



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

# **Determinación de antibióticos y otros productos veterinarios en productos lácteos de marca blanca**

**Alumna: Delia Castilla Fernández**

**Junio, 2017**



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**



*Facultad de Ciencias Experimentales*

**Grado en Química**

Trabajo Fin de Grado

# **Determinación de antibióticos y otros productos veterinarios en productos lácteos de marca blanca**

**Delia Castilla Fernández**

Junio, 2017

## ÍNDICE

	<b>Pág.</b>
<b>1. RESUMEN</b>	3
<b>2. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>2.1. Justificación</b>	4
<b>2.2. Seguridad Alimentaria y Legislación</b>	6
<b>2.3. Definición y Familias de Medicamentos de Uso Veterinario</b>	9
<b>2.4. Antecedentes</b>	12
2.4.1. <i>Tratamiento de Muestra</i>	14
2.4.2. <i>Técnicas Cromatográficas</i>	19
<b>2.5. Objetivos</b>	23
<b>3. EXPERIMENTAL</b>	23
<b>3.1. Materiales y Reactivos</b>	23
<b>3.2. Tratamiento de Muestra</b>	24
3.2.1. <i>Extracción en Fase Sólida (Oasis HLB PRiME)</i>	25
3.2.2. <i>Extracción QuEChERS (EMR-Lipid)</i>	26
<b>3.3. Instrumentación</b>	28
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	30
<b>4.1. Optimización del Método Cromatográfico</b>	30
<b>4.2. Evaluación del Tratamiento de Muestra</b>	34
<b>4.3. Validación del Método</b>	39
<b>4.4. Estudio de Muestras Reales</b>	41
<b>5. CONCLUSIONES</b>	43
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	45
<b>7. ANEXOS</b>	48
<b>7.1. Abreviaturas</b>	48

## 1. RESUMEN

En la actualidad, el análisis de trazas está presentando un gran auge y una de sus principales aplicaciones es la detección de medicamentos de uso veterinario en alimentos. Este trabajo trata no solo de identificar estos compuestos, si no que los cuantifica para comprobar si se están cumpliendo los límites permitidos en leche, muestra elegida para el estudio. Se seleccionaron 25 compuestos ampliamente empleados en prácticas veterinarias. Su determinación fue llevada a cabo mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Elevada Eficacia acoplada a un Espectrómetro de Masas en Tándem (UHPLC-MS/MS) con analizador de Triple Cuadropolo (QqQ) equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo positivo. Estos compuestos fueron caracterizados a través de la masa del ión precursor ( $[M+H]^+$ ), masas de sus dos fragmentos mayoritarios y su tiempo de retención. Además, se han evaluado dos tratamientos de muestra comerciales e innovadores: Extracción en Fase Sólida con cartuchos Oasis HLB PRiME y extracción QuEChERS con la utilización de EMR-Lipid como sorbente. Finalmente, se han analizado 24 muestras de leche de diferentes marcas comerciales, obtenidas en supermercados locales, para comprobar la presencia de estos compuestos.

## ABSTRACT

Nowadays, trace analysis is becoming very popular, one of its principal applications is the detection of veterinary drugs in food. This work tries to quantify this compounds and not only its identification, to assure consumers that the legal limits are being respected. In this study, 25 compounds were analyzed by Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry in Tandem (UHPLC-MS/MS) with Triple Quadrupole analyzer (QqQ) equipped with an electrospray interface (ESI) operating in positive ion mode. These compounds were characterized by its precursor ion mass ( $[M+H]^+$ ), mass of their two main fragments and retention time. Furthermore, two commercial and innovative techniques of sample preparation have been evaluated, in one hand Solid Phase Extraction with Oasis HLB PRiME Cartridges and, in the other hand, QuEChERS extraction with the new sorbent EMR-Lipid. In order to check the presence of veterinary drugs in real samples several commercial milks, obtained from local supermarkets, have been analyzed.

## **2. INTRODUCCIÓN**

“Somos lo que comemos”, reza la sabiduría popular. O dicho de forma más erudita por el filósofo Ludwig Feuerbach en su libro “Enseñanza de la alimentación”: “El hombre es lo que come”.

Es bien sabido que la alimentación nos proporciona los nutrientes y compuestos necesarios para la vida que los seres humanos no somos capaces de obtener de otra forma, si no es por ella. Aunque una persona no puede evitar la predisposición genética a ciertas enfermedades, la dieta puede ser un factor a tener en cuenta en su prevención y en el mantenimiento de un cuerpo sano. Pero, en contraposición a estas ya conocidas ventajas sobre la alimentación, se ha de alertar sobre la problemática de la ingesta inconsciente de sustancias perjudiciales para la salud. Puede darse el caso de que, en lugar de tener un poder preventivo, la alimentación puede aumentar el riesgo de sufrir algunas enfermedades. En un mundo en el que el consumo de alimentos es cada vez mayor, el cuidado de la alimentación se vuelve especialmente importante. Por lo que la sociedad debe hacer hincapié en la calidad de los productos que llegan al consumidor y en que éstos no contengan sustancias que puedan perjudicar su salud. En esto último, se centra este estudio que pretende averiguar los residuos de medicamentos veterinarios que pueden llegar a nuestro cuerpo mediante la ingesta de leche.

### **2.1. Justificación**

El aumento de la producción ganadera desde la Revolución Industrial hasta nuestros días es un gran cambio producido en la Humanidad, sobre todo, en los países desarrollados. Esto tiene una innegable parte positiva, debido a que los productos de origen animal están al alcance de mayor número de personas, con los beneficios que estos conllevan, como la mayor ingesta de proteínas y vitaminas como la B12. Por tanto, en los países en los que la explotación ganadera es mayor, los gobiernos deben adoptar una serie de medidas en las que se asegure la calidad de los productos que llegan a los ciudadanos. Sobre todo, la protección ante compuestos que se encuentren en los alimentos y que puedan causar algún efecto perjudicial en la salud humana. En todo momento, debe asegurarse que cualquier producto de origen animal se

encuentre libre de: residuos que superen el límite máximo de concentración permitido de medicamentos veterinarios y de sustancias cuyo uso esté prohibido.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) asegura que: “Están apareciendo nuevos mecanismos de resistencia que se propagan a nivel mundial y ponen en peligro nuestra capacidad para tratar enfermedades infecciosas comunes, con el consiguiente aumento de la discapacidad y las muertes, y la prolongación de la enfermedad”. La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo. La RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo). Esta resistencia aparece con el tiempo de forma natural y es debida a modificaciones genéticas. (OMS, Centro de Prensa, 2016). El problema actual reside en que este proceso natural se está viendo acelerado por el mal uso de los antimicrobianos, tanto en el tratamiento de personas como de animales, que además frecuentemente se realiza sin la supervisión profesional. Como consecuencia, los medicamentos se están volviendo ineficaces (OMS, Centro de Prensa, 2017) y cada vez se están produciendo más casos de resistencia a enfermedades y virus, lo que conlleva unas enfermedades más largas, aumentando también el costo de la atención sanitaria por la mayor duración de las hospitalizaciones y la necesidad de una atención más intensiva (OMS, Centro de Prensa, 2016).

La adición de medicamentos al agua o a la alimentación de los animales en las granjas donde se crían es de vital importancia en la viabilidad de la producción ganadera, ya que combate la propagación de enfermedades entre los animales. Pero esta administración a animales destinados a la producción de alimentos puede dejar residuos en los productos que llegan a los consumidores. Muchos de estos compuestos se usan en el tratamiento de enfermedades en seres humanos, mientras que otros se utilizan para potenciar el crecimiento de los animales. Aunque esta última práctica fue prohibida por la Unión Europea en 2006 (Reglamento (CE) N° 1831/2003 del Consejo, 2003). Cabe destacar que, si no se respeta el tiempo necesario para su excreción, estos compuestos o sus metabolitos se están introduciendo en la cadena alimentaria; lo que puede aumentar el riesgo de los humanos a crear resistencia a medicamentos o a que se desarrollen reacciones alérgicas en individuos hipersensibles, además de que algunos de ellos pueden tener posibles efectos tóxicos o carcinogénicos.

La leche líquida es el producto lácteo más consumido en todo el mundo en desarrollo, su consumo per cápita en Europa y América del norte supera los 150 Kg al año (OMS, Portal Lácteo, 2017). Su ingesta está especialmente recomendada en los niños en edad de crecimiento y en mujeres a partir de la cincuentena. El bajo precio de los lácteos de marca blanca respecto a los demás puede hacer pensar que, para la obtención de estos productos, la dosis de medicamentos que se les suministra a los animales es mayor; debido a que se intenta que haya el mayor volumen de animales en un espacio limitado. Todo esto con el fin de reducir los costes de producción y ofrecer un producto que capte la atención del consumidor. Por tanto, el objetivo de este trabajo será comprobar si el menor precio de productos lácteos de marca blanca se ve reflejado en un aumento de los residuos veterinarios presentes en ellos.

## **2.2. Seguridad Alimentaria y Legislación**

La Seguridad Alimentaria se ha convertido en un aspecto que cada vez preocupa más a la sociedad. Organizaciones internacionales, como la OMS, tratan de concienciar a la sociedad de la importancia de los alimentos que tomamos y de que éstos sean inocuos, es decir, que estén libres de compuestos químicos, microbiológicos u otros compuestos que entrañen algún riesgo para la salud.

A nivel europeo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) se encarga de la evaluación científica, objetiva e independiente de los riesgos relacionados con los alimentos. Su colaboración con los gobiernos resulta muy importante, ya que su asesoramiento es la base para la legislación. También, se encarga de recopilar de datos y conocimientos científicos para su posterior divulgación. Es competente en aspectos tan variados como salud, bienestar y protección animal y vegetal, seguridad en alimentos y piensos, envasado, nutrición, pesticidas y fitosanitarios, entre otros.

A nivel estatal, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) es la que se encarga de estos aspectos con la creación de Planes Nacionales específicos de Control Oficial o con una Red de Alerta Alimentaria, entre otras funciones.

