consider solid phase extraction (SPE) with C₁₈ [13,14] or polymeric [14–18] cartridges. Obviously, the inclusion of a clean-up step increases the analysis time per sample, but in the case of complex extracts it can be a good strategy to decrease the ion suppression effects on MS analysis, as well as to ensure the good instrument maintenance and to extend the lifetime of the chromatographic column. The QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Efficient, Rugged, Safe) approach, i.e. the combination of an extraction using acetonitrile with a high salt content and clean-up using d-SPE, was initially developed for the analysis of pesticides [19], and it has also been applied to the analysis of antibiotics, mycotoxins, polycyclic aromatic hydrocarbons, etc. in different types of food samples with highly positive results [20–25]. The QuEChERS strategy was adopted in this study due to its simplicity and high throughput. To our knowledge there is no previous publication in the literature reporting the application of QuEChERS to the analysis of marine biotoxins.

Chromatographic separation is a key issue in the analysis of MBTXs by LC-MS, and several approaches at acidic, neutral or basic pH using different columns, based on C₈ [7,8,18] or C₁₈ [7,9–17] phases, have been reported.

The triple quadrupole (QqQ) analyzer in the multiple reaction monitoring (MRM) acquisition mode is, currently, the most common approach for MS analysis [7,8,13,15–17]. It provides excellent sensitivity and, to ensure selectivity, two MRM transitions are usually monitored for each analyte. However the scenario is changing with the introduction of high resolution (HR) MS instruments in routine laboratories. Time of flight (TOF) and, specially, Orbitrap based instruments offer very high resolution, and excellent accuracy and stability of mass measurements, which makes the new

generation of HRMS instruments very attractive and valuable tools in MBTXs analysis. The studies on screening analysis [10,26], as well as on quantitative and confirmatory methods for lipophilic MBTXs [11,12] using LC-Orbitrap-MS have shown the suitability of HRMS for both untargeted and targeted analysis of MBTXs in complex samples. Moreover, hybrid TOF and Orbitrap MS instruments, usually presented as Q-TOF and Q-Orbitrap configurations, appear as indispensable tools for confirmatory analysis to fulfil the established legislation based on LC-MS/MS [6]. The capabilities of high resolution and accurate mass measurements of the second mass analyzer with pre-selection of the molecular ion in the first mass analyzer (Q), provides extra sensitivity and selectivity [27,28]. In comparison to QqQ, product ions can be acquired in high resolution mode so that isobaric interferences are resolved. Moreover, the accurate masses of the molecular and product ions are measured, providing additional confirmatory information and helping to eliminate false results [29].

Here we present a high-throughput confirmatory quantitative method for the analysis of regulated MBTXs (AZAs, PTXs, SPXs, YTXs, OA and DSPs) in shellfish samples, based on QuEChERS and UHPLC-Q-Orbitrap-HRMS. Thus, after the extraction of the analytes with acetonitrile, a simple clean-up by dispersive solid phase extraction (d-SPE) with C₁₈ is performed, and the extracts are injected into the chromatographic system. The calibration is carried out using surrogate matrix matched standards (SMMS), by spiking blank samples with standards and internal standard before extraction. The method, which has been validated, has been included in the accreditation scope of the laboratory of the Agència de Salut Pública de Barcelona (LASPB) according to ISO 17025 [30], and it is currently applied in routine analysis.

2. Experimental

2.1. Chemical and reagents

Standards of pectenotoxin-2 (PTX2) (7.27 ± 0.33 µg mL⁻¹, ≥99%), 13-desmethyl spirolide C (SPX1) (6.89 ± 0.45 µg mL⁻¹, ≥97%), azaspiracid-1 (AZA1) (11.91 ± 0.87 µg mL⁻¹, ≥99%), azaspiracid-2 (AZA2) (11.73 ± 0.78 µg mL⁻¹, ≥99%), azaspiracid-3 (AZA3) (10.40 ± 0.51 µg mL⁻¹, ≥99%), yessotoxin (YTX) (7.91 ± 0.64 µg g⁻¹, ≥97.9%), homoyessotoxin (hYTX) (7.78 ± 0.67 µg g⁻¹, ≥98.4%), okadaic acid (OA) (24.92 ± 1.82 µg g⁻¹, ≥98.9%), dinophysistoxin-1 (DTX1) (2.55 ± 0.20 µg g⁻¹, ≥98%),

Table 2
Methods for the analysis of lipophilic MBTXs based on LC and MS.

Analytes	Matrix	Extraction	Clean-up	Technique	Chromatographic conditions	Recovery	Reference
OA, YTX, AZA1, PTX2, SPX1, GYM	Mussel, cockle, clam, oyster	MeOH	(SPE: Strata™-X) ²	HPLC-MS/MS (QqQ)	Column: X-Bridge C ₁₈ (150 mm × 3 mm; 5 μm) Mobile phases: H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM)-ACN:H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM) (90:10)	79–108%	[15,16,17]
OA, DTX1, DTX2, PTX1, PTX2, AZA1, AZA2, AZA3, YTX, hYTX, 45-OH-YTX, 45-OH-hYTX	Mussel, clam, razor clam	MeOH	-	HPLC-MS/MS (QqQ)	Column: Hypersil BDS C ₁₈ (50 mm × 2 mm; 3 μm) or X-Bridge C ₁₈ (50 mm × 2 mm; 2.5 μm) Mobile phases: H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate)-ACN:H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate), (95:5)	71.3–138.4%	[7]
PTX2, AZA1, AZA2, AZA3, YTX, hYTX, 45-OH-YTX, 45-OH-hYTX	Mussel, cockle, clam, razor clam	MeOH	-	HPLC-MS/MS (QqQ)	Column: X-Bridge C ₁₈ (150 mm × 3 mm; 5 μm) or 3.5 μm) Mobile phases: H ₂ O (NH ₃ 0.05%, pH 11)-ACN:H ₂ O (90:10)	71.3–138.4%	[7]
OA, DTX1, DTX2, PTX1, PTX2, AZA1, AZA2, AZA3, YTX, hYTX, 45-OH-YTX, 45-OH-hYTX	Mussel, cockle, clam, razor clam	MeOH	-	HPLC-MS/MS (QqQ)	Column: X-Bridge C ₁₈ (150 mm × 2 mm; 3.5 μm) Mobile phases: H ₂ O (NH ₄ HCO ₃ 2 mM, pH 11)-ACN:H ₂ O (NH ₄ HCO ₃ 2 mM, pH 11) (90:10)	71.3–138.4%	[7]
OA, DTX1, DTX2, YTX, AZA1, GYM, SPX-1, PTX-2, DA, AZA1, AZA2, AZA3, PTX2, OA, DTX1, DTX2, YTX, SPX1, 13-SPX1, PnTX-G, GYMA, OA, PTX2, AZA1, YTX	Mussel, oyster, clam, wedge clam, razor clam, cockle	MeOH	SPE (on-line, C ₁₈)	HPLC-MS/MS (QqQ)	Column: Gemini NX C ₁₈ (100 mm × 2 mm; 3 μm) Mobile phases: H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM)-ACN:H ₂ O (NH ₃ 6.7 mM), (90:10)	97–102%	[13]
OA, DTX1, DTX2, YTX, AZA1, GYM, SPX-1, PTX-2, DA, AZA1, AZA2, AZA3, PTX2, OA, DTX1, DTX2, YTX, SPX1, 13-SPX1, PnTX-G, GYMA, OA, PTX2, AZA1, YTX	Mussel, oyster, clam, wedge clam, razor clam, cockle	MeOH	-	UHPLC-MS/MS (QqQ)	Column: Zorbax SB-C ₁₈ (50 mm × 2.1 mm; 2.5 μm) Mobile phases: H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate)-ACN:H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate), (95:5)	74 to >120%	[8]
Mussel, oyster, clam	MeOH	SPE (C ₁₈ , Strata™, X or OASIS HIL TM)	HPLC-MS/MS (Qtrap)	Column: Gemini NX C ₁₈ (150 mm × 2 mm; 3 μm) Mobile phases: H ₂ O (NH ₄ HCO ₃ 5 mM)-ACN:H ₂ O (NH ₄ HCO ₃ 5 mM), (85:15)	86–112%	[14]	
DA, AZA1, AZA2, AZA3, PTX2, OA, DTX1, DTX2, YTX, homoYTX, SPX1, PnTX-G, GYM, OA	Mussel, oyster, clam, scallop	MeOH	-	HPLC-MS/MS (Qtrap)	Column: Luna C ₁₈ (2) (50 mm × 2.1 mm; 2.5 μm) Mobile phases: H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate)-ACN:H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate) (95:5)	76–176%	[9]
Mussel, oyster, clam, scallop	MeOH	SPE (on-line, OASIS HIL TM)	HPLC-MS/MS (Q-ToF)	Column: Hypersil BDS C ₁₈ (50 mm × 2.1 mm; 3 μm) Mobile phases: H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate)-ACN:H ₂ O (50 mM formic acid and 2 mM ammonium formate) (95:5)	87–103%	[18]	
OA, DTX1, DTX2, YTX, GYM, SPX1, PTX2, AZA1, AZA2, AZA3	Mussel	MeOH	-	LC-MS (Orbitrap)	Column: Hypersil Gold C ₁₈ (100 mm × 2.1 mm; 1.9 μm) (formic acid 0.1%) (90:10)	-	[10]
OA, YTX, AZA1, GYM, SPX1, PTX2	Mussel	MeOH	-	UHPLC-MS (Orbitrap)	Column: Hypersil Gold C ₁₈ (50 mm × 2.1 mm; 1.9 μm) (NH ₃ 6.7 mM) (90:10)	80–94%	[11]
OA, DTX1, PTX2, AZA1, YTX, SPX1	Mussel, oyster, cockle, razor clam	MeOH	-	UHPLC-MS (Orbitrap)	Column: Nucleodur C ₁₈ Gravity (50 mm × 2 mm, 1.8 μm) Mobile phases: H ₂ O (NH ₃ 0.01%)-ACN (NH ₃ 0.01%)	90–105%	[12]

²Suggested for the analysis of series of more than 20 samples.

dinophysistoxin-2 (DTX2) ($2.54 \pm 0.18 \mu\text{g g}^{-1}$; $\geq 98\%$) were obtained from Cifga S.A (Lugo, Spain). Eprinomectin (92.4%) was obtained from Sigma–Aldrich (Seelze, Germany).

CRM-AZA-Mus, a certified reference material for aza- spiracids prepared from naturally contaminated tissues (AZA1: $1.16 \pm 0.10 \text{ mg kg}^{-1}$; AZA2: $0.273 \pm 0.024 \text{ mg kg}^{-1}$; AZA3: $0.211 \pm 0.023 \text{ mg kg}^{-1}$), was acquired from NRC (Halifax, NS, Canada). Mussel-DSP-2, a certified reference material containing okadaic group toxins (OA: $0.361 \pm 0.034 \text{ mg kg}^{-1}$; DTX1: $0.206 \pm 0.019 \text{ mg kg}^{-1}$; DTX3: $0.283 \pm 0.054 \text{ mg kg}^{-1}$), was acquired from Cifga Laboratorio S.A. (Lugo, Spain).

A mussel extract containing YTX, 45-OH-Yessotoxin (45-OH-YTX), hYTX and 45-OH-homoYessotoxin (45-OH-hYTX) was provided by the European Reference Laboratory on Marine Biotoxins.

Acetonitrile, HPLC-quality, methanol and Lichroprep RP-18 (25–40 μm) were obtained from VWR (Darmstadt, Germany); Bondesil-PSA, 40 μm was obtained from Varian (Middelburg, The Netherlands). Double deionized water (Milli Q, Millipore, Molsheim, France) of 18.2 MQ cm^{-1} was used.

Other reagents (analytical grade) were obtained from local suppliers.

Standards were prepared as follows:

Standard Mixture (0.5 mg L^{-1}): an exact volume of each compound was added and dissolved in 10 mL of methanol, using volumetric flasks and stored at -20°C for 2 years. Internal standard was prepared as follows:

Internal standard solution of eprinomectin (1000 mg L^{-1}): 25 mg was weighed and dissolved in 25 mL of methanol using volumetric flasks and stored at -18°C for up to 2 years. An intermediate standard solution was prepared in methanol at a concentration of 20 mg L^{-1} and stored for up to 1 year at -18°C . The working solution was prepared in methanol at concentration of 0.5 mg L^{-1} and stored for up to 1 year at -18°C .

Whatman Mini-UniPrep PVDF filters with polypropylene housing (0.2 μm) from GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK) were used to filter the samples.

Reconstituting solvent: 75 mL of 6.7 mM ammonia was mixed with 25 mL acetonitrile.

2.2. Instrumentation

Thermo Accela UHPLC system coupled to a Maylab Switch column manager and a Thermo high resolution Q Exactive mass spectrometer (Thermo, Bremen, Germany) were used. The chromatographic system was coupled to the MS with a Heated Electrospray Ionization Source II (HESI II). Nitrogen (purity >99.999%) obtained from a Zefiro nitrogen generator (Clantecnologica, Seville, Spain) was employed as both the collision and damping gas.

Mass calibration for Orbitrap was performed every day, in both negative and positive modes, to ensure a working mass accuracy lower than or equal to 5 ppm. Pierce LTQ Velos ESI Positive ion and Pierce LTQ Velos ESI Negative ion calibration solutions (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) were used to calibrate the mass spectrometer.

XCalibur 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) and Trace Finder 3.1 (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) were used for UHPLC control and data processing, respectively. Q Exactive 2.0 SP 2 from Thermo Fisher Scientific was used to control the mass spectrometer.

An Agitax SRU-CP38 shaker (Cirta SL, Madrid, Spain), an Ultrasonic bath Ultrasons-H (Selecta, Abrera, Barcelona, Spain), a refrigerated centrifuge (Hettich, Tuttlingen, Germany) and a

Turbovap nitrogen evaporator system (Biotage, Uppsala, Sweden) were used.

2.3. QuEChERS extraction method

One g of bivalve sample was weighed in a glass tube; 1 mL of potassium dihydrogen phosphate 1 M solution and 0.2 mL of internal standard solution of 0.5 mg L^{-1} were added and mixed with the sample and were allowed to stand for 20 min. 5 mL acetonitrile was then added to all samples as the extraction solvent. After vortexing (30 s), sample was mixed with 0.5 g of magnesium sulphate and 0.1 g of sodium chloride. Tubes were placed in an axial stirrer (Amplitude: 120 mm; Speed: 2.3 m s; Acceleration: 60 m s^{-2} ; Abruptness: 7; Delay: 0 s; Cycle time: 180 s; Repetitions: 1) and centrifuged (3500 rpm, 10 min, 5°C). The supernatant was transferred to conical glass tubes and 150 mg of magnesium sulphate and 25 mg of Lichroprep RP-18 were added. After vortexing (30 s), tubes were placed in an axial stirrer (using above mentioned conditions) and centrifuged (3500 rpm, 10 min, 5°C). 2 mL of supernatant were evaporated to 1 mL under a N_2 stream at 45°C . 3 mL of 6.7 mM ammonia were added. After mixing, reconstituted extracts were filtered using Mini-UniPrep vials, and injected into the chromatographic system.

2.4. Hydrolysis

Another aliquot (2 mL) of supernatant was submitted to hydrolysis in order to detect and quantify the total content of okadaic acid group toxins.

Two milliliter of the purified supernatant of the acetonitrile purified extract were evaporated to 1 mL under a N_2 stream at 45°C . Two milliliter of methanol and 250 μL of 2.5 M sodium hydroxide were added. After vortexing (10 s), tubes were placed in a heated bath (76°C , 40 min). Once tubes reached room temperature, 250 μL of 2.5 M hydrochloric acid were added to neutralize the extract and 500 μL of reconstituting solvent were added. After vortexing, it was filtered and an aliquot of 490 μL and 10 μL of IS were introduced in a vial and injected into the chromatographic system.