El control de los residuos veterinarios en los alimentos de origen animal que llegan al consumidor no es una preocupación nueva de estas organizaciones. Sino que desde hace varias décadas viene regulándose en la Unión Europea.

La identificación de las sustancias que pueden o no utilizarse, la concentración límite de residuo que puede tener el alimento en algunas de ellas o los métodos analíticos para su detección son los aspectos en los que se han centrado los reglamentos comunitarios, con el objetivo de proteger la salud a los ciudadanos frente a estos compuestos.

El primero surgió en la década de los noventa, el Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo fijaba los Límites Máximos de Residuos (MRL) de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, como carne, pescado, huevos, leche y miel. En este, se define el Límite Máximo de Residuo, que es el contenido máximo de residuos de un medicamento veterinario, expresado en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sobre el peso del producto en fresco, reconocido como admisible en un producto alimenticio dentro de la Comunidad.

Los anexos incluidos en este reglamento enumeraban las sustancias conforme a su límite establecido, su función y la familia de medicamentos a la que pertenece; son los siguientes:

- Anexo I: Sustancias para las que se ha establecido un MRL.
- Anexo II: Sustancias que no están sujetas a ningún valor de MRL, es decir, son sustancias que está permitido su uso sin restricción, ya que no suponen un peligro para la salud humana.
- Anexo III: Sustancias para las que se ha establecido un MRL provisional.
- Anexo IV: Sustancias para las que no puede establecerse ningún MRL, ya que son sustancias prohibidas.

Cabe destacar que, en este reglamento no se encuentran reguladas las sustancias que causan un efecto hormonal y tireostático o sustancias con efecto anabolizante, como las  $\beta$ -agonistas. Posteriormente, en la Directiva 96/23/CE del Consejo se prohibieron éstas sustancias. También, clasifica en dos grupos, los principios farmacológicos que se deben vigilar:

- Grupo A: Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas, en la Tabla 1.
- Grupo B: Medicamentos veterinarios y contaminantes, en la Tabla 2.



**Tabla 1.** Sustancias contenidas en el Grupo A de la Directiva 96/23/CE del Consejo.

Grupo A: Sustancias con efectos anabolizantes y no autorizadas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estilbenos (sus derivados, sus sales y ésteres).</li> <li>• Agentes anti-tiroideos.</li> <li>• Esteroides.</li> <li>• Lactonas de ácido resorcílico (incluyendo Zeranol).</li> <li>• <math>\beta</math>-agonistas.</li> <li>• Compuestos incluidos en el Anexo IV del Reglamento (CEE) nº 2377/90</li> </ul>

**Tabla 2.** Sustancias contenidas en el Grupo B de la Directiva 96/23/CE del Consejo.

Grupo B: Drogas veterinarias y contaminantes
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustancias antibacterianas (incluidas sulfamidas y quinolonas).</li> <li>• Otras drogas veterinarias: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Antihelmínticos.</li> <li>- Anticoccidiostáticos (incluyendo nitroimidazoles).</li> <li>- Carbamatos y piretroides.</li> <li>- Tranquilizantes.</li> <li>- Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).</li> <li>- Otras sustancias farmacológicamente activas.</li> </ul> </li> <li>• Otras sustancias y contaminantes medioambientales: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Compuestos organoclorados (incluidos los PCBs).</li> <li>- Compuestos organofosforados.</li> <li>- Elementos químicos</li> <li>- Micotoxinas</li> <li>- Colorantes.</li> <li>- Otros.</li> </ul> </li> </ul>

Con motivo de simplificar la clasificación de las sustancias farmacológicamente activas que se usan como medicamentos veterinarios, el Reglamento (UE) Nº 37/2010 de la Comisión clasifica las sustancias en dos grupos: sustancias autorizadas y sustancias prohibidas. Este reglamento es el que está vigente en la actualidad y deroga el Reglamento (CEE) Nº 2377/90, ordenando los compuestos atendiendo solamente a un orden alfabético. Dentro de las sustancias autorizadas, se enumeran las sustancias en las que no es necesario restringir su uso y las que tienen establecido un MRL para cada matriz.

También, ha sido necesario redactar guías técnicas para el funcionamiento de métodos analíticos e interpretación de resultados que se adapten a los últimos avances en el campo de la Química Analítica. La Decisión de la Comisión 2002/657/EC es la que garantiza la comparabilidad de los resultados en los laboratorios autorizados para el control de residuos veterinarios, estableciendo pautas para la validación de los métodos de identificación y confirmación. En este documento se determina que el método más adecuado para la confirmación de estas sustancias, ya pertenezcan al grupo A o al grupo B, es la cromatografía de líquidos o la

cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. También introduce el concepto de Puntos de Identificación (IP) para la confirmación de la identidad de una sustancia. Éstos se basan en los iones obtenidos en el espectro de masas y dependen de la resolución del detector utilizado. De la misma forma, establece las tolerancias permitidas para las intensidades de los iones detectados, pero no indica criterios en lo que a exactitud de masa se refiere. Para la confirmación de las sustancias del grupo A y B se requiere un mínimo de 4 y 3 IPs respectivamente, y los criterios son los siguientes:

- 2.0 IPs se ganan por cada ion precursor.
- 2,5 IPs para cada ion producto.

Por último, este reglamento establece que deben fijarse Límites Mínimos de Funcionamiento Exigidos (MRPL) para las sustancias prohibidas o que no se haya establecido un límite permitido. Esto es, el contenido mínimo de una sustancia que debe ser detectado y confirmado. En teoría debe ser cero para las sustancias prohibidas, pero como ese nivel no puede llegar a ser medido se establece el MRPL. Como consecuencia, en la Decisión de la Comisión (2003/181/CE), se fija el MRPL para varios compuestos, entre los que se encuentra cloranfenicol en leche, cuyo MRPL es 0,3 µg/Kg.

### **2.3. Definición y Familias de Medicamentos de Uso Veterinario**

Los residuos de medicamentos veterinarios se definen como “todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiere administrado el medicamento veterinario de que se trate” (Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo, 1990).

En este trabajo, al tratarse de un análisis multiresiduo, se ha intentado contar con la mayor variedad de familias de compuestos. Están incluidos colorantes, corticoides, tireostáticos, compuestos organoclorados y sustancias con efectos anabolizantes, entre otros. Aun así, las categorías que cuentan con un mayor número de compuestos en este trabajo son (Seija, V. & Vignoli, R., 2006; Márquez-Lara, D. 2007; Valsecia, M. E. & Malgor, L. A. 2000):

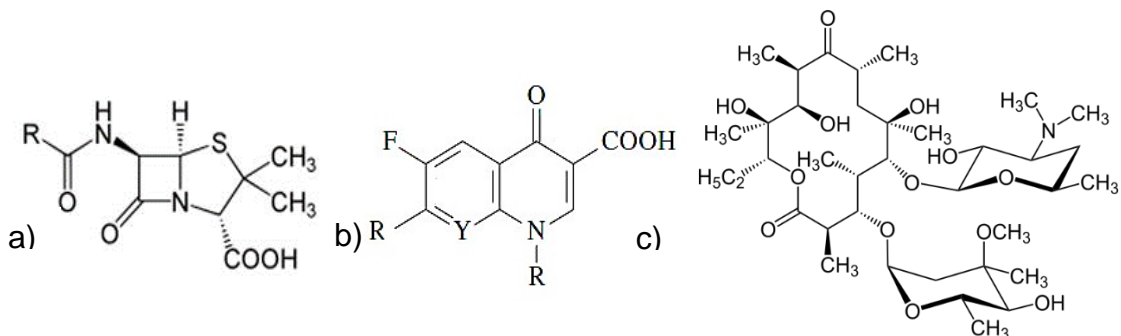
- **Antibióticos.**

Son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos o compuestos sintéticos que suprimen el crecimiento de otros microorganismos (acción bacteriostática), u originan su destrucción (acción bactericida); en otras palabras, son medicamentos que combaten las infecciones bacterianas. Dentro de esta categoría, y atendiendo a su naturaleza química, se encuentran tres familias de antibióticos incluidos en este trabajo: penicilinas, quinolonas y macrólidos.

Las penicilinas son compuestos  $\beta$ -lactámicos que tienen una estructura básica (Figura 1) derivada del ácido 6-aminopenicilánico y difieren unas de otras, según la sustitución en la cadena lateral de su grupo amino.

Las quinolonas son compuestos caracterizados por una estructura bicíclica con un radical de ácido carboxílico en la posición 3. Las quinolonas se clasifican en generaciones. Debido a su extendido uso, en la actualidad hay evidencia de que se ha producido una resistencia a esta primera generación de quinolonas. Lo que está obligando a la utilización de quinolonas de segunda generación o fluoroquinolonas, caracterizadas por poseer un radical fluoruro en la posición 6 (Figura 1).

Por último, los macrólidos se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona con 14, 15 ó 16 miembros a los que están unidos amino y desoxiazúcares. El prototipo de este grupo es la Eritromicina A (Figura 1).

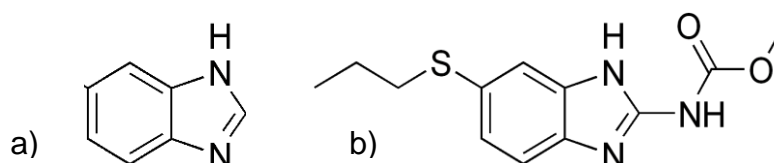


**Figura 1.** a) Estructura básica de las penicilinas. b) Estructura básica de las fluoroquinolonas. c) Estructura de la Eritromicina.

- **Antihelmínticos.**

Son agentes antiparasitarios de gran importancia en la actualidad en el tratamiento de nematodos en los rumiantes. Aunque existen varias familias dentro de los antihelmínticos, los que se han estudiado en este trabajo pertenecen al grupo de los benzimidazoles, excepto el levamisol que pertenece a la familia de los imidazotiazoles.