2.5. Liquid chromatography/mass spectrometry

A BEH C_{18} column (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm ; Waters, Manchester, UK) operated at 40°C was used for liquid chromatography. Mobile phases were 6.7 mM ammonia aqueous solution (A) and acetonitrile (B). The gradient program (time (min), %B) was: (0, 15); (1.75, 15); (8.00, 90); (8.50, 90); (9, 15); (11.0, 15). The flow rate was 0.25 mL min^{-1} , and the injection volume 5 μL . Extracts were kept at 15°C during storage in the autosampler.

The parameters of the t-MS/MS working mode were the following: spray voltage, 3.5 kV (positive ionization), 1.5 kV (negative ionization); sheath gas flow rate (N_2) 30 arbitrary units; capillary temperature, 300°C ; S-lens RF level, 50 (arbitrary units); heater temperature, 200°C . The normalized collision energy (NCE) for each compound is defined in Table 3. Moreover, four time segments were set: first segment (0–5.95) min working in negative mode, second and third segments (5.95–8.50) min, (8.50–9.60) min in positive mode, fourth segment (9.60–11) min in negative and positive mode.

The resolution was set at 70,000 (m/z 200, FWHM) at a scan rate 2 Hz, the automatic gain control (AGC, maximum number of ions to fill the C-Trap) was set at $5e^4$, with a maximum injection time (IT, ion trap opening time) of 35–100 ms, depending on the multiplexing parameter (ability to accumulate up to 10 different ions in the C-Trap) (see Table 3).

Table 3
Mass spectrometry and chromatographic parameters.

Toxin	Chemical formula	Molecular ion	t _r	m/z calculated	Product ion 1	m/z calculated	Product ion 2	m/z calculated	Maximum injection time (ms)	MSX	NCE (%)
Okadaic acid	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	5.1	803.4587	[C ₄₃ H ₆₇ O ₁₃] ⁻	255.1238	[C ₄₃ H ₆₇ O ₁₃] ⁻	113.0608	41	6	34
Dinophysistoxin 1	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₃	[M-H] ⁻	5.6	817.4744	[C ₄₄ H ₆₉ O ₁₃] ⁻	255.1238	[C ₄₄ H ₆₉ O ₁₃] ⁻	563.2862	41	6	34
Dinophysistoxin 2	C ₄₄ H ₆₈ O ₁₃	[M-H] ⁻	5.3	803.4587	[C ₄₃ H ₆₇ O ₁₃] ⁻	255.1238	[C ₄₃ H ₆₇ O ₁₃] ⁻	113.0608	41	6	34
Yessotoxin	C ₅₅ H ₈₂ O ₂₁ S ₂	[M-2H] ²⁻	5.4	570.2322	[C ₅₄ H ₈₀ O ₂₀ S ₂] ²⁻	467.1669	[C ₅₄ H ₈₀ O ₂₀ S ₂] ²⁻	396.1354	41	6	24
Homo-Yessotoxin 45-OH-Yessotoxin	C ₅₆ H ₈₄ O ₂₁ S ₂	[M-2H] ²⁻	5.4	577.2400	[C ₅₅ H ₈₂ O ₂₀ S ₂] ²⁻	474.1747	[C ₅₅ H ₈₂ O ₂₀ S ₂] ²⁻	509.1956	41	6	24
OH-Yessotoxin	C ₅₅ H ₈₂ O ₂₂ S ₂	[M-2H] ²⁻	4.9	578.2287	[C ₅₄ H ₈₀ O ₂₁ S ₂] ²⁻	467.1669	[C ₅₄ H ₈₀ O ₂₁ S ₂] ²⁻	396.1354	41	6	24
45-OH-Homo-Yessotoxin	C ₅₆ H ₈₄ O ₂₂ S ₂	[M-2H] ²⁻	4.9	585.2375	[C ₅₅ H ₈₂ O ₂₁ S ₂] ²⁻	474.1747	[C ₅₅ H ₈₂ O ₂₁ S ₂] ²⁻	509.1956	83	6	24
Azaspiracide-1	C ₄₇ H ₇₁ NO ₁₂	[M+H] ⁺	6.9	842.5049	[C ₄₇ H ₇₀ NO ₁₁] ⁺	824.4943	-	672.4106	83	3	16
Azaspiracide-2	C ₄₈ H ₇₃ NO ₁₂	[M+H] ⁺	7.1	856.5206	[C ₄₇ H ₇₂ NO ₁₁] ⁺	832.2690	[C ₃₈ H ₃₈ NO ₉] ⁺	-	83	3	30
Azaspiracide-3	C ₄₆ H ₆₉ NO ₁₂	[M+H] ⁺	6.1	828.4893	[C ₄₆ H ₆₈ NO ₁₁] ⁺	810.4761	-	-	83	3	16
Pectenotoxin-1	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₅	[M+H ₂ O] ⁺	-	892.4815	-	-	-	-	83	3	15
Pectenotoxin-2	C ₄₇ H ₇₀ O ₁₄	[M+H ₂ O] ⁺	8.9	876.4866	[C ₄₇ H ₆₇ O ₁₃] ⁺	823.4627	[C ₄₇ H ₆₇ O ₁₃] ⁺	841.4740	83	3	15
13-desmethyl spirolide C	C ₄₂ H ₆₂ NO ₇	[M+H] ⁺	9.1	692.4521	[C ₄₂ H ₆₀ NO ₆] ⁺	674.4415	[C ₄₂ H ₆₀ NO ₆] ⁺	656.4310	83	3	28
Eprinomectin (IS)	C ₅₀ H ₇₅ NO ₁₄	[M+Na] ⁺ / [M-H] ⁻	10.1	936.5080 / 912.5128	-	-	-	-	100	1	-

2.6. Calibration

Each MBTX was individually determined, but according to the UE regulations [2,3,5], for each MBTX group, the total concentration of toxin should be expressed as equivalents using the Toxic Equivalent Factors (TEFs) (see Table 1).

Quantification of each individual MBTX was performed using surrogate matrix matched standards (SMMS), to overcome the usual ion suppression or ion enhancement effects in MS analysis. Thus, mussel blank samples were spiked with the analytes at five different concentrations and 200 µL of eprinomectin solution (0.5 mg L⁻¹), used as internal standard (IS), was added; afterwards the SMMS were submitted to the whole analytical procedure; the calibration curves for each analyte were obtained by linear regression analysis of the peak areas relative to IS areas against concentration. Calibration curves in the range 25–350 µg kg⁻¹ for all the MBTXs were used. Eprinomectin was chosen as IS because it is not present in the samples, it can be ionized in both negative and positive modes and it has a molecular weight similar to the analytes.

As the legislation requires the analysis of toxins and their esters, an additional hydrolysis step is necessary to transform the esters of the OA group toxins and to quantify the total content of OA/DIX group, as explained above.

It should be highlighted that standards are not available for all the legislated MBTX. For quantification of these MBTX, such as PTX 1, 45-OH-YTX and 45-OH-hYTX, the recommendations of the Standard Operational Procedure (SOP) were followed [7]. A mussel extract containing 45-OH-YTX and 45-OH-hYTX was provided by the European Reference Laboratory for Marine Biotoxins and it was used to establish the retention time and the MS parameters for these compounds.

The compounds were identified by the accurate mass of the molecular ion with mass accuracy better than 5 ppm and a deviation of the retention time <1%. To confirm the positive findings, two product ions (when possible) were obtained from each product ion experiment in the same run. To calculate the exact mass (m/z calculated), the mass of the electron has been taken into account as 0.00055 Da [31]. Moreover, the ion ratio defined as the ratio between the molecular ion and the product ions was used as an additional criteria for confirmation of positive results. The ion ratio of the compounds in the sample should be in agreement with the ion ratio of the SMMS calibration curve with a maximum tolerance of ±20%.

3. Results and discussion

1. Optimization of UHPLC conditions

Retention time and elution order of the toxins are affected by the pH of the mobile phase due to the charge state under different chromatographic conditions [32].

Acidic conditions were tested first because they are normally used in mass spectrometry; acidic conditions consisted of an aqueous mobile phase of 0.1% formic acid in water. The columns tested in these conditions were: Kinetex XB C₁₈ (100 × 2.10) mm, 1.7 µm particle diameter (Phenomenex), Hypersil Gold aQ C₁₈ (100 × 2.10) mm, 1.9 µm particle diameter, (Thermo Scientific) and Syncronis C₁₈ (100 × 2.10) mm, 1.7 µm particle diameter (Thermo Scientific). Columns were evaluated in terms of their ability to resolve the analytes and obtain good peak shapes. Kinetex XB C₁₈ gave asymmetric and broad peaks for AZAs, while Hypersil Gold aQ C₁₈ gave broad tailing peaks for AZAs in HESI+ and for YTXs in HESI-. Relating to Syncronis C₁₈, resolving problems were observed with YTXs in acidic conditions.

Table 4
Experiments carried out to optimize extraction and clean-up. Results of the duplicate experiments (expressed as percentage of recovery).

Experiment	Extraction		Clean up				Recovery (%)											
	Sample (g)	ACN (mL)	NaCl (g)	MgSO ₄ (g)	C ₁₈ (mg)	PSA (mg)	Evaporation to	Redissolve to	PIX2	SPXI	AZA	AZA	AZA	AZA	YTX	hYTX	OA	DTXI
1	5	10	1	4	-	-	Last drop	0.8 mL	28	94	30	25	24	30	44	80	56	74
2	5	10	1	4	-	-	No evaporation	-	120	105	107	105	91	120	132	120	120	102
3	5	10	0.5	2	75	75	2 mL	8 mL	118	97	111	109	91	124	136	122	124	104
4	5	10	0.5	2	120	-	2 mL	8 mL	56	61	27	33	25	42	35	50	48	46
5	1	2	0.1	0.5	25	-	1 mL	4 mL	59	56	29	27	27	66	70	83	73	76
6	1	5	0.1	0.5	25	-	1 mL	4 mL	91	105	73	74	70	72	76	97	87	82
									89	106	78	79	76	55	54	83	76	85
									80	73	65	91	53	50	57	85	70	87
									102	95	88	88	51	74	86	92	92	94
									100	97	92	99	95	80	90	90	92	96

Basic conditions following published literature for the mobile phase were also tested. These conditions consisted of ammonia aqueous solution 6.7 mM at pH 10.2; the columns tested in such conditions were: X-Bridge C₁₈ (50 × 2.10) mm, 2.5 μm particle diameter (Waters), Acquity BEH (Ethylene Bridge Hybrid)C₁₈ (100 × 2.10) mm, 1.7 μm particle diameter (Waters) and Hypersil Gold C₁₈ (100 × 2.10) mm, 1.7 μm particle diameter (Thermo Scientific). In basic conditions, AZA3 had a wider peak than in acidic conditions in all columns tested. Changing the pH of the mobile phase may also have an effect on the peak shape because a change in charge state of the toxin will affect its interaction with the stationary phase. Additional separation and optimal chromatographic resolution were obtained by careful selection of the gradient program.

When using the Hypersil Gold C₁₈ column, a good separation of all analytes was obtained although the robustness of the method was insufficient due to high variability of the retention time and when using an X-Bridge C₁₈ column no chromatographic separation was achieved between OA and DTX2. Acquity BEH column provided proper separation and high robustness.

So, finally Acquity BEH column in basic conditions was selected. Separation between analytes ionizing in positive and negative modes [11,15,16] could be achieved and time functions could be established to allow the analysis of all toxins in a single run. This is an important issue because from our experience, polarity switching in Q-Exactive requires longer times compared to other mass spectrometers.

Fig. 1 shows the separation achieved by the Acquity BEH column tested in its optimal working conditions for a mixture of MBTXs (100 μg L⁻¹) for which standards are available including IS (75 μg L⁻¹). Working under the same experimental conditions, the mussel extract containing YTX, 45-OH-YTX, hYTX and 45-OH-hYTX is also shown in Fig. 2. It can be concluded from the study, that both the pH of the mobile phase and the change in column material from traditional silica to Ethylene Bridge Hybrid technology (Acquity BEH) contributed to a better peakshape.

2. Optimization of MS conditions

1. Acquisition mode

The hybrid Q-Orbitrap mass analyzer presents several acquisition modes (or a combination of them) that can be carried out depending on the aim of the method. In the present study, tandem mass spectrometry is used, since legislation establishes this technique as the reference method for the official control of lipophilic marine biotoxins [7]. For this reason, selection of a molecular ion for fragmentation and analysis of the product ions is mandatory and the targeted MS/MS acquisition mode was the optimal solution, as the other acquisition modes presented some limitations [27]. In comparison to triple quadrupole, high resolution tandem mass spectrometry provides additional confirmatory information, helping to eliminate false results because the molecular ion is monitored. The specificity of the accurate mass measurement adds more veracity to any determination [29].

2. Target MS/MS method development

To optimize the ion source parameters, a dilution of 1 mg L⁻¹ of each compound was individually infused into the mass spectrometer. Working in full scan mode, the molecular ion for each compound was identified and the optimum voltages, temperatures and gas flow defined.

The NCE for each compound was again individually defined testing increasing values of NCE (from 5 to 60). The optimum NCE was the one that permitted to detect the molecular ion and two product ions with enough sensitivity (responses molecular: product, around

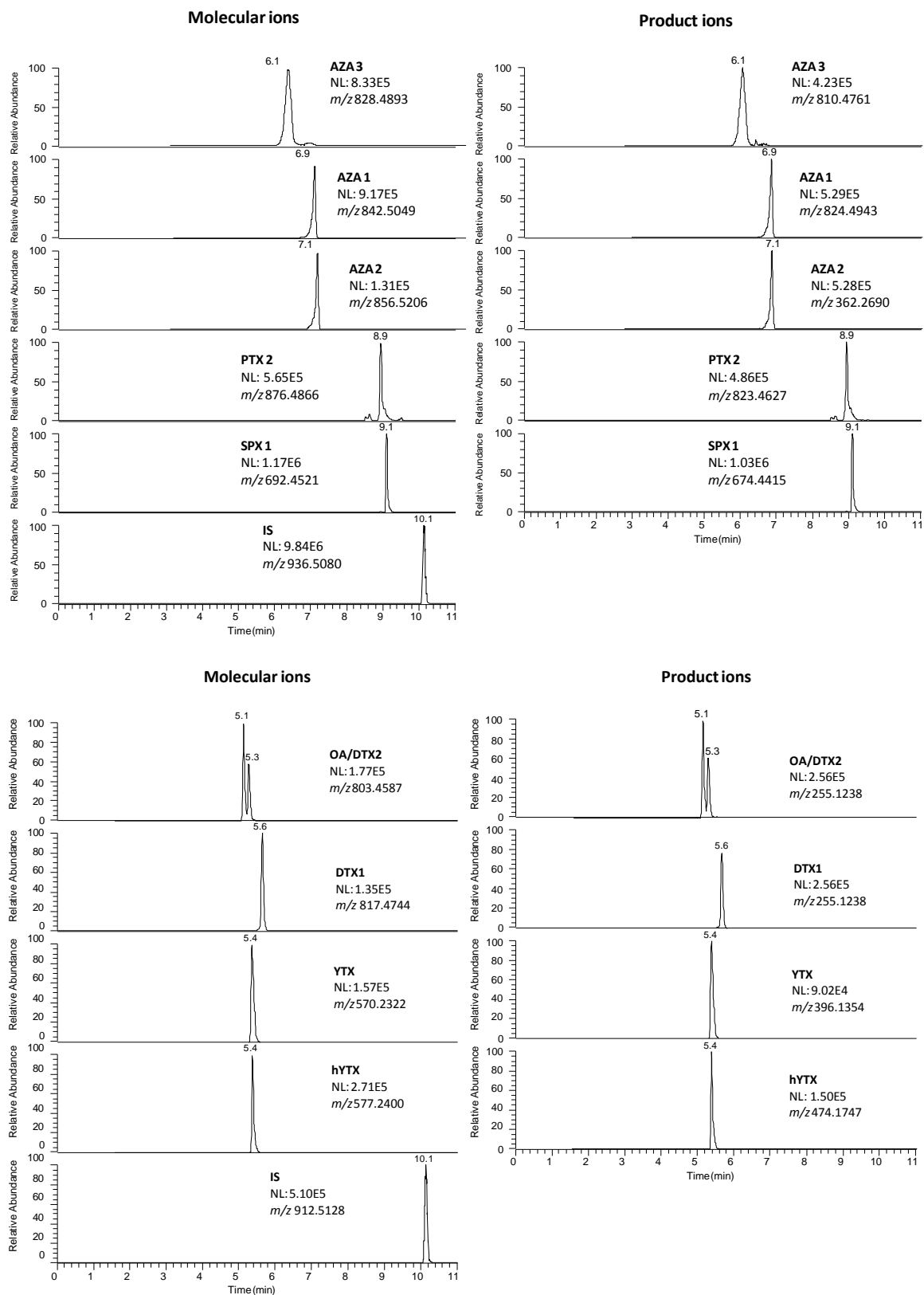


Fig. 1. Separation achieved by the Acquity BEH column tested in its optimal working conditions for a mixture of MBTXs ($100 \mu\text{g L}^{-1}$), for which standards are available including the IS ($75 \mu\text{g L}^{-1}$). The extracted molecular ion chromatograms and the extracted product ion chromatograms (only one product shown) for the MBTXs ionized in positive ESI (top) and the MBTXs ionized in negative ESI (bottom) are shown.