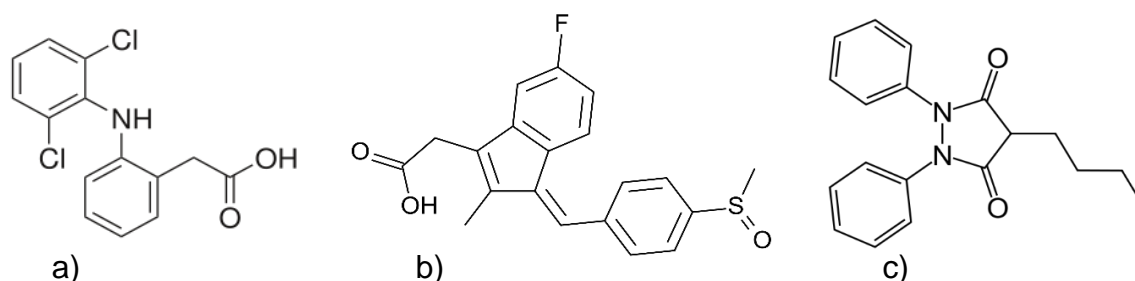
Los benzimidazoles son los antihelmínticos más utilizados en el control de parásitos gastrointestinales y se encargan de inhibir la polimerización de la tubulina, como consecuencia, perturba el proceso digestivo de los gusanos que acaban muriendo. En cuanto a su estructura química, son hidrocarburos aromáticos y heterocíclicos, constituidos por un benceno y un imidazol (Figura 2). Los benzimidazoles se diferencian mediante las modificaciones en las posiciones 2 y 5, como se puede observar en la figura 2 con el compuesto Albendazol.



**Figura 2.** a) Estructura básica de los benzimidazoles. b) Estructura del Albendazol.

- **Antiinflamatorios no esteroideos (AINE).**

Éstos compuestos se caracterizan por sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, es decir, reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre, respectivamente. Los antiinflamatorios no esteroideos constituyen un grupo de fármacos variado y químicamente heterogéneo. Se encargan de inhibir la acción de la ciclooxigenasa que es la enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Destacan en poseer menor número de efectos secundarios que otros antiinflamatorios, como los corticoides, ya que no contienen esteroides en su composición. Los antiinflamatorios no esteroideos pueden ser ácidos, como el Diclofenaco y el Sulindac, o no ácidos, como la Fenilbutazona, todos ellos incluidos en el trabajo (Figura 3).



**Figura 3.** Antiinflamatorios no esteroideos. Ácidos: a) Diclofenaco; b) Sulindac. No ácidos: c) Fenilbutazona.

## 2.4. Antecedentes

Hay que tener en cuenta que el análisis de residuos de medicamentos en matrices alimentarias es un análisis a nivel de trazas, ya que estos compuestos no pueden estar en grandes cantidades en los alimentos, es más, están regulados a niveles de  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ . Este tipo de análisis está presentando un gran auge en la actualidad gracias al avance de las técnicas analíticas que están permitiendo la identificación y cuantificación cada vez a niveles más bajos. La IUPAC considera traza cualquier concentración que se encuentre por debajo de 100 partes por millón en la muestra. Debido a que se manejan concentraciones tan pequeñas, los principales problemas del análisis de trazas son:

- Pérdidas del analito en el proceso analítico.
- Contaminación de la muestra.
- Poca representatividad de la muestra tomada.
- Mayor número de interferencias debido a la elevada relación matriz/analito.
- Necesidad de técnicas muy sensibles.

Por esto, es necesario extremar las precauciones en este tipo de análisis durante todo el proceso analítico, ya que cualquier alteración tiene un efecto mucho mayor en el resultado final al trabajar con concentraciones tan bajas.

Previamente a la realización de este trabajo, se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica para conocer cuáles son los tratamientos de muestra y las técnicas cromatográficas más utilizadas, desde sus inicios hasta la actualidad, en la detección de residuos de medicamentos de uso veterinario. El análisis de drogas veterinarias en alimentos ha ido evolucionando a lo largo de los años. Al principio los métodos analíticos se centraban solo en una o varias familias de compuestos y con propiedades químicas similares. Sin embargo, recientemente los métodos se están centrando en análisis multiresiduo, tratando de determinar en un mismo análisis el mayor número de compuestos pertenecientes a familias muy diferentes químicamente. La Tabla 3 recoge, a modo de resumen, los métodos más importantes utilizados en la actualidad para el análisis multiresiduo en muestras de leche.

Tabla 3. Principales métodos de análisis multiresiduo en muestras de leche.

Número de Analitos	Extracción	Purificación	Sistema de Detección	Tiempo de análisis	Referencia
101	LLE (MeCN)	<b>SPE:</b> StrataX column	<b>UHPLC-TOF-MS</b> Columna BEH C <sub>18</sub> . Fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,001% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN (0,001% Ác. Fórmico)	8,5 min	Stolker, A. A. M. et al., 2008
150	LLE (1% Ác. Fórmico en MeCN)	<b>Ultrafiltración:</b> Microcon cut-off membrane 3kD	<b>UHPLC-TOF-MS</b> Columna BEH C <sub>18</sub> . Fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN (0,1% Ác. Fórmico)	9 min	Ortelli, D. et al., 2009
25	LLE (MeCN)	<b>SPE:</b> Oasis HLB. <b>Evaporación</b> del dvte. <b>Ultrafiltración:</b> Microcon YM-30 centrifugal filter	<b>HPLC-MS/MS (QqQ)</b> Columna YMC-AC reversed phase. Fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN	21 min	Turnipseed, S. B. et al., 2008
90	<b>QuEChERS:</b> MeCN (1% Ác. Acético) + NaCl + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>d-SPE (QuEChERS):</b> Sorbente C <sub>18</sub> <b>Evaporación</b> del dvte. <b>Disolución</b> en 25% de MeCN en agua. <b>Filtración:</b> 0,22 µm PTFE filter	<b>UHPLC-TOF-MS</b> Columna Acquity UHPLC BEH C <sub>18</sub> Fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN	26,1 min	Zhang, Y et al., 2015
21	<b>QuEChERS:</b> MeCN (1% Ác. Fórmico + 0,1M de Na <sub>2</sub> EDTA en H <sub>2</sub> O + MgSO <sub>4</sub> Anhidro + Acetato de Sodio. <b>Filtración:</b> Millex-GN nylon filter	No clean up	<b>UHPLC-MS/MS (QqQ)</b> Columna Acquity UHPLC BEH C <sub>18</sub> Fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,05% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeOH	3 min	Martínez-Vidal, J.L. et al., 2010
59	<b>QuEChERS:</b> MeCN (1% Ác. Acético) + EDTA + MgSO <sub>4</sub> Anhidro + Acetato de Sodio Anhidro. <b>Evaporación</b> del dvte. <b>Redisolver</b> en MeCN y Acetato de Amonio	No clean up	<b>UHPLC-TOF-MS</b> Columna Acquity UHPLC BEH C <sub>18</sub> Fase móvil A: H <sub>2</sub> O (0,1% ácido fórmico + 10mM de Formiato de Amonio) Fase móvil B: MeCN	14 min	Wang, J. & Leung, D., 2012

### 2.4.1. *Tratamiento de muestra*

La dificultad de encontrar un tratamiento de muestra adecuado se ha ido incrementando con la llegada del análisis multiresiduo. Esto es debido a que los analitos normalmente son moléculas complejas y de muy distinta naturaleza físico-química. La diferente polaridad de cada una de estas familias puede llegar a ser un gran obstáculo a la hora del diseño de una técnica para su extracción. Como en cualquier técnica analítica, también se busca una mayor rapidez, la reducción en el número de etapas y un menor consumo de materiales. Las principales técnicas para el tratamiento de muestra en el análisis de residuos de medicamentos veterinarios son:

- **Extracción Líquido-Líquido (LLE).**

Es el enfoque más sencillo a la hora de elegir el tratamiento de muestra. Consiste en la dilución de la muestra en un determinado disolvente, seguida de una centrifugación y recogida del sobrenadante.

Los disolventes más utilizados son el metanol y el acetonitrilo. El metanol ofrece gran recuperación de los analitos, pero las disoluciones quedan turbias, posiblemente debido a la incompleta desnaturalización de las proteínas, en el caso del análisis de productos lácteos. El acetonitrilo, es el disolvente preferido en la mayoría de las extracciones debido a que también recupera una amplia cantidad de analitos, la desnaturalización de las proteínas es más efectiva que con el metanol y la co-extracción de compuestos polares de la matriz es menor que con otros disolventes. Sin embargo, compuestos con una elevada polaridad no son extraídos con este disolvente (Berendsen, B. J. A. et al., 2013). Por este motivo, la mayoría de publicaciones no proponen una extracción con acetonitrilo puro, sino que, para la extracción del mayor número de compuestos, se utilizan mezclas de acetonitrilo con algún porcentaje de agua.

Otro aspecto importante a la hora de la extracción líquido-líquido es el pH de la disolución extractante, ya que es un factor que ayuda a la precipitación de proteínas. Cuando el pH de la disolución se acerca al pH del punto isoeléctrico, (pH en el que la proteína no posee carga eléctrica y, por tanto, no es capaz de desplazarse en un campo eléctrico) la solubilidad de la proteína es mínima, por lo que precipitará. Proteínas, como la caseína o la beta-lactoglobulina, presentes en la leche de vaca

tienen un punto isoeléctrico alrededor de 5. Por esto, en muchas extracciones, se añade ácido a la disolución extractante.

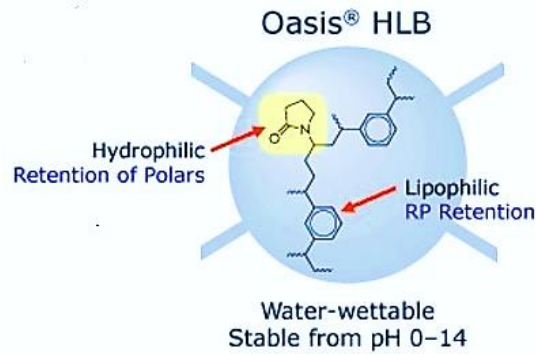
Con motivo de la proliferación de los métodos multiresiduo, la extracción líquido-líquido se ha quedado anticuada y se considera insuficiente, ya que la cantidad de interferentes es grande y se va a realizar un posterior análisis con técnicas muy sensibles y que requieren una alta selectividad. Aun así, suele estar presente en las siguientes técnicas como primer paso de extracción de analitos, ya que sigue siendo necesario precipitar las proteínas.