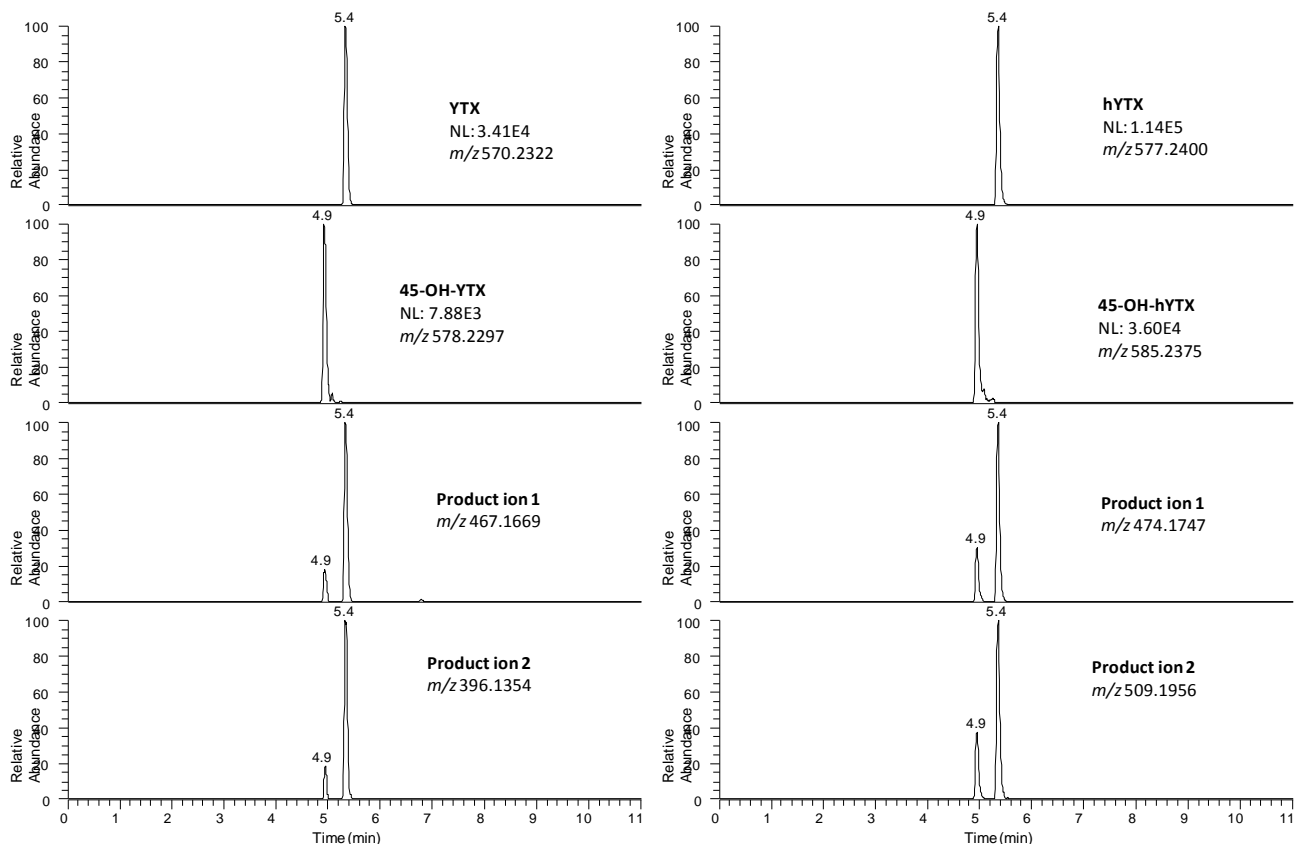


Fig. 2. Mussel extract containing YTX, hYTX, 45-OH-YTX and 45-OH-hYTX.

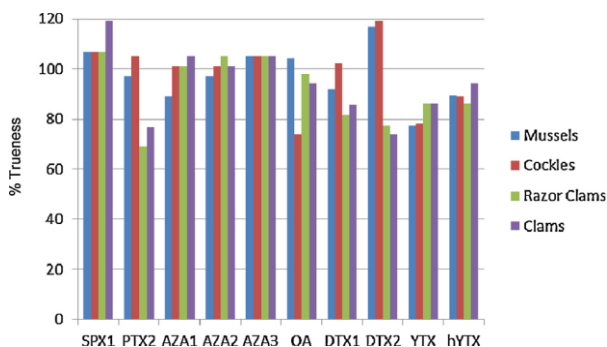


Fig. 3. Comparison of trueness for different matrices at a concentration of 25 µg kg⁻¹.

1:1) (see Table 3). Multiplexing was defined, taking into account chromatographic co-elutions in the time segment.

3.3. Optimization of QuEChERS extraction method

QuEChERS was the method of choice because of its high throughput and in order to establish a simple and robust method of analysis. This strategy is based on extraction, usually with acetonitrile, in the presence of salts, and a clean-up step based on a dispersive SPE. The following issues were investigated: the sample:solvent ratio, the evaporation step and finally the dispersive solid phases: C₁₈ versus primary, secondary amines (PSA) and the experiments are presented in Table 4. All experiments were

carried out in duplicate, evaluating recoveries of samples spiked at a concentration level of 50 µg kg⁻¹. To determine absolute recovery rates, the analytical signals obtained from samples spiked before extraction were compared with those obtained from extracts spiked after extraction and clean-up steps.

First of all sample weight was studied and, in order to decrease the cost of the analysis due to the high price of standards, 1–5 g of mussel were weighed instead of the 10 g originally used in the QuEChERS method [19].

Results can be summarized as follows:

- Extraction step: the proportion of sample:acetonitrile was 1:2 in experiments #1–5, the volume of acetonitrile seemed to be too small to extract all analytes properly. When the ratio was raised to 1:5 (experiment #6), recoveries improved.
- Dispersive clean-up step: The evaporation was a critical point as shown in experiment #2. When the extracts were evaporated to near dryness under a nitrogen stream in a thermostatic bath at 45 °C the recoveries decreased as shown in experiment #1 compared to #2. The decrease could be due to the instability of the MBTX in the evaporation conditions (temperature, gas flow) or to the conditions of the media after evaporation that could affect negatively the stability of the analytes.

The effects of using C₁₈ or PSA can be evaluated by comparing experiments #3 and #4. Much lower recoveries were observed using PSA when compared with experiments using C₁₈.

Finally, based on the results of experiment #6, and in the context of the results of all of the other experiments, we considered that the

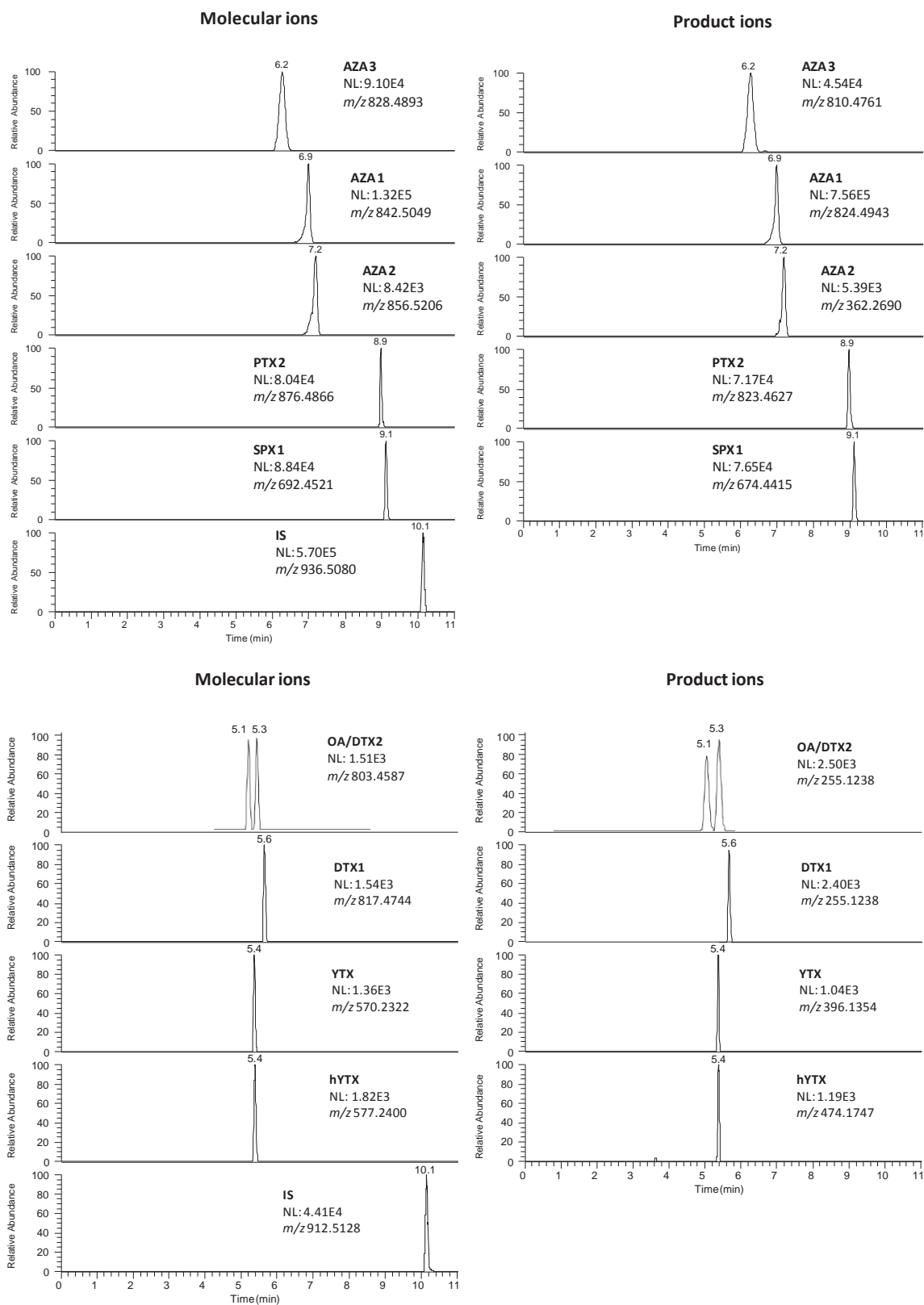


Table 5
Results for trueness and precision, expressed as RSD_R.

MBTX	Concentration (µg kg ⁻¹)	RSD _R (%)	Trueness (%)	MBTX	Concentration (µg kg ⁻¹)	RSD _R (%)	Trueness (%)
SPX1	25	13.5	114	OA	25	18.7	79
	50	2.6	122		50	8.7	95
	160	4.2	102		160	3.2	100
PTX2	25	14.2	98	DTX1	25	10.7	114
	50	5.7	120		50	13.3	108
	160	2.9	99		160	6.0	104
AZA1	25	12.4	83	DTX2	25	15.6	125
	63	3.8	111		50	8.9	107
	160	1.9	102		160	6.4	103
AZA2	25	12.2	89	YTX	25	9.8	79
	63	4.0	104		160	7.1	95
	160	1.5	102		1000	2.8	100
AZA3	25	10.6	89	hYTX	25	13.3	79
	63	3.4	106		160	5.4	99
	160	3.0	101		1000	4.2	102

ratio of sample: ACN:C₁₈ (1:5:0.025) was the most appropriated to validate the method.

Thus, the final method consisted of extraction using acetonitrile in presence of salts (NaCl and MgSO₄) and a dispersive clean-up step (C₁₈) with a careful evaporation and dilution with mobile phase. The extract was then injected into the LC system.

The recovery of IS in the selected conditions was also determined and was 89%. To detect the total OA/DTX it was necessary to hydrolyse the ACN purified extract in basic methanol as SOPs details [7]. In the hydrolysis step the IS hydrolysed because it has an ester group, for that reason IS had to be spiked before injection in the LC system.

Once the extraction method was established, canned and fresh bivalve samples from various species were tested, namely canned mussels, clams, cockles and razor clams. No difference was found between these matrices (Fig. 3), evaluated in terms of trueness of the spiked samples at a concentration of 25 µg kg⁻¹. Responses of the internal standards in samples from those species were also compared and no differences were observed. As an example, the analysis of a canned razor clam sample spiked with the MBTXs standards available at 25 µg kg⁻¹ (the limit of quantification) including the IS (75 µg L⁻¹, 2 µL) is shown in Fig. 4.

3.4. Validation of the QuEChERS UHPLC HRMS/MS method

The method was validated in mussel muscle. Specificity was assessed by analyzing blank mussel samples and no peaks at the retention times of the target compounds were detected, which indicates that the method is free of endogenous interferences. In addition, blank clam samples, blank cockle samples and blank razor clams samples were also investigated, and again no interfering peaks were observed at the analytes retention time.

To establish the lower limits of the method, SMMS containing 5, 10, 25 and 50 µg kg⁻¹ of MBTXs were injected. The ion ratio confirmation criterion was considered to assess the limit, and 25 µg kg⁻¹ was established as the quantification limit for the set of analytes.

In the linearity studies, calibration curves for each compound were built using blank samples spiked with the analytes at five different concentration levels in triplicate, in the range 25–350 µg kg⁻¹, which covers the permitted levels, except for YTXs. For YTXs the blank samples were spiked at 1000 and 5000 µg kg⁻¹ and to quantify YTXs the extracts were properly diluted before injection into the LC system, to fit in the 25–350 µg kg⁻¹ range. The linearity of the curves was evaluated by regression analysis of the peak area ratio of the analyte to I.S. versus

the analyte concentration, and excellent results were obtained in all cases, with coefficients of regression (r^2) ≥ 0.9998 and residuals below 25% in the lowest level (25 µg kg⁻¹) and below 15% for higher concentrations.

The accuracy was determined in terms of trueness and precision (Table 5). Since no certified reference material is available for the whole set of analytes, trueness and intermediate precision were evaluated from five spiked samples analyzed daily at each concentration level, at three concentration levels during 3 days. Trueness, expressed as recovery, ranged from 79% to 114%. Intermediate precisions, expressed as RSD%, ranged between 1.5% and 18.7%, and were lower than the value calculated by the Horwitz equation [33]. In addition, two mussel certified reference materials (CRM-AZA-Mus and Mussel-DSP-2) for AZA1, AZA2 and AZA3 and OA, DTX1 and DTX3 were analyzed, and good agreement with certified data were achieved (Table 6).

A study with samples from different bivalve species was performed. Oyster, clam, razor clam, and mussel samples, either fresh or canned, were spiked at different concentration levels with MBTX and analysed with the new method. The quantification was made with a calibration curve built with SMMS prepared from mussels. The recoveries were in the range 69–119% (Fig. 3), suggesting that samples from different shellfish species can be quantified with a single SMMS calibration curve. This point is highly relevant for routine laboratories that analyze samples from several species.

Finally, the performance of the method was evaluated by participating in one inter-laboratory exercise (EURLMB 2014), organized by the European Reference Laboratory on MBTXs. Mussel samples containing OA group (OA, DTX2, DTX3), AZA group (AZA1, AZA2, AZA3) and YTX group (YTX, 45-OH-YTX) were analyzed, and excellent results were obtained, with satisfactory Z-score for the majority of analytes except for YTX. The unsatisfactory

Table 6
Analysis of the mussel certified reference materials CRM-AZA-Mus and Mussel-DSP-2.

MBTX	Certified value		Determined	
	Concentration (mg kg ⁻¹)	Uncertainty (%)	Concentration (mg kg ⁻¹)	Trueness (%)
OA	0.361	0.034	0.336	93.1
DTX1	0.206	0.019	0.189	91.8
DTX3	0.283	0.054	0.287	101.4
AZA1	1.16	0.10	1.06	91.4
AZA2	0.273	0.024	0.256	93.8
AZA3	0.211	0.023	0.222	105.2

result was attributed to the high concentration of YTX in the sample. The extraction was performed with less amount of sample. The final Z-scores assigned by the European Reference Laboratory were <2, namely: OA (equivalents/kg) Z-score = -0.3; free OA Z-score = +0.4; AZA (equivalents/kg) Z-score = -0.9; AZA1 Z-score = -1.4; AZA2 Z-score = -0.8; AZA3 Z-score = +0.2; YTX (equivalents/kg) Z-score = +1.0; YTX Z-score = +1.4; 45-OH-YTX Z-score = 0.0.

4. Conclusions

The use of the QuEChERS methodology combined with the application of UHPLC-HRMS in the MS/MS mode has shown to be both a straightforward and very reliable approach for the analysis of lipophilic MBTXs in bivalves.

On one hand, it has been demonstrated that the extraction with acetonitrile combined with a simple dSPE with C₁₈ provides high absolute recoveries for the extraction and clean-up steps. This simple treatment is highly effective, and large series of samples can be analyzed without special maintenance of the UHPLC-HRMS system.

On the other hand, the HRMS/MS acquisition mode, which meets the requirements of EU legislation, is a powerful tool to avoid matrix interferences. Accurate mass data are obtained for each analyte, for both the molecular ion and the selected fragment, providing excellent information in order to confirm the identity of the compound and to avoid the risk of false positive results.

Calibration with SMMS provides reliable quantitative results, and it has been shown that a calibration curve built from blank mussel samples can be suitable to analyze different bivalve species. Eprinomectin has shown an appropriate behavior to be used as internal standard for lipophilic MBTXs.

The developed method, which has been successfully validated, is suitable for the confirmatory quantitative analysis of lipophilic MBTXs in fresh and canned bivalves at the regulated concentration levels. The method is currently used in the LASPB in routine analysis, and it has been included in the scope of the accreditation following ISO/IEC 17025 requirements.

Acknowledgments

This study was supported by Thermo Fisher Scientific Inc..

The authors also would like to thank the European Reference Laboratory for Marine Biotoxins for supplying the mussel extract containing marine biotoxins.

References

- A. Gerssen, I.E. Pol-Hofstad, M. Poelman, P.P.J. Mulder, H.J. Van den Top, J. De Boer, Marine toxins: chemistry, toxicity, occurrence and detection, with special reference to the Dutch situation, *Toxins* 2 (4) (2010) 878–904.
- Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 Laying Down Specific Hygiene Rules for Food of Animal Origin, *OJ L* 139, 30.4.2004, p. 55.
- Commission Regulation (EU) No 786/2013 of 16 August 2013 Amending Annex III to Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council as Regards the Permitted Limits of Yessotoxins in Live Bivalve Molluscs, *OJ L* 220, 17.8.2013, p. 14.
- Commission Regulation (EC) No 2074/2005 of 5 December 2005 Laying Down Implementing Measures for Certain Products under Regulation (EC) No 853/2004 of the European Parliament and of the Council and for the Organisation of Official Controls Under Regulation (EC) No 854/2004 of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council, Derogating from Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council and amending Regulations (EC) No 853/2004 and (EC) No 854/2004, *OJ L* 338, 22.12.2005, p. 27.
- EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain, The EFSA Journal 1306 (2009) 1–23, Marine Biotoxins in Shellfish – Summary on Regulated Marine Biotoxins, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain.
- Commission Regulation (EU) No 15/2011 of 10 January 2011 Amending Regulation (EC) No 2074/2005 as Regards Recognised Testing Methods for Detecting Marine Biotoxins in Live Bivalve Molluscs, *OJ L* 6, 11.1.2011, p. 3–6.
- http://aesan.msssi.gob.es/CRLMB/docs/docs/metodos_analiticos_de_desarrollo/EU-Harmonised-SOP-LIPO-LCMSMSVersion4.pdf (accessed October 16, 2014).
- A. Brari'a-Magdalená, J.M. Leao-Martins, T. Glauner, A. Gago-Martínez, Intra-laboratory validation of a fast and sensitive UHPLC/MS/MS method with fast polarity switching for the analysis of lipophilic shellfish toxins, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 285.
- P. McCarron, E. Wright, M.A. Quilliam, Liquid chromatography/mass spectrometry of domoic acid and lipophilic shellfish toxins with selected reaction monitoring and optional confirmation by library searching of product ion spectra, *J. AOAC Int.* 97 (2014) 316.
- P. Blay, J.P. Hui, J. Chang, J.E. Melanson, Screening for multiple classes of marine biotoxins by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 577–585.
- A. Doménech, N. Cortés-Francisco, O. Palacios, J.M. Franco, P. Riobó, J.J. Llerena, S. Vichi, J. Caixach, Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1328 (0) (2014) 16–25.
- G. Orellana, J. Vanden Bussche, L. Van Meulebroek, M. Vandegheuchte, C. Janssen, L. Vanhaecke, Validation of a confirmatory method for lipophilic marine toxins in shellfish using UHPLC-HR-Orbitrap MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (22) (2014) 5303–5312.
- J. Regueiro, A.E. Rossignoli, G. Álvarez, J. Blanco, Automated on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for determination of lipophilic marine toxins in shellfish, *Food Chem.* 129 (2011) 533.
- A. These, J. Scholz, A. Preiss-Weigert, Sensitive method for the determination of lipophilic marine biotoxins in extracts of mussels and processed shellfish by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry based on enrichment by solid-phase extraction, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4529.
- A. Gerssen, P.P.J. Mulder, M.A. McElhinney, J. de Boer, Liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1421.
- A. Gerssen, E.H.W. Van Olt, P.P.J. Mulder, J. De Boer, In-house validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of lipophilic marine toxins in shellfish using matrix-matched calibration, *Anal. Bioanal. Chem.* 397 (2010) 3079–3088.
- H.J. van den Top, A. Gerssen, P. McCarron, H.P. van Egmon, Quantitative determination of marine lipophilic toxins in mussels, oysters and cockles using liquid chromatography–mass spectrometry: inter-laboratory validation study, *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo Risk Assess.* 28 (2011) 1745.
- J. Kilcoyne, E. Fux, Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 7123.
- M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbauer, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid phase extraction for the determination of pesticide residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- P. Yogendrarajaha, C. Van Poucke, B. De Meulenaer, S. De Saeger, Development and validation of a QuEChERS based liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of multiple mycotoxins in spices, *J. Chromatogr. A* 1297 (2013) 1–11.
- Y.S. Johnson, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible seafood by QuEChERS-based extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Food Sci.* 77 (2012) T131–T137.
- B. Kinsella, P. Byrne, H. Cantwell, M. McCormack, A. Furey, M. Danaher, Determination of the new anthelmintic monepantel and its sulfone metabolite in milk and muscle using a UHPLC-MS/MS and QuEChERS method, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 3707–3713.
- S.C. Cunha, J.O. Fernandes, Assessment of bisphenol A and bisphenol B in canned vegetables and fruits by gas chromatography–mass spectrometry after QuEChERS and dispersive liquid–liquid microextraction, *Food Control* 33 (2013) 549–555.
- M.S. Bittencourt, M.T. Martins, F.G.S. de Albuquerque, F. Barreto, R. Hoff, High-throughput multiclass screening method for antibiotic residue analysis in meat using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: a novel minimum sample preparation procedure, *Food Addit. Contam. Part A* 29 (2012) 508–516.
- M. Lombardo-Agüí, A. García-Campana, C. Cruces-Blanco, L. Gámiz-Gracia, Determination of quinolones in fish by ultra-high performance liquid chromatography with fluorescence detection using QuEChERS as sample treatment, *Food Control* 50 (2015) 864–868.
- A. Gerssen, P.P.J. Mulder, J. de Boer, Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 685 (2011) 176.
- P. Kumar, A. Rúbies, F. Centrich, M. Granados, N. Cortés-Francisco, J. Caixach, R. Companyó, Targeted analysis with benchtop quadrupole-orbitrap hybrid mass spectrometer: application to determination of synthetic hormones in animal urine, *Anal. Chim. Acta* 780 (2013) 65.
- P.G. Wang, M.F. Vitha, J.F. Kay (Eds.), *High Throughput Analysis for Food Safety*, Wiley, 2014, Chapter 2.
- M. Scigelova, M. Hornshaw, A. Giannakopoulos, A. Makarov, Fourier transform mass spectrometry, *Mol. Cell Proteomics* 10 (7) (2011), <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.009431>, M111.009431.

- 30 UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 Conformity Assessment, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.
- 31 B.T. Webb, K.M. Sargent, B. Stein, *Methodology for Accurate Mass Measurement of Small Molecules*. Best Practice Guide, LGC, London, 2004.
- 32 M. Garcia-Altare, J. Diófene, P. De la Iglesia, The implementation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for the official control of lipophilic toxins in seafood: single-laboratory validation under four chromatographic conditions, *J. Chromatogr. A* 1275 (2013) 48–60.
- [33] W. Horwitz, L.R. Kamps, K.W. Boyer, Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 1344–1354.

5.3. Discussió de resultats

5.3.1. Mètode d'extracció

El mètode que s'ha desenvolupat en aquesta tesi fa una aproximació a l'anàlisi de toxines marines lipofíliques en bivalves força diferent a la proposta del Laboratori Europeu de Referència per a Biotoxines Marines (EURLMB), localitzat a Vigo.

El mètode SOP-EURLMB [102] es basa en una extracció amb metanol, tal com es fa a la pràctica totalitat dels mètodes existents, i la determinació mitjançant LC-MS/MS, tal com estableix el Reglament 15/2011/CE [36]). El SOP-EURLMB proposa utilitzar columnes cromatogràfiques de C8 o C18 i deixa oberta la possibilitat d'usar fases mòbils basades en acetonitril-aigua àcides (amb àcid fòrmic i formiat amònic) o bàsiques (amb amoníac). D'entrada no inclou cap etapa de purificació, tot i que indica que se'n dugui a terme si convé, però no proposa cap procediment.

Els assajos fets al LASPB amb mostres de musclos aplicant el mètode SOP-EURLMB havien posat de manifest que els extractes metanòlics eren molt complexos, i el sistema LC/MS necessitava manteniment molt freqüent, la qual cosa és un greu inconvenient en un laboratori com el LASPB. A més la sensibilitat que s'obtenia no era del tot satisfactòria.

En aquest context es va decidir posar a punt un mètode d'anàlisi per a les biotoxines marines lipofíliques regulades a la UE que incorporés una etapa de clean-up. Tot i això, el tractament de mostra havia de ser relativament senzill, adequat per a un laboratori que ha de processar un gran volum de mostres. Es va decidir provar la metodologia QuEChERS, és a dir, una extracció amb acetonitril en presència d'una concentració elevada de sals, seguida d'una purificació de l'extracte mitjançant extracció en fase sòlida dispersiva (dSPE). La determinació de les biotoxines en els extractes es faria mitjançant LC-MS/HRMS, amb un equip Q-Orbitrap acoblat al sistema cromatogràfic.

Un punt que va influir força en el disseny del mètode, i que té una gran rellevància, és el dels patrons i la quantificació. L'elevat preu i la disponibilitat de patrons de biotoxines són factors molt limitants. Els patrons comercials no

són sintetitzats al laboratori sinó que s'obtenen a partir de mostres d'aigua o de bivalves amb presència natural de toxines [37, 38, 39]. És per aquest motiu que la disponibilitat és molt limitada; hi ha patrons per a poques biotoxines i el seu preu és elevadíssim. De fet no hi ha patrons per a algunes de les biotoxines marines regulades (per exemple, la PTX-1, la DTX-1 o la DTX-2). Com a conseqüència, cal fer algunes suposicions, com la d'assumir que el comportament de la biotoxina per a la que no tenim patró és equivalent a la d'una altra toxina de la mateixa família, per a la que si es disposa de patró [102]. Per exemple la PTX-1 es quantifica a partir de la recta de calibratge obtinguda amb patró de PTX-2. D'altra banda, evidentment, no hi ha patrons marcats isotòpicament.

Cal esmentar el fet que en el mètode desenvolupat s'ha treballat amb el mateix tipus de calibratge que en l'anàlisi de residus de medicaments d'ús veterinari, és a dir amb rectes construïdes amb patrons preparats a partir de mostres blanques dopades a l'inici del procés, obviant així l'haver de corregir per la recuperació del mètode. En el cas de les biotoxines per les que no es disposa de patró, s'ha considerat que l'extracció i l'efecte matriu sobre la resposta de l'espectròmetre de masses són equivalents als dels compostos relacionats, dels que sí es disposa de patrons. Cal comentar que aquest tipus de calibratge implica un consum relativament elevat de patrons, i que per raons de tipus econòmic, en l'optimització del mètode es va fer un esforç considerable en escalar el procediment, per minimitzar la despesa de patrons. S'ha estimat que el cost de preparar els patrons per obtenir una recta de calibratge és d'uns 1.500€.

En aquest context té una gran importància comprovar l'estabilitat de les solucions dels patrons SMMSs al llarg del temps. Per aquest motiu es va dur a terme un estudi de l'estabilitat de patrons en mostra conservant a -18°C els extractes de mostres de músculo dopades a una concentració de 160 µg/kg i injectant-los durant 39 dies; no es va detectar degradació dels patrons, és a dir els SMMS són estables durant un mínim de 5 setmanes. Aquesta conclusió és coherent amb l'article de Fang et al [118], on demostra l'estabilitat de mostres de músculo dopades i conservades a una temperatura de -20°C durant 15 dies.

Pel que fa a la tria del patró intern, i donada la impossibilitat d'aconseguir biotoxines marcades isotòpicament, es van fer tenint en compte 3 factors:

- Tenir una bona recuperació en aplicar el procediment d'extracció i clean-up del mètode
- Poder ionitzar-se en mode positiu i negatiu
- Tenir pes molecular elevat, del mateix ordre que els anàlits.

L'eprinomectina (Figura 5.3.1), una avermectina que complia els requisits mencionats, va ser seleccionada com a patró intern i va mostrar un comportament molt satisfactori.

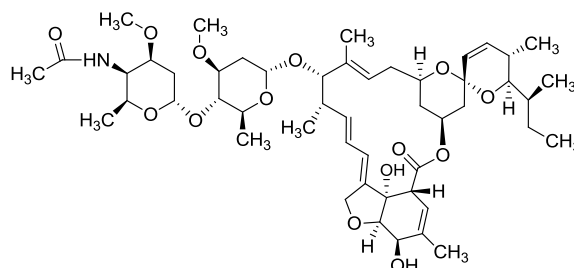


Figura 5.3.1: estructura de l'eprinomectina

L'optimització del tractament de mostra es va realitzar treballant sempre amb mostres de músculo fresc i per a l'etapa d'extracció es van establir les següents condicions:

- quantitat de mostra :1g
- volum d'extractant (acetonitril): 5ml
- quantitat de les sals usades per a l'efecte de salament (salting-out) a l'extracció:0,1 g NaCl i 0,5 g MgSO₄

Els bivalves transformen les toxines de la família de l'OA (OA, DTX-1 i DTX-2) en derivats 7-O-acil (ésteres dels àcids grassos); aquests compostos s'anomenen de forma col·lectiva DTX-3 i degut a la seva estructura perden l'afinitat per la serina-treonina-fosfatassa, perdent d'aquesta manera toxicitat en comparació amb la resta de toxines marines. Tot i així, quan els humans consumeixen aquests bivalves, els enzims que digereixen els lípids poden hidrolitzar l'enllaç éster i alliberar d'aquesta manera la forma activa de la toxina, incrementant la toxicitat de l'aliment. Per tant, cal determinar també els ésters de l'àcid okadaic tot i que en sentit estricte no siguin tan tòxics.