- **Extracción en Fase Sólida (SPE).**

La Extracción en Fase Sólida se utiliza como técnica de purificación o clean-up de los extractos obtenidos una vez realizada una extracción líquido-líquido. La SPE consiste en poner en contacto una muestra líquida con un sorbente sólido (partículas de pequeño tamaño con propiedades similares a la de la cromatografía de líquidos) que suele estar alojado en un cartucho de extracción. Entre ambas fases se producen múltiples equilibrios de distribución de los solutos y algunos componentes de la muestra, quedando algunos retenidos por su mayor afinidad por la fase sólida que por el disolvente, mientras que otros compuestos pasan inalterados. Finalmente, mediante el empleo de una disolución de composición adecuada se dará la elución completa de los analitos. La SPE convencional consta de varias etapas: acondicionamiento del soporte, adición de la muestra, lavado con un disolvente que eluya los interferentes y elución selectiva de los analitos.

Existen diferentes tipos de sorbentes: polares, no polares, de intercambio iónico, aunque en la actualidad los que están siendo más utilizados son los rellenos poliméricos. Los cartuchos de extracción SPE utilizados para la purificación de medicamentos veterinarios suelen ser cartuchos en los que el sorbente es polimérico y se basan en las interacciones hidrofílicas-lipofílicas. Este tipo de SPE recibe diferentes nombres, StrataX u Oasis HLB, dependiendo la casa comercial. Se caracterizan por ser un polímero multiusos, con balance hidrofílico-lipofílico, de fase reversa y humectable al agua. En su composición, existe una proporción equilibrada de dos polímeros: N-vinilpirrolidona (hidrofílica) y divinilbenceno (lipofílica) (Figura 4).





**Figura 4.** Estructura del sorbente polimérico HLB. *Imagen obtenida de la página web de la casa comercial Waters.*

Una extracción en fase sólida puede ser muy efectiva cuando se trata de determinar compuestos pertenecientes a una sola familia (Kim, D. et al., 2011) o varias familias de medicamentos con polaridades similares (Koesukwiwat, U. et al., 2007; Vargas-Mamani, M. C. et al., 2009). Aunque a veces esta técnica pueda resultar poco selectiva y limitada, ya que la extracción de analitos muy polares no es la ideal. Pero los porcentajes de recuperación que se obtienen con ella son muy buenos, lo que la hace una técnica importante y comparable a otras (Berendsen, B. J. A. et al., 2013). Esto se evidencia en la existencia de estudios en los que se utiliza, como tratamiento de muestra, la SPE para el análisis multiresiduo llegándose a identificar en leche más de 100 residuos veterinarios pertenecientes a 12 familias de medicamentos distintas (Stolker, A. A. M. et al., 2008).

- **Ultrafiltración.**

Es otra técnica de purificación alternativa a la SPE y se utiliza principalmente para eliminar interferentes de alto peso molecular, como proteínas, lípidos y azúcares, que afectan, sobre todo, a la etapa de ionización en el análisis por espectrometría de masas. Es una técnica de separación de membrana en las que las moléculas se separan por tamaño. Las moléculas más grandes que los poros de la membrana permanecerán en la superficie de esta y se concentrarán en esta fase.

Varios estudios proponen esta técnica para la identificación de drogas de uso veterinario, como en la identificación de 150 analitos pertenecientes a 10 familias distintas en leche (Ortelli, D. et al., 2009). También se utiliza esta técnica para la identificación en leche de 25 compuestos pertenecientes a las 5 familias de antibióticos (Turnipseed, S. B. et al., 2008). Aunque, en este último estudio, la ultrafiltración va precedida de una etapa de extracción en fase sólida con un cartucho

Oasis HLB; pero, según los autores en un estudio posterior, esta etapa no mejora significativamente la recuperación de los analitos; en algunos de los compuestos  $\beta$ -lactámicos sí que mejora, pero en otros, como las tetraciclinas, la recuperación disminuye (Turnipseed, S. B. et al., 2011).

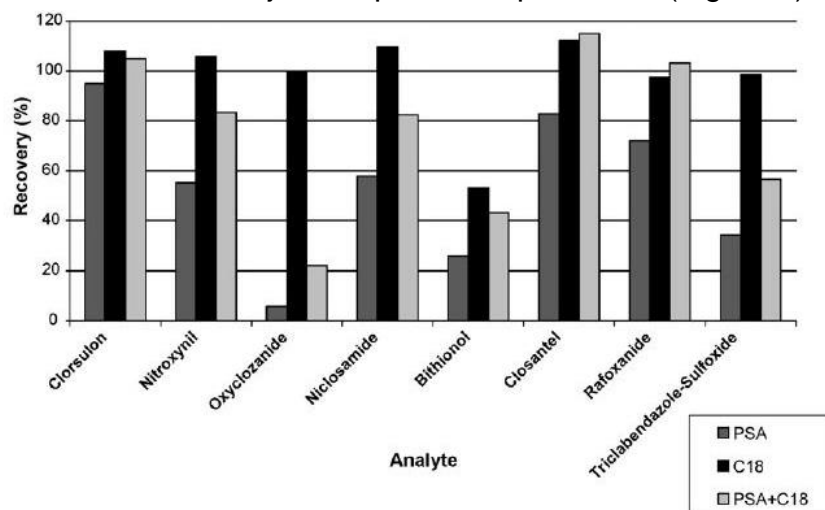
- **Extracción QuEChERS.**

La metodología QuEChERS que es un acrónimo anglosajón de las palabras “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, y Safe” fue inicialmente pensada para la extracción de pesticidas en frutas y verduras (Anastassiades, M. et al., 2003). Tiene numerosas ventajas, que su nombre ya indica, y por esto es una técnica en auge y está siendo cada vez más estudiada y adaptada, por ejemplo, para su aplicación en matrices alimentarias. La adaptación de esta metodología al análisis de medicamentos veterinarios cada vez va teniendo más importancia, siendo ampliamente estudiada para el análisis multiresiduo de estos compuestos en leche. Este método tiene dos etapas principales: la etapa de extracción y purificación.

En la primera etapa, el objetivo es la precipitación de las proteínas de la leche para obtener un extracto orgánico en el que se encuentren los analitos. Se utiliza, como fase extractante, acetonitrilo al que se le ha añadido pequeño porcentaje de ácido con el fin de obtener un medio ligeramente ácido. Este paso es especialmente importante. Como ya se ha dicho previamente, el medio ácido mejora considerablemente la recuperación de varias familias de analitos, ya que el pH (que estará alrededor de 5) afecta a la ionización de las sustancias anfóteras como las sulfamidas, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas y nitroimidazoles. La eliminación del ácido acético solo podía extraer sulfamidas libres presentes en las muestras, y tampoco ayudaba a la recuperación de compuestos  $\beta$ -lactámicos ni quinolonas (Zhang, Y. et al., 2015). También se suele añadir EDTA para mejorar la recuperación de analitos como fluoroquinolonas, macrólidos y, sobre todo, de tetraciclinas. Después de una agitación, se añade sulfato de magnesio anhidro (o sulfato de sodio anhidro) y acetato de sodio (o cloruro de sodio), para reducir el contenido en agua en la muestra y aumentar la fuerza iónica respectivamente. En esta etapa del método QuEChERS se produce el denominado salting out o la precipitación salina, el cual consiste en la precipitación de las proteínas debido al aumento de la fuerza iónica de la disolución en la que se encuentran. Puede ser un factor que por sí solo pueda hacer precipitar las proteínas puesto que disminuye la solvatación de una proteína, haciendo que disminuya su

solubilidad y generando una interacción proteína-proteína que provoca la precipitación de las mismas. No hay diferencias, en términos de recuperación de analitos, entre la utilización de Sulfato de Magnesio o Sodio. Por último, se centrifuga y se recoge el sobrenadante.

A continuación, se procede a la etapa de purificación ó más comúnmente conocida como clean-up, que es una Extracción en Fase Sólida Dispersiva (d-SPE). Se preparan unos tubos de polipropileno de centrífuga con cantidades precisas de sorbente, el cual adsorbe en su superficie interferentes de la matriz que han sido extraídos. La mezcla se vuelve a centrifugar y el sobrenadante puede ser analizado directamente o concentrado sobre un filtro de membrana (Kinsella B., O'Mahony J., et al., 2009). Aunque en el método QuEChERS original el sorbente más utilizado es el PSA, este no da tan buenos resultados cuando el objetivo es eliminar interferentes de una matriz de origen animal. Una solución es la utilización de C<sub>18</sub> como sorbente, ya que al ser menos polar ayuda a la eliminación de compuestos lipofílicos de la matriz. El C<sub>18</sub> puede utilizarse solo (Zhang, Y. et al., 2015), o combinado con PSA (Kinsella B., Lehotay S. J., et al., 2009), dando ambos buenos porcentajes de recuperación para algunos compuestos y dependiendo en qué familia de compuestos se quiera centrar el análisis un sorbente dará mejor recuperación que el otro (Figura 5).



**Figura 5.** Recuperación de 8 analitos en leche dependiendo del sorbente utilizado en la técnica de purificación d-SPE. (Kinsella, B.; Lehotay, S. J. et al. *New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. 2009).

En los últimos estudios, como en la identificación de 21 drogas veterinarias en leche (Martínez-Vidal, J.L. et al., 2010) y 59 (Wang, J. et al., 2012), la etapa de purificación fue suprimida, ya que reducía los porcentajes de recuperación de los analitos.

#### 2.4.2. Técnicas cromatográficas

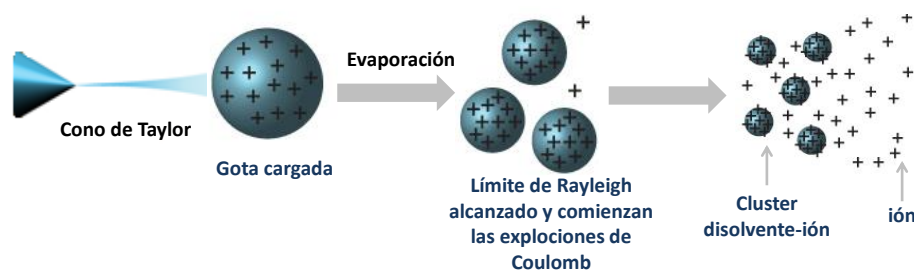
Los métodos tradicionales de análisis eran ensayos inmunoenzimáticos, basados en la reacción antígeno-anticuerpo en técnicas como ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). En la década de los 70, las técnicas cromatográficas fueron introduciéndose en el análisis de este tipo de compuestos, la Cromatografía de Capa Fina (TLC), normalmente con detectores de fluorescencia, fue la primera en utilizarse en la detección cualitativa de tireostáticos y anabolizantes. Era una técnica que conseguía alcanzar límites de detección bajos, además de ser simple y específica. Posteriormente, fue ganando popularidad la cromatografía de líquidos con detectores ultravioleta, fluorescencia o índice de refracción. Pero estas técnicas tenían una falta de sensibilidad que debía compensarse con un tratamiento de muestra muy selectivo, lo que conllevaba unos tiempos de análisis muy largos. Además, se corría el riesgo de centrarse en conseguir una alta selectividad de algunos analitos, en detrimento de otras familias de compuestos, los cuales podían llegar a no extraerse, o, en caso de hacerlo, sería de manera que en el posterior análisis cromatográfico no se detectarían. Más adelante en la década de los 90, con el avance en las técnicas cromatográficas y su acoplamiento a la espectrometría de masas, las técnicas más utilizadas fueron la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) y la Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS).

En la actualidad, la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia (HPLC) está siendo el método utilizado para la identificación y cuantificación de los residuos de medicamentos veterinarios, ya que son compuestos relativamente polares, no volátiles y, en algunos casos, sensibles al calor (Gentili, D. et al., 2005). Además, como en los últimos años lo que se pretende es analizar simultáneamente el mayor número de residuos de todas las familias posibles, es decir, el análisis multiresiduo, ha supuesto un esfuerzo mayor, en comparación con otros contaminantes como los pesticidas, ya que la diversidad de las propiedades químicas de los medicamentos veterinarios es mucho más grande (Stubbings, G. & Bigwood, T., 2009).

Recientemente, la introducción de la Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia (UHPLC) ha supuesto un avance, tanto en la rapidez del análisis como en un menor consumo de disolvente debido a este menor tiempo de análisis. Tanto es así que, en muchos artículos recientes, como los que aparecen en la Tabla 3, las técnicas de UHPLC están reemplazando a las de HPLC. Esto es debido a que se produce un

aumento en la eficacia en la separación al disminuir el tamaño de partícula, que pasa de ser de 5  $\mu\text{m}$  en HPLC a ser inferior a 2  $\mu\text{m}$  en UHPLC. Además, las columnas UHPLC son significativamente más cortas (su longitud está entre 3 y 7,5 mm, mientras que las de HPLC suelen ser de 25 cm).

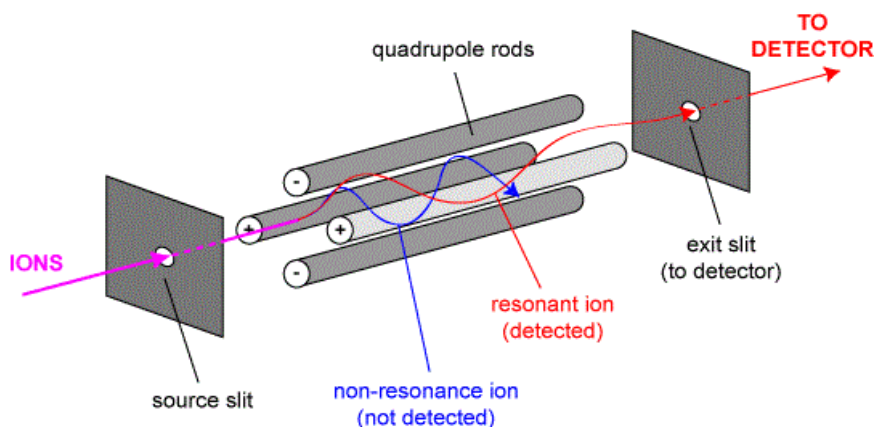
La cromatografía es una técnica únicamente separativa por lo que se necesita un detector para poder identificar y cuantificar los compuestos. Como puede observarse en la Tabla 3, gracias al acoplamiento a detectores espectrometría de masas de alta resolución como el de tiempo de vuelo (TOF) o la espectrometría de masas en tándem, como el triple cuadrupolo (QqQ), es posible lograr el objetivo deseado, es decir, desarrollar métodos que confirmen y cuantifiquen la presencia de estos compuestos. Para realizar el acoplamiento entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas es necesaria una fuente de ionización, ya que los compuestos salen de la columna en estado líquido y el equipo de masas trabaja con la muestra en estado gaseoso. La ionización por electrospray (ESI) es una de las técnicas más usadas en la actualidad, y es la utilizada en este trabajo. Se caracteriza por producir una ionización suave y realizarse a presión atmosférica. Esta técnica consiste en la aplicación de una diferencia de potencial en el terminal del capilar metálico que transporta la fase móvil y la entrada al espectrómetro de masas. Esta diferencia de potencial unida al gradiente de presión que se produce (ya que la ionización se produce a presión atmosférica pero el espectrómetro de masas trabaja en alto vacío para evitar colisiones entre las moléculas) son los encargados de que los iones formados entren en el detector. El mecanismo de formación de los iones se ilustra en la Figura 6.



**Figura 6.** Esquema del proceso de formación del electrospray. (Moreno-González, D. *Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y aguas*. 2013).

El primer paso consiste en la formación de un cono de líquido (Cono de Taylor) en la punta del capilar que, debido a la acción de un gas de nebulización y de la diferencia de potencial aplicada, forma las gotas cargadas. Seguidamente, un gas de secado es el encargado de evaporar el disolvente de la fase móvil y los tampones presentes en

ella (en este caso el HCOOH), lo que hace que vaya aumentando la densidad de carga eléctrica dentro de la gota y, debido a la diferencia de potencial existente, los iones son atraídos hacia la superficie de la misma. Cuando las fuerzas de repulsión electrostática de las cargas del mismo signo en la superficie de la gota son mayores que la tensión superficial que mantiene unidas las gotas en forma esférica (Límite de Rayleigh), se produce la fisión de las gotas (explosiones de Coulomb) en otras más pequeñas. Estas seguirán sufriendo el mismo proceso sucesivamente hasta la formación de iones cargados, que son los que entrarán en el espectrómetro de masas. A continuación, se encuentra el analizador utilizado en esta memoria, el triple cuadrupolo. Un analizador de cuadrupolo simple (Figura 7) consiste en cuatro barras metálicas dispuestas en paralelo, conectadas dos a dos eléctricamente. Sobre estas barras se aplica un voltaje de compensación de corriente continua y un voltaje de radiofrecuencia. Los iones producidos en la fuente de ionización se introducen en el campo cuadrupolar mediante la aplicación de una diferencia de potencial, con lo que empiezan a oscilar en un plano perpendicular a las cuatro barras. Así, los iones describen una trayectoria que depende directamente de su relación  $m/z$ . Además, los cuadrupolos son capaces de ajustar una radiofrecuencia para estabilizar una relación  $m/z$  concreta que es dirigida hacia el detector; por tanto, los iones que presenten esa relación seguirán una trayectoria estable y avanzarán hacia el detector (en rojo en la Figura 7) y el resto (en azul en la Figura 7) presentarán trayectorias no estables por lo que saldrán del cuadrupolo chocando con las barras metálicas.



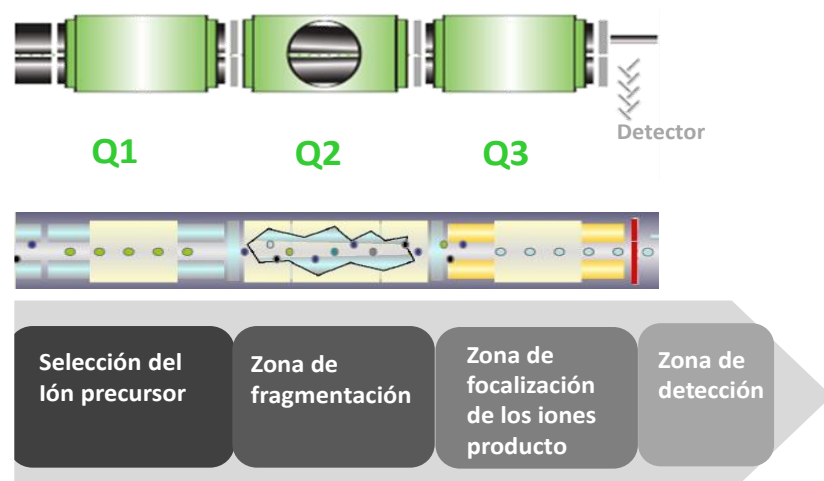
**Figura 7.** Trayectoria de los iones en un analizador de cuadrupolo. (Gates, P. University of Bristol. *Quadrupole Mass Analysis*. 2014).

La salida de los iones con la  $m/z$  seleccionada hacia el detector se realiza ordenadamente dependiendo de la masa de cada compuesto, saliendo primero los

compuestos con menor masa. Esto tiene su base en la Segunda Ley de Newton ( $F = m \cdot a$ ), ya que al aplicar la misma fuerza para todos los iones la aceleración será menor cuanto mayor sea su masa.