Encara no ha estat possible establir una ratio entre les formes actives i inactives d'aquestes toxines en bivalves [113]. Així, per tal de determinar els ésters (DTX-3), cal transformar-los al compost base de la família i per aquesta raó el mètode inclou una etapa d'hidròlisi en medi alcalí d'una fracció de l'extracte dels esmentats ésters. Aquesta etapa, però, hidrolitza també l'eprinomectina, donat que aquest compost també conté un grup éster. Per aquest motiu cal afegir el patró intern al final del tractament, abans de l'anàlisi cromatogràfica de l'extracte hidrolitzat.

En avaluar l'etapa de clean-up, es va considerar l'opció de no dur a terme cap purificació, però es va comprovar que era del tot inviable, perquè s'embrutava molt el sistema UHPLC-HRMS/MS, i resultava impossible l'anàlisi de tantes relativament llargues de mostres. De fet, el SOP-EURLMB ja contempla el fet que el sistema cromatogràfic pateixi deriva de la resposta pel fet d'analitzar extractes sense purificar; així recomana que els patrons de calibratge s'injectin al principi de la seqüència cromatogràfica, abans de les mostres, i al final de tot, i es comparin els pendents obtinguts a les rectes de cada toxina, que no han de variar més d'un 25%.

Així doncs, es va avaluar la purificació dels extractes mitjançant una d-SPE, tal com es fa habitualment als procediments QuEChERS. Es va comparar l'ús de les fases sòlides C18 i PSA (amines primàries-secundàries); els resultats van demostrar que era més adequada la fase C18 i la quantitat òptima a usar era de 25 mg.

Finalment, abans d'injectar els extractes obtinguts al sistema cromatogràfic cal evaporar dissolvent i redissoldre amb fase mòbil. Es va comprovar que l'evaporació a sequedat conduïa a una menor recuperació. Els millors resultats es van obtenir amb una evaporació fins a 1 ml i diluint fins a 4 ml amb una solució de composició 75% aigua (amoníac 6,7mM) i 25% acetonitril, similar a la de la fase mòbil cromatogràfica inicial.

5.3.2. Mètode cromatogràfic i validació

Pel que fa a la separació cromatogràfica, es van provar columnes de diferents tipus de fases estacionàries C18. La separació en una columna C18 ve regida

pel caràcter lipofílic dels anàlits i per la presència de grups ionitzats o polars, que interaccionen amb la fase estacionària. Inicialment es van fer assajos amb separacions en medi àcid i en condicions d'UHPLC. Es van provar les columnes Kinetex XB C₁₈ (100 x 2,1) mm, de 1,7 µm, Hypersil Gold aQ C₁₈ (100 x 2,1) mm, de 1,9 µm i Synchronis, C₁₈ (100 x 2,1) mm, de 1,7 µm i en cap cas es van arribar a obtenir resultats prou satisfactoris per a totes les famílies de toxines marines lipofíliques (MBTXs) estudiades. En condicions àcides, l'OA i les DTX es troben en la seva forma neutra, i els seus pics cromatogràfics són simètrics, a l'igual que ocorre amb els azaspiràcids, que tenen caràcter amfòter pels grups carboxílics i per les amines substituïdes de la seva estructura. En el cas de les pectenotoxines, que no contenen grups ionitzables o els espiròlids, que tenen imines cícliques, els pics cromatogràfics són també simètrics. Però per a les yessotoxines, que tenen 2 grups sulfònics en l'estructura, s'obtenen pics amb molta cua. A més la separació cromatogràfica obtinguda entre compostos que necessiten un canvi de polaritat a la detecció MS era, en alguns casos, insuficient.

Tot i que en general és molt menys habitual l'ús de fases mòbils bàsiques, alguns autors han indicat que la separació de biotoxines marines es pot dur a terme de forma satisfactòria en medi bàsic [32, 119]. En aquest treball es va avaluar la separació de les biotoxines amb fases mòbils que contenien amoníac. D'entre les columnes que es van provar (X-Bridge C₁₈ (50x 2,1)mm, de 2,5 µm; BEH (Bridge Ethylene Hybrid) C₁₈ (100x 2,1) mm, de 1,7 µm i Hypersil Gold aQ C₁₈ (100x 2,1) mm, de 1,9 µm), els millors resultats es van obtenir amb la columna BEH. La columna BEH va mostrar robustesa cromatogràfica i una separació suficient dels anàlits detectats en mode positiu i negatiu. L'ús de fases mòbils bàsiques afavoreix la detecció dels compostos que s'ionitzen i es detecten en mode negatiu (OA, DTX i YTX). En el cas de les YTXs, en medi bàsic millora molt la seva forma de pic, comportament que també va descriure Gerssen [119, 125]. Finalment, pel que fa als compostos de la família de les AZAs i les PTX, el seu comportament en fase mòbil àcida o alcalina va ser similar.

D'altra banda, cal pensar en la manca d'estàndards comercials, que es pot solucionar, en part, amb l'ús de l'espectrometria de masses d'alta resolució. Així, monitoritzant la massa exacta del compost es pot detectar si alguna mostra presenta resposta cromatogràfica, tot i desconèixer el temps de retenció de l'anàlit. És el cas de la PTX-1 ($m/z=892,4815$), que és un compost que es diferencia de la PTX-2 ($m/z=876.4866$) pel grup hidroxil i que ha d'eluir en un temps de retenció proper.

El mateix ocorre amb els derivats 45-OH de les yessotoxines, de les que no es disposa de patró comercial. En aquest cas, però, es va poder injectar una mostra de músculo contaminat de forma natural amb 45-OH-yessotoxina i 45-OH-homo-yessotoxina, proporcionat pel EURLMB. Això va permetre, en aquest cas, caracteritzar el temps de retenció d'aquests anàlits.

Tot i així, per poder quantificar els anàlits dels que no es disposa de patró comercial, encara cal fer alguna suposició, ja permesa en el SOP-EURLMB, com és assumir una resposta equimolar amb el compost base de la família.

De tots els possibles modes de treball de l'espectròmetre Q-Exactive, es va triar el mode t-MS/MS amb una energia de col·lisió intermitja, mantenint part dels ions precursors i generant ions producte a la vegada. Es selecciona l'ió precursor en el quadrupol i es fragmenta parcialment a la cel·la de col·lisió. Poder monitoritzar l'ió precursor i els seus fragments és un gran avantatge, donat que dona encara més confiança en els resultats, evitant possibles errors d'assignació dels fragments a ions isobàrics coeluent. El fet d'usar el mode d'adquisició t-MS/MS, on el quadrupol fa una selecció prèvia, permet millorar la sensibilitat respecte els modes de detecció que no filtren amb el quadrupol (full-scan o full-scan-AIF).

El mètode ha estat validat seguint les directrius marcades per la Decisió 657/2002/CE [20] amb resultats plenament satisfactoris. L'interval de concentracions en què s'ha treballat es situa entre 25-350 $\mu\text{g}/\text{kg}$ per la majoria de compostos, excepte per les yessotoxines, que tenen un LMR força superior. El límit inferior (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) és en tots els casos molt inferior al LMR; els resultats de la validació mostren que el mètode és robust, amb recuperacions superiors al 75% i reproduïbilitats entre 1,5% i 15,6% en termes de RSD.

També es va dur a terme l'anàlisi de 2 materials de referència de músculo contaminat de forma natural i subministrats pel EURLMB; El material AZA-MUS contenia AZA-1, AZA-2 i AZA-3 i el material MUS-DSP-2 contenia OA, DTX-1 i DTX-3. Els resultats van ser molt satisfactoris per tots els anàlisis, amb veracitats entre 91,4% i el 105,2%, la qual cosa demostra la fiabilitat del mètode d'anàlisi establert. La taula 5.3.1 mostra els resultats de l'anàlisi dels esmentats materials de referència:

Taula 5.3.1: Resultats de l'anàlisi dels materials de referència certificats

material	MBTX	Valor certificat		Valor trobat	Veracitat (%)
		Concentració (mg/ kg)	Incertesa (mg/kg)	Concentració (mg/kg)	
MUS-DSP2	OA	0.361	0.034	0.34	93.1
	DTX1	0.206	0.019	0.19	91.8
	DTX3	0.283	0.054	0.29	101.4
AZA-MUS	AZA1	1.16	0.10	1.06	91.4
	AZA2	0.273	0.024	0.26	93.8
	AZA3	0.211	0.023	0.22	105.2

5.3.3. Aplicació a altres espècies i a matrius processades

El LASPB centra la seva activitat en el control alimentari i mediambiental; és per aquest motiu que cal disposar de mètodes d'anàlisi el més transversals possible, és a dir, aplicables a un ampli ventall de mostres. A més a més, el seu abast d'acreditació és flexible, la qual cosa implica que es puguin emetre resultats acreditats d'anàlisi de matrius noves sense haver passat una auditoria prèvia, tot i que cal comprovar de forma extensiva el comportament d'aquestes matrius no validades prèviament. Per aquestes raons es va avaluar l'aplicació del mètode d'anàlisi de toxines marines a l'anàlisi d'altres espècies de bivalves diferents de músculo i els resultats van ser satisfactoris. Entre les espècies comprovades hi ha cloïsses, navalles i escopinyes.

A més, per motius operatius, però també econòmics, es va comprovar l'ús de rectes obtingudes a partir de SMMS preparats en una determinada matriu per quantificar altres matrius.

Primerament es va comprovar que la resposta del patró intern en extractes d'espècies diferents era equivalent, treballant amb un marge d'acceptació del $\pm 20\%$. Aquest experiment va demostrar la manca d'interferències coeluent que provoquin supressió/ increment iònic i per tant, l'equivalència de matrius.

Seguidament es van quantificar, amb un calibratge obtingut en matriu musclo, mostres d'altres matrius dopades a un nivell de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$, amb resultats satisfactoris, ja que les recuperacions calculades es trobaven entre el 69% i el 119%. La figura 5.3.2 mostra les recuperacions dels diferents tipus de mostres dopades a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ calculades amb una recta de calibratge feta amb patrons de musclo dopat.

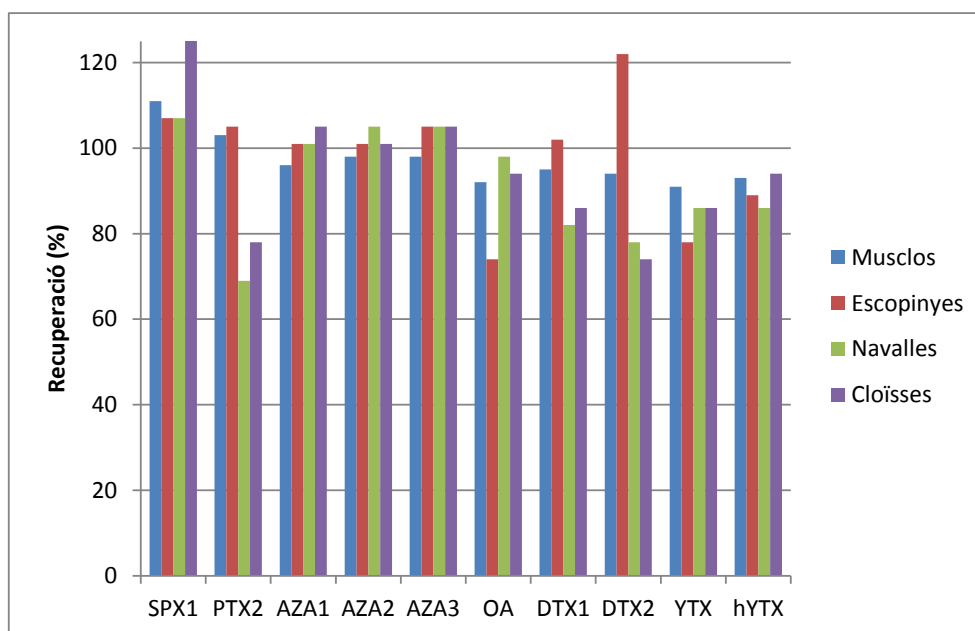


Figura 5.3.2. Recuperacions de biotoxines en mostres de diferents espècies de bivalves, dopades a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

D'altra banda s'ha participat amb aquest mètode en 2 exercicis interlaboratori; un organitzat pel EURLMB, dins el marc de les seves funcions com a laboratori de referència, i l'altre, anomenat Quasimeme (Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe), organitzat per la Universitat de

Wageningen (Països Baixos), i que forma part del programa WEPAL (Wageningen Evaluating Programmes for Analytical Laboratories).

En el cas de l'exercici EURLMB, en aplicar el mètode establert, es van obtenir Z-score satisfactoris per a tots els anàlits excepte per les yessotoxines, probablement degut a l'elevada concentració present en les mostres (Taula 5.3.1). Atès l'elevat nivell de concentració, es va modificar el procediment, reduint la quantitat de mostra, i els resultats obtinguts per a les YTXs ja van ser completament satisfactoris.

Taula 5.3.2. Resultats de l'exercici interlaboratori organitzat pel EURLMB

Anàlit	Z-score	Anàlit	Z-score
OA (equivalents)	-0.3	AZA3	+0.2
OA (lliure)	+0.4	YTX (equivalents)	+3.2
AZA (equivalents)	-0.9	YTX	+4.8
AZA1	-1.4	45-OH-YTX	+0.7
AZA2	-0.8		

Pel que fa als resultats de l'interlaboratori Quasimeme, cal diferenciar els materials que eren estàndards (3) dels que contien matriu musclo (2). Pels materials que consistien en toxines en dissolució, es van obtenir resultats satisfactoris per a totes les toxines presents (Azaspiracids i DTX-1). En el cas del material consistent en un extracte DSP/AZP, els valors de assignats de forma individual van ser correctes en tots els casos; tot i així, AZA-2 i AZA-3 es trobaven per sota del LQ del mètode (20.67 µg/kg AZA-2 i 15.14 µg/kg AZA-3), la qual cosa va fer que el resultat de la suma de les biotoxines del grup Azaspiracid estigués fora de l'interval d'acceptació, en no poder sumar els valors per sota del LQ.

En el cas dels materials que consistien en bivalves, tots els resultats quantificats dins de l'interval de concentracions de treball del laboratori (25-350 µg/kg) rendeixen Z-scores satisfactoris.

A tall d'exemple, a la figura 5.3.3 es mostren els resultats obtinguts per AZA-1 en els diferents tipus de mostra. El codi del laboratori és 03806.