El analizador de triple cuadrupolo consiste en tres cuadrupolos conectados en serie (Figura 8). Y consta de tres partes, las cuales se utilizan en este trabajo en el modo de adquisición Multiple Reaction Monitoring (MRM), y consisten en:

- **Q1.**  
Analizador de tipo cuadrupolo encargado de seleccionar la relación  $m/z$  deseada, que suele ser la del ión precursor.
- **Q2.**  
Es la celda de colisión, dónde se produce la fragmentación del ión seleccionado. Aunque se denomine como un cuadrupolo (Q), la celda de colisión actualmente es un hexapolo. La energía aplicada en Q2 puede tomar diferentes valores, lo que permite obtener espectros de masas en los que aparecen diferentes fragmentos y/o diferentes relaciones de intensidad entre ellos, por lo que es posible ajustarse a las exigencias actuales de la legislación vigente (Decisión de la Comisión 2002/657/EC, 2002).
- **Q3.**  
Analizador de tipo cuadrupolo encargado de separar los iones producto formados en el Q2.



**Figura 8.** Esquema del proceso del analizador de triple cuadrupolo. (Moreno-González, D. *Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y aguas*. 2013).

Utilizar este analizador en el modo de adquisición MRM, es una herramienta muy útil en la detección de drogas veterinarias, ya que debido a las infusiones directas se logra

conocer la masa de cada compuesto y su fragmentación, con lo que el método es altamente selectivo, mejorando por ello su sensibilidad.

## 2.5. Objetivos

Los objetivos que se persiguen en el siguiente trabajo son:

- Poner a punto un método de análisis multiresiduo de productos veterinarios mediante técnicas cromatográficas.
- Seleccionar un método para el tratamiento de muestra de productos lácteos.
- Completar la validación del método.
- Estudiar la presencia de productos veterinarios en muestras de productos lácteos de marca blanca.

## 3. EXPERIMENTAL

### 3.1. Materiales y Reactivos

Los patrones estándar de los analitos a determinar fueron adquiridos a través de la casa comercial Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.), al igual que los disolventes para su preparación: metanol y acetonitrilo. Se prepararon disoluciones concentradas de 500 mg/Kg que fueron almacenadas en el congelador a una temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ . A partir de estas se preparó una disolución que contenía todos los analitos y en la que la concentración de cada uno de ellos era de 10 mg/Kg, el disolvente fue metanol. A continuación, esta se diluyó para obtener otra disolución en la que la concentración de cada analito fuese 1 mg/Kg y el disolvente fuese  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (50:50). Por último, se preparó otra dilución a partir de esta última, para obtener el nivel más alto de la recta de calibrado 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en la que la proporción de disolvente fue  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (80:20). A partir de la cual se fueron preparando los siguientes niveles de la recta de calibrado estándar mediante diluciones sucesivas y empleando como disolvente  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$  (80:20). Los niveles de todas las rectas de calibrado utilizadas en este trabajo son: 0  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (blanco), 0.001  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 0,01  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 0.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  y 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .



El agua de grado HPLC para los análisis se obtuvo de un sistema de agua Mili-Q-Plus ultra pura de Millipore (Milford, Massachusetts, EE.UU.). Los reactivos para las fases móviles eran de calidad cromatográfica y fueron: agua de la casa comercial Merck Milipore (Milford, Massachusetts, EE.UU.), metanol, acetonitrilo, ácido fórmico de calidad masas y formiato amónico adquiridos en la casa Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.).

Para el tratamiento de muestra, se usaron tubos Falcon de centrífuga con un volumen de 15 y 50 ml y filtros de jeringa de membrana PTFE 0,45  $\mu\text{m}$  pertenecientes a la casa comercial DELTALAB. Para la extracción en fase sólida, se utilizaron cartuchos SPE Oasis PRiME HLB 3cc de la casa comercial Waters (Milford, Massachusetts, EE.UU.) y para la extracción QuEChERS se utilizaron tubos EMR-Lipid d-SPE y tubos EMR-Lipid Polish, ambos de la casa comercial Agilent Technologies (Santa Clara, California, EE.UU.).

La centrifuga utilizada fue el modelo Sartorius 2-16P, de la casa Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EE.UU.).

Y El evaporador utilizado fue el TurboVap LV Concentration Evaporator de la casa Caliper Life Sciences (Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

### **3.2. Tratamiento de Muestra**

Es una de las etapas fundamentales en la determinación de residuos veterinarios en alimentos para el consumo humano. De ella depende en gran medida la robustez del método. El tratamiento de muestra se basa en la correcta extracción de los analitos de interés del resto de componentes de la matriz y la eliminación de interferentes para un posterior análisis cromatográfico. Hay que tener en cuenta que se persigue cuantificar los compuestos ya que, para muchos de ellos, está legislado un MRL que no se puede superar en la muestra, lo que supone que los porcentajes de recuperación deben ser aceptables para poder realizarla.

El estudio de medicamentos de uso veterinario se realiza en diversos tejidos animales, como, por ejemplo, hígado o riñón. Estas matrices requieren un tratamiento de muestra más cuidadoso con el fin de homogeneizar bien la muestra y tener una correcta representatividad al tomar las alícuotas para su análisis. La muestra objeto de este trabajo, la leche, al ser líquida, no presenta estos problemas ya que, es una

matriz más homogénea. Aun así, no deja de ser una matriz compleja, porque, aparte de agua en su composición (87%), contiene hidratos de carbono, principalmente lactosa (4,8%), grasas (3,7%), proteínas (3,4%) y minerales (0,7%) (McGee, H., 2007). La grasa presente en la leche se encuentra presente en pequeños glóbulos de triglicéridos suspendidos en agua y rodeados de una capa de fosfolípidos. Las proteínas se clasifican en dos grandes grupos: caseínas y proteínas séricas. Además, la leche contiene minerales como potasio, calcio, fósforo y cloro en concentraciones alrededor de 1000 mg/Kg y otros como hierro, cobalto, zinc o selenio a niveles de trazas, es decir, por debajo de 100 mg/Kg. A niveles de trazas también se encuentran las vitaminas, liposolubles e hidrosolubles, entre las que se encuentran en mayor proporción, destacan las vitaminas del complejo B, la vitamina E y la vitamina A. En este trabajo se pretende evaluar dos tratamientos de muestra diferentes comercializados. Se toma una marca de leche, considerando que está exenta de cualquier tipo de residuo de medicamentos de uso veterinario, con el fin de obtener dos extractos distintos y comparar posteriormente cuál de estos ofrece mejores resultados en la validación del método analítico.

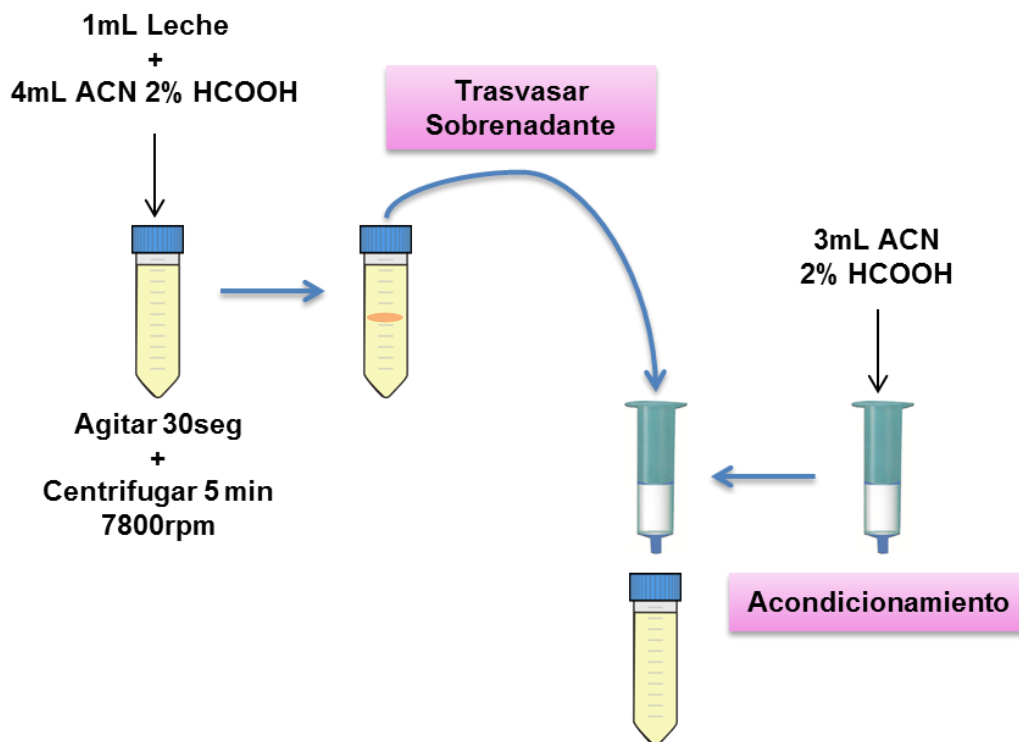
### 3.2.1. *Extracción en Fase Sólida (Oasis HLB PRiME)*

La novedad de los cartuchos Oasis HLB PRiME (Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use), utilizados en este trabajo, reside en que el proceso de SPE solo precisa de una etapa, es decir, solo es necesario pasar el extracto directamente por el cartucho. Lo que en comparación con los cartuchos HLB, que precisan de las etapas de una extracción en fase sólida convencional, supone una mejora en el tiempo de análisis y en el consumo de disolvente. Además, los cartuchos HLB PRiME son capaces de retener las grasas y fosfolípidos de la leche, por lo que combinados con una técnica de precipitación efectiva eliminan la mayoría de los interferentes de la matriz.