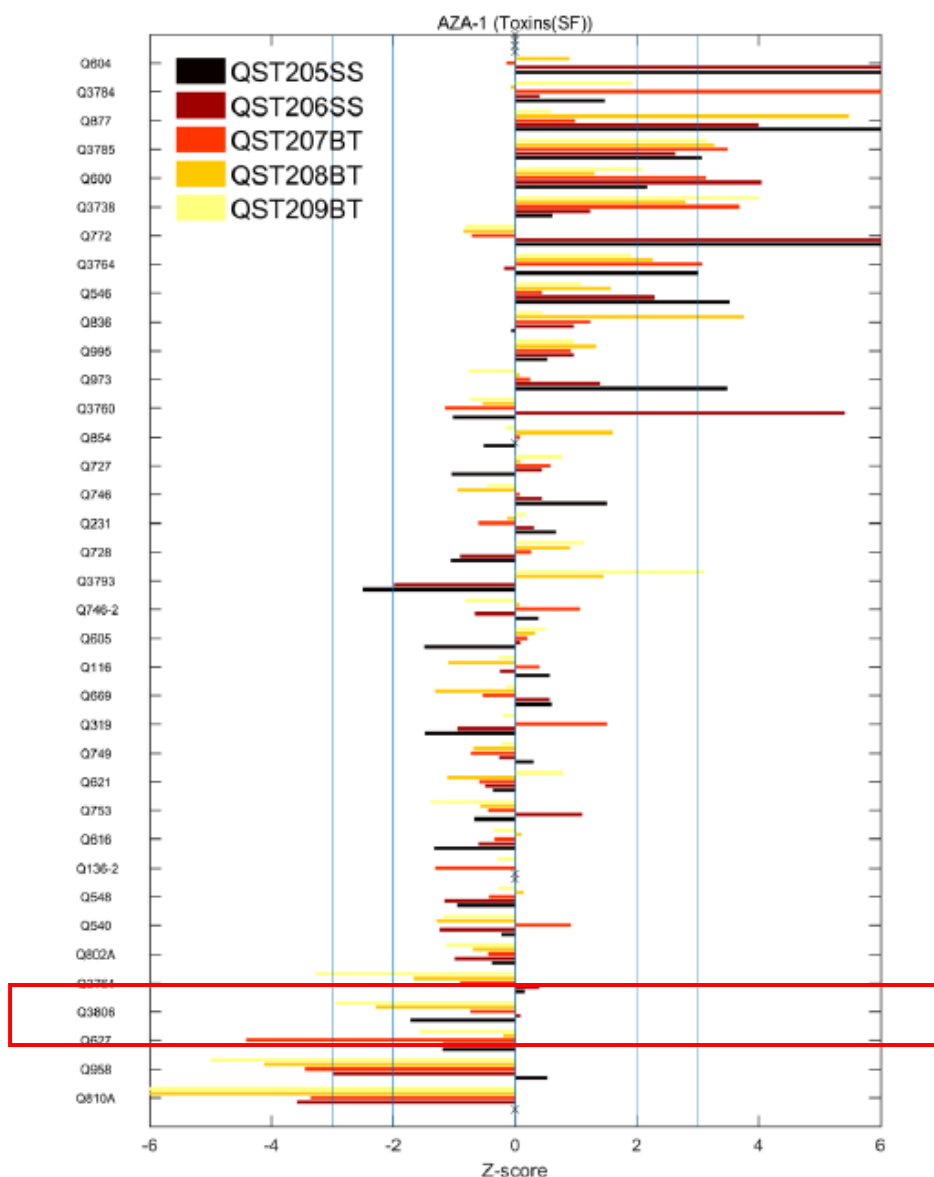


Figura 5.3.3: Gràfic de resultats per l'anàlisi AZA-1 en les diferents mostres que componen l'exercici interlaboratori Quasimeme.

A part de les mostres de bivalves frescs, també és d'interès el poder analitzar mostres de bivalves processats que es troben en el mercat.

Per aquest tipus de mostres cal tenir en compte que els tractaments tèrmics provoquen pèrdues d'aigua dels bivalves, la qual cosa resulta en un increment de la concentració de les toxines en l'aliment processat. Per exemple, el tractament al vapor provoca una pèrdua mitjana del 30% del contingut d'aigua i el tractament amb l'autoclau provoca una pèrdua a l'entorn del 50% d'aigua, respecte el contingut inicial.

El SOP-EURLMB inclou en l'annex C, un procediment per tractar les mostres processades i compensar les pèrdues d'aigua dels tractaments. Aquest annex està basat en el mètode 937.07 de l'AOAC [114] i es detalla seguidament:

- 1) Aliments enllaunats o en conservats en líquids comestibles (oli, salsa o aigua): cal mesurar la ratio mostra:aigua i si és $> 50\%$ (o s'ha obtingut una pasta heterogènia) cal afegir aigua fins arribar a aquesta proporció. Aquest factor de dilució haurà de ser tingut en compte a l'hora de calcular la concentració de toxina en la mostra; es recomana seguir un procés de clean-up en l'extracció d'aquest tipus de mostra.
- 2) Aliments conservats en líquids no comestibles (per exemple en salmorra): cal eliminar el líquid de conserva, esbandir la mostra amb aigua, i escórrer els bivalves; pesar la mostra escorreguda i tot seguit afegir aigua fins arribar a la proporció del 50%. Homogeneïtzar la mostra.
- 3) Aliments tractats al vapor: pesar la mostra i reconstituir amb aigua en la proporció 70:30 (mostra:aigua). Homogeneïtzar la mostra.
- 4) Aliments envasats al buit: cal incloure tot el líquid present a l'envàs abans d'homogeneïtzar. Si els bivalves porten la closca, cal separar-la i el líquid sobrant s'ha de guardar per afegir-lo abans d'homogeneïtzar.

En el transcurs de l'estudi amb productes processats es va analitzar la presència de toxines marines en el líquid de govern de les mostres en conserva i en els bivalves; d'aquesta manera es pot avaluar de forma global el risc de la ingesta per part del consumidor. Així, el mètode proposat va aplicar-se a l'anàlisi de MBTXs en bivalves processats: envasats al buit, cuits al vapor, en escabetx, en sal i en líquid de conserva "al natural".

Inicialment es va comprovar si existien diferències significatives en el comportament dels diferents tipus de mostra a estudiar; es van dopar mostres (50 µg/kg) i es van quantificar usant una recta preparada amb patrons obtinguts a partir de múscols en salsa de tomàquet. La figura 5.3.4 mostra els resultats de l'estudi:

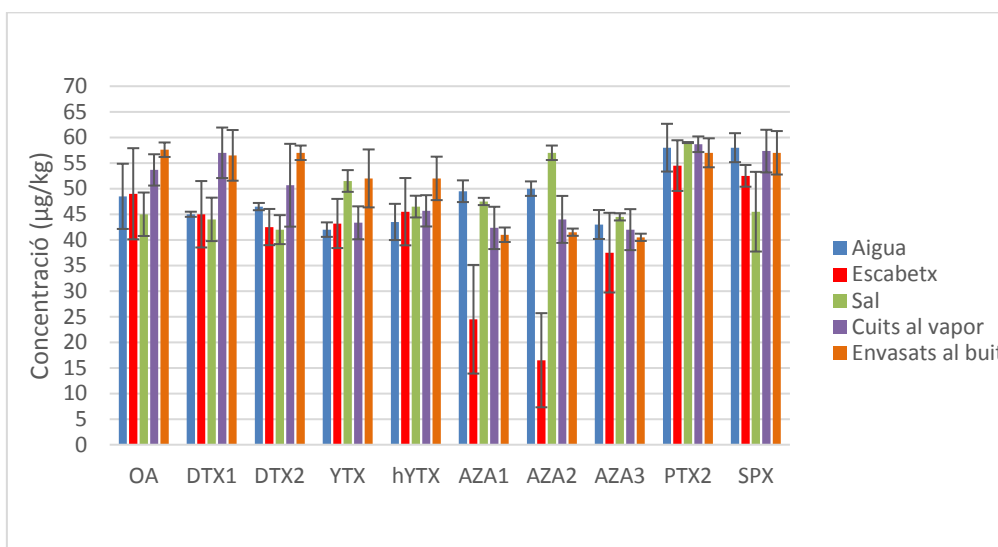


Figura 5.3.4: Resultats de l'anàlisi de mostres adicionades amb biotoxines (50 µg/kg), i quantificades amb un calibratge obtingut a partir de musclos en conserva en salsa de tomàquet.

Com a conclusió es pot afirmar que no existeix un efecte matriu significatiu, excepte en el cas dels azaspiracids, en què les mostres en medis com l'escabetx, mostraven una resposta significativament menor, és a dir que un únic calibratge serà vàlid per a la quantificació de les diverses matrius, excepte en el cas d'haver d'analitzar AZAs en conserva d'excabetx. En aquest cas caldria dur a terme un calibratge amb la pròpia matriu.

D'altra banda també es va avaluar la distribució de les biotoxines en la mostra, és a dir el repartiment entre l'aliment i el líquid de govern amb la finalitat d'establir la possible perillositat del consum del medi de conserva dels bivalves. En les mostres estudiades, només es va trobar presència de forma natural (no adicionada) i quantificable d'àcid okadaic en mostres de músculo conservades en aigua i mostres de músculo en escabetx. Es va analitzar: músculo sol, líquid de govern sol i la seva mescla al 50%. En tractar-se de l'àcid okadaic es van hidrolitzar part dels extractes amb la finalitat de determinar els ésters de la família de les DSP. Els resultats poden observar-se a la Figura 5.3.5.

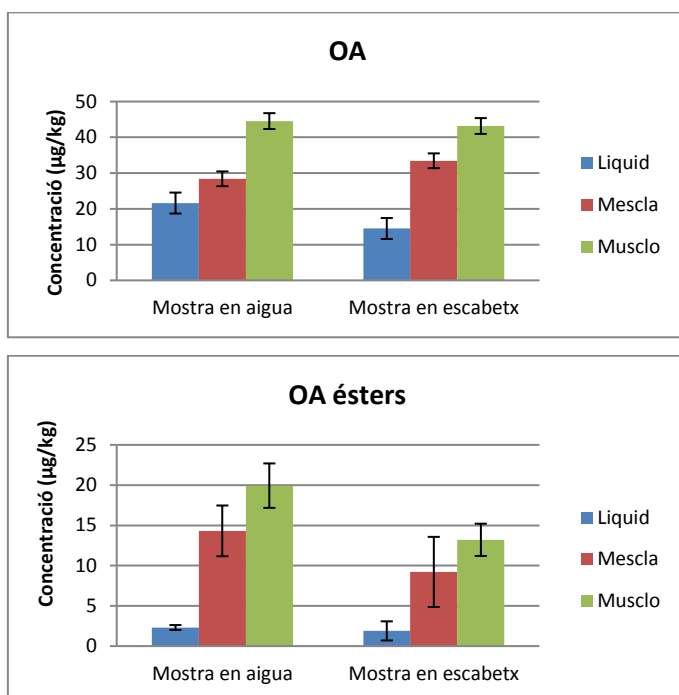


Figura 5.3.5. Distribució de l'àcid okadaic i els seus ésters en mostres de conserves de musclos en aigua i en escabetx (n=3)

Com es pot observar a partir del gràfic, la mostra contenia ésters de les toxines de la família de l'OA i la major concentració es donava en el bivalve i en la barreja, la qual cosa permet concloure la major afinitat d'aquestes biotoxines per la matriu amb més part greixosa en comparació amb els líquids de base aquosa.

Atès que a les mostres analitzades només es va poder avaluar la distribució de l'OA, es va fer un estudi amb mostres processades dopades amb el conjunt de biotoxines. Per a l'estudi es van dopar els líquids de govern de les mostres a un nivell de 50 µg/kg, es van sonicar 1 hora cada dia durant 5 jornades de treball, conservant-les en refrigeració (5°C) durant 14 dies. Les mostres es van quantificar usant un calibratge realitzat a partir de SMMS amb musclos en tomàquet. Els resultats confirmen el que es va veure en el cas de l'àcid okadaic i els seus ésters presents de forma natural en mostres: la major afinitat de les toxines per la matriu en comparació amb el líquid de govern (Figura 5.3.6). Les ratios d'incorporació van ser diferents segons l'anàlit, però en tot cas la concentració va ser sempre superior en el bivalve. Així, existeix una clara

afinitat de les toxines pels bivalves i no pels líquids de govern dels aliments conservats.

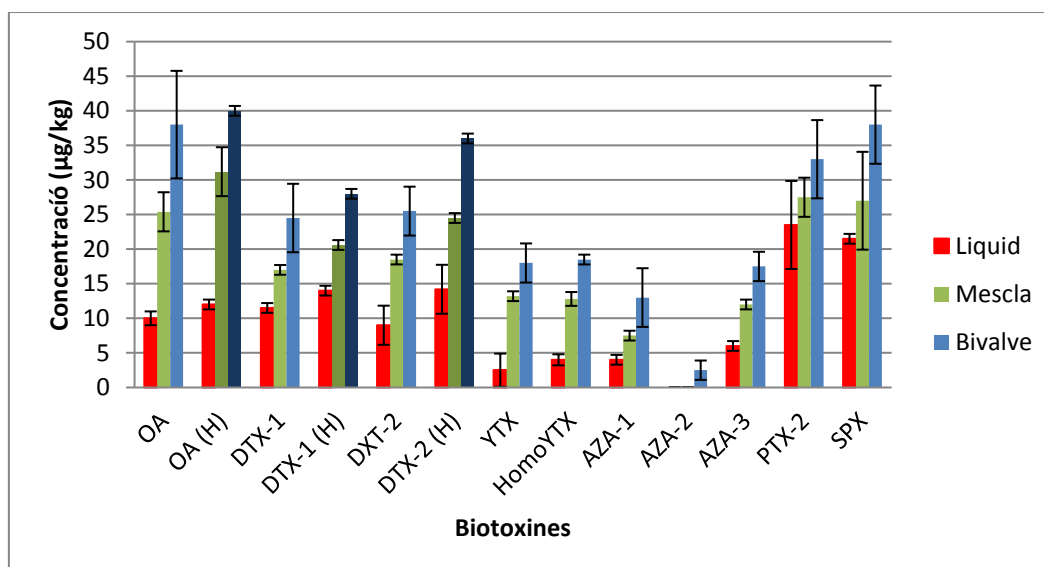


Figura 5.3.6: concentració de toxines comparativa: en bivalve, en líquid de govern i en la mescla d'ambdós.

Per tant, pel que fa a la ingesta de MBTXs, per a la majoria de toxines la contribució del líquid de govern no és massa rellevant.

D'altra banda, val a dir que la proposta del SOP-EURLMB d'analitzar la mescla de bivalve i líquid condueix a valors de MBTXs inferiors al del bivalve processat, però més propers als valors del producte fresc, per al que s'han establert els LMRs.

En aquests sentit, aquesta estratègia és proteccionista de cara als productors. Des de l'entrada en vigor de la legislació que regula els LMR de bivalves frescs, la indústria conservera reclama un canvi en l'enfocament, ja que partint de producte fresc conforme a la legislació, es pot donar el cas que el contingut de MBTx en el producte processat superi els límits permesos (que de fet estan regulats pel producte fresc), amb unes pèrdues econòmiques molt importants. Sembla necessari establir una normativa clara que contempli tant producte fresc i processat, i que eviti la indefinició de la que es queixen productors, alhora que protegeixi els consumidors.

6. CONCLUSIONS

Els mètodes establerts partien tots d'una mateixa premissa, que era la de desenvolupar metodologia analítica fiable, senzilla, que permetés un processat àgil de les mostres, i que fos transversal, aplicable a diferents tipus de mostres. D'una banda per a l'extracció dels anàlits s'han aplicat estratègies de tipus QuEChERS, adaptades a cada família d'anàlits. Les separacions cromatogràfiques es proposen en general amb fases estacionàries de nucli sòlid o de grandària de partícula inferior a 2 µm, que proporcionen una elevada eficàcia, i permeten fer separacions amb temps relativament curts, inferiors a 15 minuts. Finalment per a la detecció, com a tècnica de rutina es proposa l'espectrometria de masses en tàndem de baixa resolució, usant espectròmetres de triple quadrupol, que proporcionen una bona selectivitat i sensibilitat. Tanmateix per a la comprovació de resultats dubtosos, o en condicions que exigeixen una selectivitat o sensibilitat encara més elevada, es proposa l'ús de l'espectrometria de masses d'alta resolució. Els mètodes desenvolupats han estat validats de forma satisfactòria seguint les pautes de la Decisió 657/2002/CE, i estan implementats al laboratori de l'Agència de Salut Pública de Barcelona, on són utilitzats per al control oficial d'aliments. Seguidament es concreten les conclusions més rellevants dels estudis realitzats.

Anàlisi d'ivermectines:

- L'extracció amb acetonitril en presència de sulfat de magnesi, clorur de sodi i amoníac proporciona resultats satisfactoris. L'addició d'amoníac al medi d'extracció és necessària per a obtenir resultats reproduïbles. Els extractes es purifiquen mitjançant una extracció en fase sòlida dispersiva amb C18. Les recuperacions absolutes per a l'etapa d'extracció i clean-up es situen entre 74-102%
- En el mètode LC-QqQ-MS/MS la separació es fa amb una columna Luna C18, amb fases mòbils acetonitril/aigua que contenen trimetilamina 0,01 M, i té una durada de 11 min. La ionització es fa en mode negatiu, ja que proporciona una millor sensibilitat. La detecció es fa en el mode MRM.
- El mètode és molt transversal i els resultats dels controls de qualitat externs

Conclusions

han mostrat que es pot aplicar a diferents matrius alimentàries: múscul, llet, peix, fetge.