El tratamiento de muestra que se realizó (Figura 9) está basado en un método que proporciona la casa comercial Waters, para analizar drogas de uso veterinario, procedentes de 9 familias distintas, en leche (Huang, D. et al., 2015). Para la etapa de extracción, en un tubo Falcon de 15 ml, se adicionan a 1 ml de leche 4 ml de acetonitrilo con un 2% de ácido fórmico. Tras agitar en el vórtex, el tubo se centrifuga

a 7800 rpm durante 5 minutos. Una vez realizado esto, se puede observar claramente la separación de fases y proceder a la siguiente etapa, la purificación. Para ello, se vierte el sobrenadante (fase orgánica) sobre el cartucho Oasis HLB PRiME, que previamente ha sido acondicionado con 3 ml de acetonitrilo con un 2% de ácido fórmico, y se recoge el extracto.

Este tratamiento tiene un factor de dilución de la muestra 1:5.

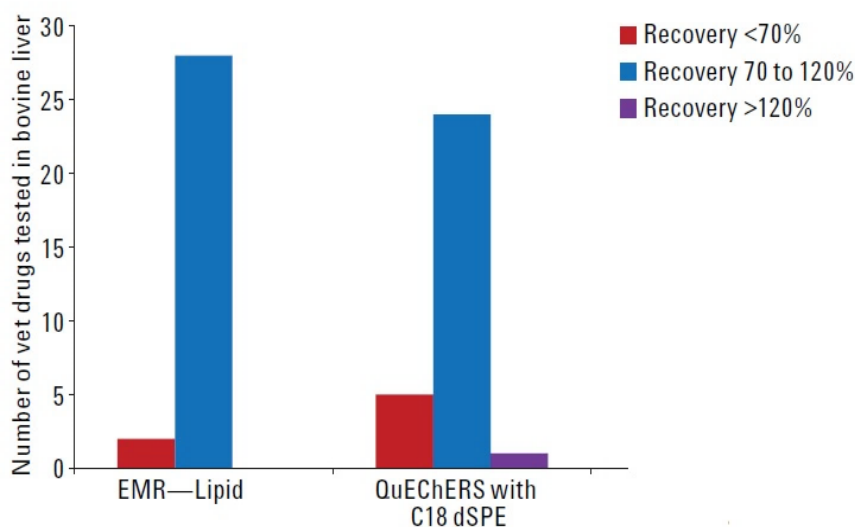


**Figura 9.** Extracción en Fase Sólida (Oasis HLB PRiME).

### 3.2.2. Extracción QuEChERS (EMR-Lipid)

En este estudio, se va a aplicar una metodología basada en QuEChERS que incorpora un nuevo sorbente para la limpieza del extracto final llamado "Enhanced Matrix Removal - Lipid (EMR-Lipid)", este nuevo sorbente está específicamente diseñado para eliminar la mayoría de los lípidos procedentes de matrices con alto contenido graso. El sorbente puede reemplazar los sorbentes convencionales como PSA y C<sub>18</sub>, reduciendo significativamente los interferentes de la matriz y mejorando la recuperación de analitos, ya que en ellos el porcentaje de retirada de lípidos es bastante limitado y se produce la co-extracción de algunos de ellos con los analitos, quedando en el extracto final, con las consecuentes anomalías que se producirán en

el análisis cromatográfico. En la Figura 10 puede observarse la mejora en la recuperación, debido a la utilización como sorbente EMR-Lipid frente al C<sub>18</sub>.



**Figura 10.** Porcentajes de recuperación de analitos en muestras de hígado de vaca fortificadas en 50 µg/Kg de drogas veterinarias. (Zhao, L.; Lucas. *Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS*. Agilent Technologies Application Note. 2015).

El tratamiento de muestra que se realizó (Figura 11) está basado en una hoja de aplicación que proporciona la casa comercial Agilent para analizar drogas de uso veterinario, procedentes de 17 familias distintas, en hígado de vaca (Zhao, L. et al., 2015). Para la etapa de extracción, en un tubo Falcon de 50 ml, se adicionan 2 ml de leche seguidos de 10 ml de acetonitrilo con un 5% de ácido fórmico. Tras agitar en el vórtex durante 2 minutos, el tubo se centrifuga a 5000 rpm durante 5 minutos. Mientras tanto, en un tubo EMR-Lipid d-SPE se vierten 5 ml de una disolución tampón de acetato amónico de concentración 5 mM para activar el sorbente. Este paso es especialmente importante, ya que mejora la interacción del sorbente con las sustancias que se quieren retirar de la matriz, especialmente los lípidos, lo que conlleva a una eliminación de interferentes más eficiente. A continuación, en este tubo se añaden 5 ml del sobrenadante obtenido tras la centrifugación y se agita el tubo manualmente, seguida de otra agitación en el vórtex. Se centrifuga este tubo a 5000 rpm durante 3 minutos. Una vez realizado esto, en el tubo aparece un sobrenadante en el que no se aprecia separación de fases, ya que está constituido por una mezcla aproximadamente 50:50 de MeCN:H<sub>2</sub>O y estos dos disolventes son miscibles. Después se vierten 5 ml de este sobrenadante obtenido en la segunda centrifugación, en un tubo EMR-Lipid Polish, el cual contiene 2g de una mezcla de sales de MgSO<sub>4</sub>

anhidro y NaCl en proporción 1:4. Estas sales, debido a que aumentan la fuerza iónica de la disolución, posibilitan la separación de las fases acuosa y orgánica. Este paso no solo implica la separación de fases, sino que ayuda en la limpieza del extracto final, retirando el exceso de agua, sales y restos de sorbente que hubieran podido quedar. A continuación, se agita vigorosamente el tubo durante 2 minutos, apreciándose el calentamiento de este. Esto se debe a la reacción exotérmica que tiene lugar al producirse la hidratación del sulfato de magnesio anhidro al entrar en contacto con el agua del sobrenadante. Después, los tubos se agitan en el vórtex y se centrifuga a 5000 rpm durante 3 minutos y se recoge el extracto del sobrenadante orgánico. Este tratamiento tiene un factor de dilución de la muestra 1:6.

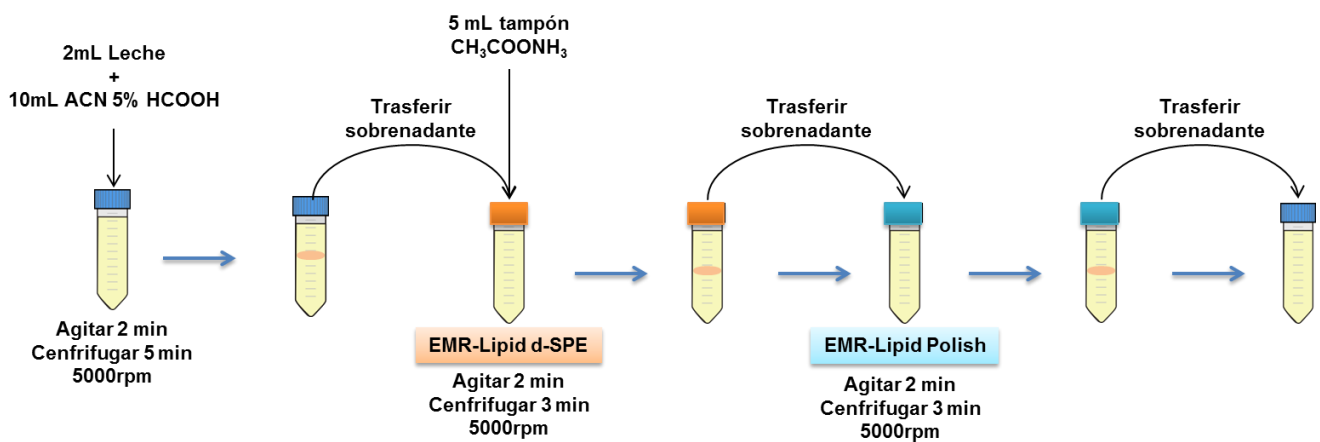


Figura 11. Extracción QuEChERS (EMR-Lipid).

### 3.3. Instrumentación

El equipo utilizado para la separación, identificación y cuantificación de analitos fue un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia, UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) acoplado a un Espectrometrómetro de Masas con detector de Triple Cuadropolo, TSQ Quantiva Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José, California, EE.UU.). El acoplamiento al espectrómetro de masas se hace mediante una fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo. Los parámetros de ionización fueron: Voltaje del Capilar 3500 V, Sheath Gas 35 unidades arbitrarias, Aux Gas 15 unidades arbitrarias, Sweep Gas 1 unidades arbitrarias. La Temperatura del Transfer

Tube fue de 250°C y la Temperatura de Vaporización fue de 300°C, trabajando ambos cuadrupolos con una resolución de 0,7 FMWH.

Se utilizó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> Rapid Resolution HD 2,1 x 50 mm y 1,8 µm de tamaño de partícula (Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU). La temperatura de la columna durante el análisis fue de 25°C.

La elución de los analitos se realizó en gradiente con un tiempo de análisis de 15 minutos (Tabla 4). Las fases móviles A y B fueron agua con un 1% de ácido fórmico y acetonitrilo con un 1% de ácido fórmico, respectivamente. La composición inicial de la fase móvil fue del 10% orgánico, la cual se mantuvo durante 4 minutos, a partir de ese momento el porcentaje en composición orgánica fue aumentando. Hasta que en el minuto 8, la composición orgánica de la fase móvil alcanza su máximo en 95% y se mantiene durante 2,5 minutos con el propósito de eluir todos los compuestos apolares que pudieran quedar retenidos en la columna. Por último, en el minuto 11 se produce una bajada rápida en la composición en fase orgánica, volviendo a las condiciones iniciales y manteniéndolas durante cuatro minutos con objeto de acondicionar la columna para el siguiente análisis. El flujo de la fase móvil se mantuvo constante en 0,4 mL/min. La inyección se hace mediante un sistema automatizado y el volumen de inyección de cada muestra fue de 20 µL.