- En el mètode LC-Q-Orbitrap-MS/MS s'utilitza una columna Kinetex C18 amb fases mòbils basades en acetonitril/aigua amb àcid fòrmic 0,1%. El temps total del cromatograma és de 13 min. La ionització en mode positiu és la que ha proporcionat una millor sensibilitat, i el mode de treball utilitzat ha estat t-SIM-dd-MS/MS, amb un error de massa <5 ppm i una resolució de 70.000 pels ions precursors i 35.000 pel ions producte. S'obté en aquestes condicions una sensibilitat superiors, amb uns CC α per als compostos no regulats unes 5 vegades inferiors als que s'obtenen amb el mètode LC-QqQ-MS/MS.

Anàlisi de nitroimidazols:

- El mètode d'extracció amb acetonitril rendeix recuperacions satisfactòries sense necessitat d'afegir etapes de clean-up, ja que no aporten millores al mètode. Les recuperacions absolutes de l'etapa d'extracció es troben en l'interval 65-101%.

- En el mètode LC-QqQ-MS/MS la separació es fa amb una columna Kinetex C18, de sílice de nucli dur, amb fases mòbils acetonitril/aigua que contenen àcid fòrmic al 0.1% i té una durada de 12 min. La ionització es fa en mode positiu, que proporciona una bona sensibilitat. La detecció es fa en el mode MRM.

- El mètode ha estat validat seguint les directrius de la Decisió 657/2002/CE en diferents matrius alimentàries d'origen animal: fetge, ronyó, retina, múscul i ha estat comprovat en la matriu ou mitjançant la participació en exercicis interlaboratori amb resultats satisfactoris: es tracta d'un mètode d'anàlisi molt transversal.

- Per tal de comprovar resultats dubtosos del treball en LC-QqQ-MS/MS, s'injecten les mostres en l'equip LC-Q-Orbitrap-MS/MS. La ionització es fa en mode positiu i el mode de treball utilitzat ha estat t-MS/MS, amb un error de massa < 5 ppm a resolució de 70.000. D'aquesta manera s'acaba arribant a una conclusió definitiva respecte els resultats del mètode LC-QqQ-MS/MS.

Anàlisi d'antiinflamatoris no esteroideus:

- L'extracció es duu a terme amb acetonitril en presència de sals i requereix l'addició d'àcid ascòrbic per evitar l'oxidació d'alguns compostos sensibles, com la fenilbutazona i l'oxifenbutazona. Els extractes es purifiquen mitjançant una extracció en fase sòlida dispersiva amb C18. Les recuperacions absolutes per a l'etapa d'extracció i clean-up es situen entre 78-97%.

- En el mètode LC-QqQ-MS/MS la separació es fa amb una columna Kinetex bifeníl, que permet millorar la resolució d'alguns pics cromatogràfics, i utilitza fases mòbils acetonitril/aigua que contenen àcid fòrmic 0,1 %, amb una durada de 12 min. La ionització es fa en modes positiu i negatiu alternativament, depenent de l'anàlit. La detecció es fa en el mode MRM. L'equip QqQ és prou ràpid com per canviar de polaritat dins del mateix cromatograma. La metodologia proposada per l'anàlisi de la llet permet assolir límits adequats als límits legiscats excepte pel cas del Diclofenac, en què per assolir els nivells regulats ha estat necessari analitzar les mostres per HRMS.

- El mètode ha estat validat seguint la Decisió 657/2002/CE en llet i ha estat comprovat en la matriu ronyó mitjançant la participació en exercicis interlaboratori amb resultats satisfactoris: es tracta d'un mètode d'anàlisi transversal.

- En el mètode LC-Q-Orbitrap-MS/MS s'utilitza una columna Kinetex C18 amb fases mòbils basades en acetonitril/aigua amb àcid fòrmic 0,1%. El temps total del cromatograma és de 15 min. La ionització ha estat, per alguns anàlits, en polaritat diferent respecte el QqQ, i el mode de treball utilitzat ha estat t-MS/MS, amb un error de massa <5 ppm i una resolució de 70.000 pels ions precursors i 35.000 pel ions producte. S'obté en aquestes condicions una sensibilitat superior, observant que alguns anàlits, com el diclofenac, poden confirmar-se en mostres al nivell regulat de 0.1 µg·kg⁻¹.

Anàlisi de toxines marines lipofíliques:

- L'extracció de les toxines marines es duu a terme amb acetonitril en presència de sals i el clean-up en fase sòlida dispersiva es realitza amb C18. La quantitat

Conclusions

de mostra analitzada ha estat adaptada a una dels principals problemes de l'anàlisi de les toxines marines lipofíliques, que és el preu i la disponibilitat dels patrons. Les recuperacions absolutes es troben en l'interval del 79 al 114%.

- La separació cromatogràfica es duu a terme amb una columna C18, tipus BEH i la fase mòbil bàsica, amb amoníac, ha estat fonamental per aconseguir pics cromatogràfics simètrics per a tots els anàlits. La ionització es duu a terme en mode positiu o negatiu, depenent dels anàlits, essent l'espectròmetre suficientment ràpid com per alternar polaritats.

- El fet de no disposar de tots els patrons que cal monitoritzar, fa especialment interessant l'ús de l'espectrometria de masses d'alta resolució amb errors de massa <5 ppm, de forma que es pot determinar l'absència o presència de toxines conegudes, tot i no disposar de tots els patrons, a més a més d'eliminar interferències isobàriques coeluent que poden aparèixer si s'utilitza QqQ.

- El mètode ha estat validat seguint la Decisió 657/2002/CE en musclos i ha estat comprovat en matrius alternatives, tant fresques com processades, mitjançant la participació en diferents exercicis interlaboratori amb resultats satisfactoris.

7. BIBLIOGRAFIA

1. FAO-OMS: "Qué es el Codex Alimentarius" 3ª edición, Roma, (2006)
<http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/>. Consultada el 15 Jul. 2016.
2. https://councilforeuropeanstudies.org/about/about-us?gclid=CNmv7LH_h9ICFUS4Gwod3VoGsw. Consultada el 27 Gen 2017.
3. Reglamento 178/2002/CE, 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 los procedimientos relativos a la seguridad alimentaria"*.
4. https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en
5. *"The use of drugs in food animals"*. Committee on Drug Use in Food Animals. Panel on Animal Health, Food Safety and Public Health. Board on Agriculture. National Research Council, Food and Nutrition Board. Institute of Medicine. NATIONAL ACADEMY PRESS Washington DC. (1999)
6. Beyene, T; Tesega, B. *"Rational veterinary drug use: its significance in public health"*. J. Vet. Med. Animal Health. 6 (12). 302-208. (2014)
7. Beyene, T. *"Veterinary drug residues in food-animal products: its risk factors and potential effects on public health"*. J. Veterinar. Sci. Technol. 7(1) 1-7 (2016)
8. Reglamento 1831/2003/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 *"sobre los aditivos en la alimentación animal"*.
9. Directiva 96/22/CE, de 29 de abril de 1996. *"por la que se prohíbe usar determinadas sustancias de uso hormonal y tireostático y sustancias Beta-agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/229/CEE"*.
10. Reglamento 2377/90/CE. De 26 de junio de 1990 *"Por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal"*.
11. Reglamento 470/2009/CE, 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) nº 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva*

- 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) nº 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo”.
12. Reglamento 124/2009/CE de 10 de febrero de 2009 “*Por el que se establece los contenidos máximos de coccidiostáticos e histomonóstatos presentes en los alimentos como resultado de la transferencia inevitable de es estas sustancias en los piensos a los que no están destinadas*”.
 13. Reglament 37/2010/CE, 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”.
 14. Reial Decret 109/1995, de 27 de enero, “sobre medicamentos veterinarios”
 15. Directiva 96/23/CE, de 29 de abril de 1996. “*Relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/CEE, 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE*”.
 16. Directiva 85/358/CEE de 16 de julio de 1985 “*Por la que se complementa la Directiva 81 /602/CEE, referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tireostático*”.
 17. Directiva 86/469/CEE de 16 de septiembre de 1986 “*Relativa a la investigación de residuos en los animales y en las carnes frescas*”.
 18. Decisión 91/664/CEE, de 11 de diciembre de 1991 “*Por la que se designan los laboratorios comunitarios de referencia para la detección de residuos de determinadas sustancias*”.
 19. Reglamento 776/2006/CE, de 23 de mayo de 2006 “*Por el que se modifica el anexo VII del Reglamento (CE) no 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los laboratorios comunitarios de referencia*”.
 20. Decisió 657/2002/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*”.
 21. Kaufmann, A; Butcher, P; Maden, K; Walker, S; Widmer, M. “*Reliability of veterinary drug residue confirmation: high resolution mass spectrometry versus tadem mass spectrometry*”. Anal. Chim. Acta, 54-67. (2015)

-
22. Vanhaecke, L; Gowik, P; Le Bizec, B; Van Gindell, L; Bichon, E; Blokland, M; De Brabander, H. *“European analytical criteria: past, present and future”* J. AOAC, 94. 360-372. (2011)
23. Jülicher, B; Gowik, P; Uhlig, S. *“Assessment of detection methods in trace analysis by means of a statistically based in-house validation method”*. Analyst, 123:173-179. (1998)
24. Decisión 2003/181/CE de la Comisión de 13 de marzo de 2003 *“por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en alimentos de origen animal”*.
25. Decisión 2004/25/CE de la Comisión de 22 de diciembre de 2003, *“por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en alimentos de origen animal”*.
26. CRLs Guidance Paper (7 December 2007). CRL’s View on the art of Analytical Methods for National residue control Plans.
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/EURL_Empfehlungen_Konzentrationsauswahl_Methodenvalidierungen_EN.pdf;jsessionid=75F6F1917236B2A4DBCF5145859A6C22.2_cid332?__blob=publicationFile&v=2. Consultada el 29 Feb 2016.
27. Reglamento 882/2004/CE, 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”*.
28. Paz, B; Riobo, P; Franco, JM; *“Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry”*. Rapid Commun. Mass Spectrom. 25, 3627-3639. (2011)
29. Zendong, Z; McCarron, P; Herrenknecht, C; Sibat, M; Amzil, Z; Cole, RB; Hess, P. *“High resolution mass spectrometry for quantitative analysis and untargeted screening of algal toxins in mussels and passive samplers”* J. Chrom. A, 1416 10-21. (2015)

30. Domenech, A; Cortés-Francisco, N; Palacios, O; Franco, JM; Riobo, P; Llerena, JJ; Vichi, S; Caixach, J. "Determination of lipophilic marine toxins in mussels. Quantification and confirmation criteria using high resolution mass spectrometry". *J. Chrom. A* 1328. 16-25. (2014)
31. Ciminiello, P; Dell'Aversano, C; Iacovo, ED; Forino, M; Tartaglione, L. "Liquid chromatography –high resolution mass spectrometry for palytoxins in mussels". *Anal. Bional. Chem.* 407: 1463-1473. (2015)
32. Rúbies, A; Muñoz, E; Gibert, D; Cortés-Francisco, N; Granados, M; Caixach, J; Centrich, F. "New method for the analysis of lipophilic marine biotoxins in fresh and canned bivalves by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry: a quick easy, cheap, efficient, rugged, safe approach". *J. Chrom. A* 1386 62-73. (2015)
33. Campbell, K; Vilariño, N; Botana, L; Elliot, C. "A european perspective on progress in moving away from the mouse bioassay for marine-toxin analysis". *Trends Anal. Chem.* 30 (2): 239-253. (2011)
34. Reglament 2074/2005/CE de 5 de diciembre de 2005. "Por el que se establecen medidas de aplicación para determinados productos con arreglo a lo dispuesto en el Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y para la organización de controles oficiales con arreglo a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) nº 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo (CE) nº882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo y se modifican los Reglamentos nº853/2004 y 854/2004".
35. Gerssen, A; Pol-Hofstad. I; Poelman, M; Mulder, P; Van del Top, H; de Boer, J. "Marine toxins: chemistry, occurrence and detection with special reference to the Dutch situation" *Toxins*, 2, 878-904. (2010)
36. Reglament 15/2011/CE, de 10 de enero de 2011. "Por el que se modifica el Reglamento (CE) nº 2074/2005 en lo relativo a los métodos de análisis de biotoxinas marinas en moluscos bivalvos vivos".
37. Alfonso, C; Alfonso, A; Otero, P; Rodriguez, P; Vieytes, M.R.; Elliot, C; Higgins, C; Botana, L.M.; "Purification of five azaspiracids from mussel samples contaminated with DSP toxins and azaspiracids". *J.Chromatogr. B.* 865, 133-140. (2008)

-
38. Rundberget, T; Sanvik, M; Larsen, K; Pizarro, G.M; Reguera, B; Castberg, T; Gustad, E; Loader, J.I; Rise, F; Wilkins, A.L; Miles, C.O; *"Extraction of microalgal toxins by large scale pumping of seawater in Spain and Norway and isolation of okadaic acid and dinophysistoxin-2"* *Toxicon*, 50, 960-970. (2007)
39. McCarron, P; Giddings, S; Reeves, K; Hess, P; Quilliam, M. *"A mussel (Mytilus edulis) tissue certified reference material for the marine biotoxins azaspiracids"*. *Anal. Bioanal. Chem.* 407: 2985-2996. (2015)
40. Reglament 853/2004/CE, de 29 de abril de 2004. *"Por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal"*.
41. Reglament 786/2013/CE, de 16 de agosto de 2013. *"Por el que se modifica el anexo III del Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los límites autorizados de yessotoxinas en moluscos bivalvos vivos"*.
42. EFSA Panel on contaminants in the food chain- The EFSA journal 1306 1-23. *Marine biotoxins in shellfish- Summary on regulated marine biotoxins scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain.* (2009)
43. Mottier, P; Huré, I; Gremaud, E; Guy, P. *"Analysis of four 5-nitroimidazoles and their corresponding hydroxylated metabolites in eggs, processed egg and chicken meat by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry"* *J. Agric. Food Chem.* 54, 2018-26. (2006)
44. Raich-Montiu, J; Krogh, K; Granados, M; Jönsson, J; Halling-Sørensen, B. *"Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fibre-supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry"* *J. Chromatogr. A.* 1187 275-280. (2008)
45. Wang, J; Leung, D. *"The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry"*. *Drug. Test Anal.* 4 103-111. (2012)
46. Makarov, A. *"Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high performance technique of mass analysis"*. *Anal. Chem.* 72 (6). 1152-1162. (2000)

47. Senyuva, H; Gökmen, V; Sarikaya, E. *"Future perspectives in Orbitrap-high resolution mass spectrometry in food analysis: a review"*. Food Add. Contam. (A), 32 (10) 1568-1606. (2015)
48. Gómez-Pérez, ML; Romero-González, R; Martínez, JL; Garrido, A; *"Analysis of veterinary drug residue and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: comparison between time of flight and orbitrap"* Food Add. Contam. A 32(10) 1637-1646. (2015)
49. Knolhoff, A; Croley, T. *"Non-targeted screening approaches for contaminants and adulterants in food using liquid chromatography hyphenated to high resolution mass spectrometry"*. J. Chromatogr. A, 1428 86-96. (2016)
50. 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"* Anal. Chim. Acta 700. 86-94. (2011)
51. Vanhaecke, L; Van Meulebroek, L; De Clercq, N; Vanden Bussche, J. *"High resolution Orbitrap mass spectrometry in comparison with tandem mass spectrometry for confirmation of anabolic steroids in meat"*. Anal. Chim. Acta 767. 118-127. (2013)
52. 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. Chrom. A 1218. 1443-1451. (2011)
53. Huang, P; Zhao, P; Dai, X; Hou, X; Zhao, L; Liang, N. *"Trace determination of antibacterial pharmaceuticals in fishes by microwave-assisted extraction and solid-phase purification combined with dispersive liquid–liquid microextraction followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry"*. J. Chrom. B 1011. 136-144. (2016)
54. Chico, J; Meca, S; Companyó, R; Prat, M.D; Granados, M. *"Restricted access materials for sample clean-up in the analysis of trace levels of tetracyclins by liquid chromatography. Application to food and environmental analysis"*. J. Chrom. A 1181. 1-8. (2008)
55. Anastassiades, M; Lehotay, S.J; Stajnbaher, D; Schenck, F.J. *"Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and*

- dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in procedure*” J. AOAC International 86, p. 412-431. (2003)
56. Martinez –Villaba, A; Vaclavick, T; 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 Commun. Mass Spectrom, 27 467-475. (2013)
57. Westland, J; Dorman, F. “QuEChERS extraction of benzodiazepines in biological matrices”. J. Pharm. Anal. 3(6) 500-517. (2013)
58. Garrido, A; Aguilera, M; Martinez, J; Romero, R. “Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry”. Anal. Chim. Acta 661.150-160. (2010)
59. Durden, D.A. “Positive and negative electrospray LC-MS-MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk”. Journal of Chromatography B, 850(1-2),134-46. (2007)
60. Kumar, P; Rúbies, A; Companyó, R; Centrich, F. “Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry” J.Sep.Sci. 35 (20). 2710-2717. (2012)
61. Kumar, P; Rúbies, A; Companyó, R; Centrich, F. “Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides” J.Sep.Sci. 35 (4). 498-504. (2012)
62. Kaufmann, A; Butcher, P; Maden, K; Walker, S; Widmer, M. “Quantification of antihelmintic drug residues in milk and muscle tissues by liquid chromatography coupled to Orbitrap and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry” Talanta 85. 991-1000. (2011)
63. Joint FAO/WHO. Codex Alimentarius Commission. 20th session on CCRVDF. San Juan Puerto Rico. May 2012.
64. Dahiya, M; Sen, S; Lamba, K; Aggarwal, M, Khandal, R.K. “Quantitative determination of ivermectin in raw milk using positive ESI LC-MS/MS”. E-Journal of Chemistry, 7(S1) 267-277. (2010)

65. Gianneti, L.; Giorgi, A.; Necci, F.; Ferretti, G.; Buiarelli, F. & Neri, B. "Validation study on avermectine residues in foodstuffs". *Anal. Chim. Acta.* 700 (1-2) 11-15. (2011)
66. Hernando, M.D.; Suárez-Barcena, J.M.; Bueno, M.J.M.; Garcia-Reyes, J.F. & Fernández-Alba, A.R.. "Fast separation liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food". *J. Chromatogr. A*, 1155 (1), 62-73. (2007)
67. Inoue, K.; Yoshimi, Y.; Hino, T. & Oka, H. (2009). "Simultaneous determination of avermectins in bovine tissues by LC-MS/MS". *J. Sep. Sci.* 32(21), 3596-3602. (2009)
68. Turnipseed, S; Roybal, J; Andersen, W; Kuck, L. "Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/ atmospheric pressure photoionization source" *Anal. Chim. Acta.* 529. 159-165. (2005)
69. Cronly, M; Behan, P; Foley, B; Malone, E; Martin, S; Doyle, M; Regan, L. "Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS)" *Food Add. Contam.A* 27:9, 1233-46. (2010)
70. Cronly, M; Behan, P; Foley, B; Malone, E; Regan, L. "Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry" *J. Chromatogr. A* 1246, 8101-09. (2009)
71. Tölgyesi, A; Sharma, V; Fekete, Sz; Fekete, J; Simon, A; Farkas, Sz. "Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast chromatography-tandem mass spectrometry" *J. Pharm. Biom. Anal.* 64-65, 40-48. (2012)
72. Xia, X; Li, X; Zhang, S; Ding, S; Jiang, H; Li, J; Shen, J. "Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A* 1208 101-108. (2008)
73. Mohamed, R; Mottier, P; Treguier, L; Richoz-Payot, J; Yilmaz, E; Tabet, JC; Guy, P. "Use of molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the

- determination of four 5-nitroimidazoles and three of their metabolites from egg-based samples before tandem LC-ESI-MS/MS analysis” J. Agric. Food Chem. 56. 3500-08. (2008)
74. Mitrowska, K; Posyniak, A; Zmudzki, J. “Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid-chromatography-mass spectrometry”. Talanta 81 1273-1280. (2010)
75. Malone EM; Dowling G; Elliot CT; Kennedy DG; Regan L. “Development of a rapid, multiclass method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry”. J Chromatogr A.; 1216:8132-8140. (2009)
76. Jedziniak, P; Szprengier-Juszkiewicz, T; Pietruk, K; Sledzinska, E; Zmudzki, J. “Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”. Anal Bioanal Chem.; 403: 2955-2963. (2012)
77. Igualada, C, Moragues, F; Pitarch, J. “Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector”. Anal. Chim. Acta 586. 432-439. (2007)
78. Gentili, A; Caretti, F; Bellante, S; Mainero Rocca, L; Curini, R; Venditti A. “Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue”. Anal Bioanal Chem.; 404: 1375-1388. (2012)
79. Díaz Carrasco, M.S; Espuny, A; Escudero, E; Cárceles, C.M. “Farmacología de los endectocidas: aplicaciones terapéuticas (II)”. An. Vet. 16: 15-40. (2000)
80. Rübesam, G; Barreto, F; Hoff, R; Pizzolato, T. “Determination of avermectin and milbemycin residues in bovine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and fluorescence detection using solvent extraction and low temperature clean-up”. Food Control 29. 55-60. (2013)

81. Ozdemir, N; Kahraman, T. "Rapid confirmatory analysis of avermectin residues in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry". *J. Food Drug Anal.* 24. 90-94. (2016)
82. Thompson, C.C; Traynor, I. M; Fodey, T.L.; Crooks, S:H. "Improved screening method for the detection of a range of nitroimidazoles in various matrices by optical biosensor" *Anal. Chim. Acta*, 637 (1-2), 259-264. (2009)
83. Zeleny, R; Harbeck, S; Schimmel, H. "Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of 5-nitroimidazole drugs and their corresponding hydroxy metabolites in lyophilised pork meat". *J. Chrom. A* 1216. 249-56. (2009)
84. Huang, X.; Lin, J.; Yuan, D. "Simple and sensitive determination of nitroimidazole residues in honey using stir bar sorptive extraction with mixed mode monolith followed by liquid chromatography". *J. Sep. Sci.* 34, 2138-2144. (2011)
85. Tamosiunas, V; Padarauskas, A. "Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of 5-nitroimidazoles and their metabolites in egg". *Centr. Eur. J. Chem* 7 (3), 267-273. (2009)
86. Moragues, F. "Desarrollo y validación de métodos analíticos de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas para la determinación de residuos de medicamentos de uso veterinario en diversas matrices biológicas", Tesis doctoral. Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud de la Universidad CEU Cardenal Herrera. València. (2008)
87. Hu, T; Li, X-J; Chen, D-D; Dai, H-H; Deng, X-J; Yue, Z-F; Wang, G-M; Shen, J-Z; Xia, X; Ding, S-Y; Zhou, Y-N; Zhu, A-L; Jiang, H-Y. "Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry". *J. Chromatogr. A.* 104-113. (2012)
88. Gallo, P; Fabroccino, S; Vinci, F; Fiori, M; Danese, V; Serpe, L. "Confirmatory identification of sixteen non-steroidal anti-inflammatory drug residues in raw milk by liquid chromatography coupled with ion trap mass spectrometry". *Rapid Commun Mass Spectrom.*; 22: 841-854. (2008)

89. Peng, T; Zhu, AL; Zhou, YN; Hu, T; Yue, ZF; Chen, DD; Wang, GM; Kang, J; Fan, CL; Chen, Y; Jiang HY. *“Development of a simple method for simultaneous determination of nine subclasses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry”*. J Chromatogr B.; 933:15-23. (2013)
90. Moragues F; Igualada C; León N. *“Qualitative confirmatory method for determination of Phenylbutazone and 11 prohibited NSAIDs in animal tissue and milk by UPLC-MS/MS”*. Recent Advances in Food Analysis Congress, Prague. (2013)
91. Jedziniak, P; Szprengier-Juszkiewicz, T; Olejnik, M; Zumdzki, J. *“Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”*. Anal Chim. Acta. 672: 85-92. (2010)
92. Dowling, G; Gallo, P; Fabbrocino, S; Serpe, L; Regan, L. *“Determination of ibuprofen, ketoprofen, diclofenac and phenylbutazone in bovine milk by gas chromatography-tandem mass spectrometry”*. Food Add. Contam. 25 (12) 1497-1508. (2008)
93. Nemoto, T; Lee, X; Kumazawa, T; Hasegawa, C; Fujishiro, M; Marumo, A; Shouji, Y; Inagaki, K, Sato, K. *“High-throughput determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by HILIC-MS/MS”*. J. Pharm. Biom. Anal. 88. 71-80. (2014)
94. Vinci, F; Fabroccino, S; Fiori, M; Serpe, L; Gallo, P. *“Determination of fourteen non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal serum and plasma by liquid chromatography/mass spectrometry”*. Rapid Comm. Mass. Spec. 3412-3420. (2006)
95. Van Pamel E, Daeseleire E. *“A multiresidue liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the detection and quantitation of 15 non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in bovine meat and milk”*. Anal. Bioanal. Chem.; 407:4485-4494. (2015)

96. Thompson, T; Noot, D; Kendall, J. “*Surveillance study of novobiocina and phenylbutazone residues in raw bovine milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”. Food Add. Contam. 8. 1104-1111. (2010)
97. Dubreil-Chéneau, E; Pirotais, Y; Bessiral, M; Roudaut, B; Verdon, E. “*Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”. J Chromatogr. A. 6292-6301. (2011)
98. Geis-Asteggiate, L; Nuñez, A; Lehotay, S; Lightfield, A. “*Structural characterization of product ions by electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry to support regulatory analysis of veterinary drug residues in foods*”. Rapid Commun. Mass Spectrom. 28, 1061–1081. (2014)
99. Becerra-Herrera, M; Honda, L; Richter, P. “*Ultra-high-performance liquid chromatography—Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater*”. J.Chromatogr. A, 1423. 96–103. (2015)
100. “UNE-EN/ISO/IEC/17025:2005. “*Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*”.
101. Laboratorios de Ensayo: *Accreditación para Categorías de Ensayo NT-18 Rev. 1*. ENAC, Entidad Nacional de Acreditación. Junio de 2004.
102. “EU-harmonised Standard Operating Procedure for determination of lipophilic marine biotoxins in molluscs by LC-MS/MS”. European Union Reference Laboratory for marine biotoxins. V.5. (2015)
http://www.aesan.msssi.gob.es/en/CRLMB/web/procedimientos_crlmb/crlmb_standard_operating_procedures.shtml. Consultat el 28 Jul. 2016.
103. Stewart, I; McLeod, C. “*The laboratory mouse in routine food safety testing for marine algal biotoxins and harmful algal bloom toxin research: past present and future*”. J. AOAC Intl., 97, 356-372. (2014)
104. Estudio FAO: Biotoxinas marinas, alimentación y nutrición. Roma (2005).
www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm. Consultada el 07 Jul. 2016.
105. EFSA “*Marine biotoxins- Yessotoxin group. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain*”. EFSA Journal, 907, 1-62. (2008)
106. EFSA. 1-52 “*Marine biotoxins- Azaspiracid group. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain*”. EFSA Journal 723, 1-52. (2008)

-
107. EFSA. "Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish- Cyclic imines (spirolides, gymnodimidines, pinnatoxines i pteriatoxines)". EFSA panel on contaminants in the food chain. EFSA Journal; 8(6): 1628. (2010)
108. Nicolaou, K.C; Chen, D; Li, Y; Qian, W; Ling, T; Vyskocil, S; Koftis, T; Govindasamy, M; Uesaka, N. "*Total Synthesis of the Proposed Azaspiracid-1 Structure, Part 2: Coupling of the C1–C20, C21–C27, and C28–C40 Fragments and Completion of the Synthesis*" Angew. Chem. 42. 3649-3653. (2003)
109. Nicolaou, K.C; Li, Y; Uesaka, N; Koftis, T; Vyskocil, S; Ling, T; Govindasamy, M; Qian, W; Bernal, F; Chen, D. "*Total Synthesis of the Proposed Azaspiracid-1 Structure, Part 1: Construction of the Enantiomerically Pure C1–C20, C21–C27, and C28–C40 Fragments*" Angew. Chem. 42. 3643-3648. (2003)
110. Botana, L.M; Alfonso, A. "*Phycotoxins: chemistry and biochemistry*". 2nd Edition. Wiley-Blackwell. (2015)
111. Turner, A; Higgins, C; Davidson, K; Veszelovvski, A; Pyne, D; Hungerford, J; Higman, W. "*Potential threats posed by new or emerging marine biotoxins in UK waters and examination of detection methodology used in their control: Brevetoxins*". Mar. Drugs, 13, 1224-1254. (2015)
112. Poli, M.A; "*Detection of brevetoxins in the twenty-first century*" Chapter in "*Seafood and freshwater Toxins: pharmacology, physiology and detection*" 2nd edition. Ed: Luis M. Botana.
113. AOAC official method 2011.27. *Paralytic shellfish toxins (PSTs) in shellfish. Receptor binding assay. First action 2011*. AOAC International. Gaithersburg. MD. USA. (2011)
114. DeGrasse, S; Rivera, V; Roach, J; White, K; Callahan, J; Couture, D; Simone, K; Peredy, T; Poli, M; "*Paralytic shellfish toxins in clinical matrices: extension of AOAC official method 2005.06 to human urine and serum and application to a 2007 case study in Maine*". Deep-Sea Res. II103:368-375. (2014)
115. Nicolas, J; Hendriksen, P; Gerssen, A; Bovee, T; Rietjens, I. "*Marine biotoxins: state of the art, bottlenecks, and perspectives for mode of action*"

- based methods of detection in seafood” Mol. Nutr. Food Res. 58. 87-100. (2014)*
116. Blanco, J; Arévalo, F; Correa, J; Corina, M; G. Cabado, A; M. Vieites, J; Moroño, A. “*Effect of the industrial steaming on the toxicity, estimated by LC-MS/MS, of mussels exposed for a long time to diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins*”. Food Chem. 177. 240-247. (2015)
117. Gerssen, A; McElhinney, M.A; Mulder, P; Bire, R; Hess, P; de Boer, J. “*Solid-phase extraction for removal of matrix effects in lipophilic marine toxin analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*” Anal. Bioanal. Chem. 394; 1213-1226. (2009)
118. Fang, L; Yao, X; Wang, L; LI, J. “*Solid-phase extraction-based ultra sensitive detection of four lipophilic marine biotoxins in bivalves by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*”. J. Chromatogr. Sci. 53, 373-379. (2015)
119. Gerssen, A; Mulder, P; McElhinney, M; de Boer, J. “*Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the detection of marine lipophilic toxins under alkaline conditions*”. J.Chromatogr. A. 1216 1421-1430. (2009)
120. Kilcoyne, J; Fux, E; “*Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish*” J. Chrom. A 1217: 7123-7130. (2010)
121. Gerssen, A; Mulder, P; van Rhijn, H; de Boer, J; “*Mass spectrometric analysis of the marine lipophilic biotoxins pectenotoxin-2 and okadaic acid by four different types of mass spectrometers*” J. Mass Spectrom. 43: 1140-1174. (2008)
122. Zendong, Z, Bertrand, S; Herrenknecht, C; Abadie, E; Jauzein, C; Lemée, R; Gouriou, J; Amzil, Z; Hess, P. “*Passive sampling and high resolution mass spectrometry for chemical profiling of french coastal areas with focus on marine biotoxin*”. Environm. Sci. Technol. 50: 8522-8528. (2016)

123. Kameneva, P.A; Imbs, A.B; Orlova, T.Yu. *“Distribution of DTX-3 in edible and non edible parts of Crenomytilus grayanus from the sea of Japan”*. Toxicon, 98. 1-3. (2015)
124. AOAC official method 937.07. *“Fish and Marine Products. Treatment and preparation of sample procedure”*. First action 1937. Final action 1996. Revised 1997. AOAC International.
125. Gerssen, A. *“The analysis of lipophilic marine toxins: development of an alternative method”* Tesis Doctoral. Wageningen University, (2010)
126. Stonik, V.A; Stonik, I.V. *“Studies on marine toxins: chemical and biological aspects”*. Russ Chem. Rev. 79 (5) 397-419. (2010)