**Tabla 4.** Gradiente de elución final.

Tiempo (min)	% MeCN
0	10
4	10
5	30
8	95
10,5	95
11	10
15	10

Adicionalmente, y como apoyo en la evaluación del tratamiento de muestra, también se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia (Agilent Series 1290 INFINITY, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.) acoplado a un Espectrómetro de Masas con analizador de Tiempo de Vuelo (Agilent 6220 TOF, Agilent Technologies, Santa Clara, California, EE.UU.).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Optimización del Método Cromatográfico

Antes de realizar una separación cromatográfica de los analitos, fue necesario realizar una infusión directa de cada uno de ellos por separado. Para ello, se prepararon disoluciones de 1 mg/Kg a partir de las disoluciones patrón estándar de 500 mg/Kg y se inyectaron en el equipo mediante una jeringa. Esto sirve para poder caracterizar bien el compuesto, es decir, saber la masa del ión precursor formado tras la ionización y los fragmentos resultantes en el análisis por espectrometría de masas, y así poder estar seguros de su presencia en posteriores análisis. Una vez realizadas todas las infusiones directas, se obtiene la información necesaria para, según los criterios de la legislación vigente, poder identificar el compuesto en base a sus fragmentos. El fragmento más intenso sirve para la cuantificación y el segundo fragmento más alto en intensidad sirve para la confirmación de que es el compuesto buscado.

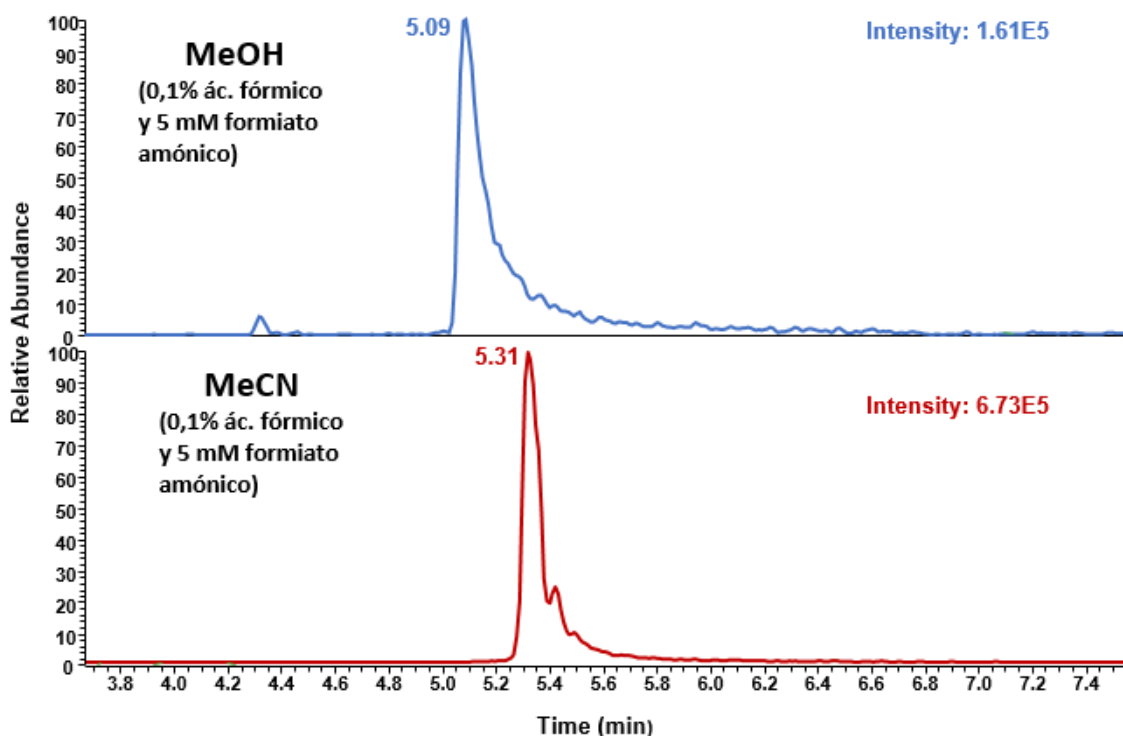
Una vez caracterizado cada uno de ellos, se realizó un estudio para optimizar las fases móviles y conseguir la mejor separación de los analitos y resolución de los picos cromatográficos. Para esto se colocó la columna en el equipo y se procedió a la inyección de la disolución que contiene 10 µg/Kg de cada uno de los compuestos. Se realizaron múltiples pruebas en las que cambiaron gradientes de elución, fases móviles y hasta la columna con el fin de obtener los mejores resultados.

En primer lugar, se probó con una columna en fase reversa C<sub>18</sub> Accucore aQ 100 x 2,1 mm de 2,6 µm (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.), pero no se obtuvieron buenos resultados en las pruebas realizadas con ella. Por lo que se procedió al cambio de columna cromatográfica por la columna Zorbax Eclipse Plus C<sub>18</sub> Rapid Resolution HD (2,1 x 50 mm y 1,8 µm).

También se probaron varias fases móviles, para obtener una buena separación de los compuestos y una satisfactoria ionización. En primer lugar, se utilizaron agua y metanol como fases móviles, ambas con un 0,1% de ácido fórmico y 5 mM de formiato amónico. Al realizar varias pruebas con estas fases móviles y distintos gradientes, no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se decidió cambiar en la fase orgánica el metanol por acetonitrilo y realizar las mismas pruebas. Se comprobó que con este los picos cromatográficos mejoraban, pero no llegaban a resolverse de forma adecuada.

Este efecto puede verse en la Figura 12, en la que aparece el pico cromatográfico obtenido para el compuesto Orbifloxacín con diferentes composiciones de fase orgánica. Cuando la fase orgánica es metanol, se observa un pico con una cola mayor que con acetonitrilo, con lo que se evidencia la mejora al cambiar la composición de esta fase móvil.

### Orbifloxacín



**Figura 12.** Pico cromatográfico del compuesto Orbifloxacín (10 µg/Kg) con dos composiciones diferentes de la fase móvil orgánica.

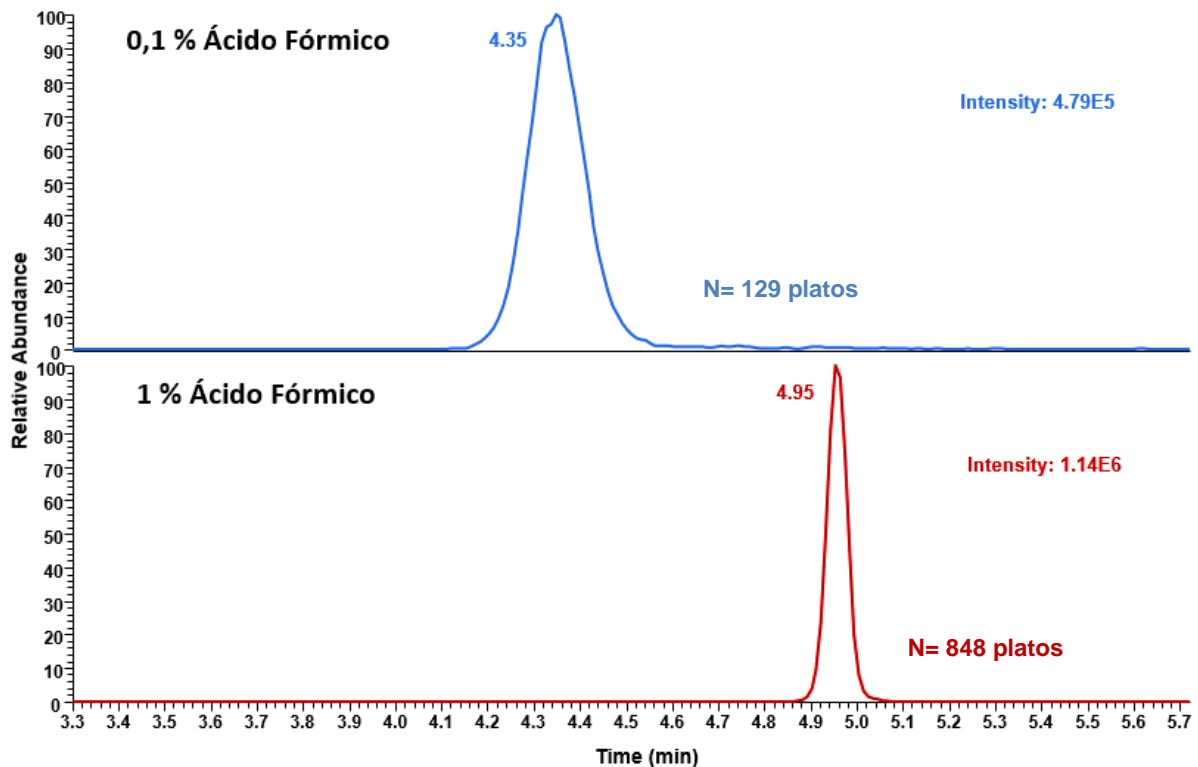
Una vez obtenido el gradiente óptimo, se evaluaron otras variables como la adición de aditivos a la fase móvil y el volumen de inyección, para conseguir unos picos más intensos y aumentar así la sensibilidad del método. Aunque hay que tener en cuenta que un aumento excesivo del volumen de inyección puede saturar la columna y provocar un efecto contrario, disminuyendo la eficacia de la separación.

Puesto que, través de las infusiones directas, se detectó como ión precursor de todos los analitos su molécula protonada ( $[M+H]^+$ ), las fases móviles precisan de compuestos con carácter ácido que sean capaces de donar protones a los iones formados en la fuente de electrospray y formar el ión precursor de cada compuesto. Por eso, se probaron diferentes concentraciones de formiato amónico y de ácido fórmico. Además, estos compuestos también modifican el pH de la fase móvil e



influyen en la separación cromatográfica de los compuestos. Por lo que se optimizó la concentración de ambos en las fases móviles para obtener una buena ionización, sin que el pH afectase negativamente en la separación cromatográfica. En la Figura 13, se observa la mejora del pico cromatográfico del Clenbuterol con el aumento del porcentaje de ácido fórmico en ambas fases móviles.

### Clenbuterol



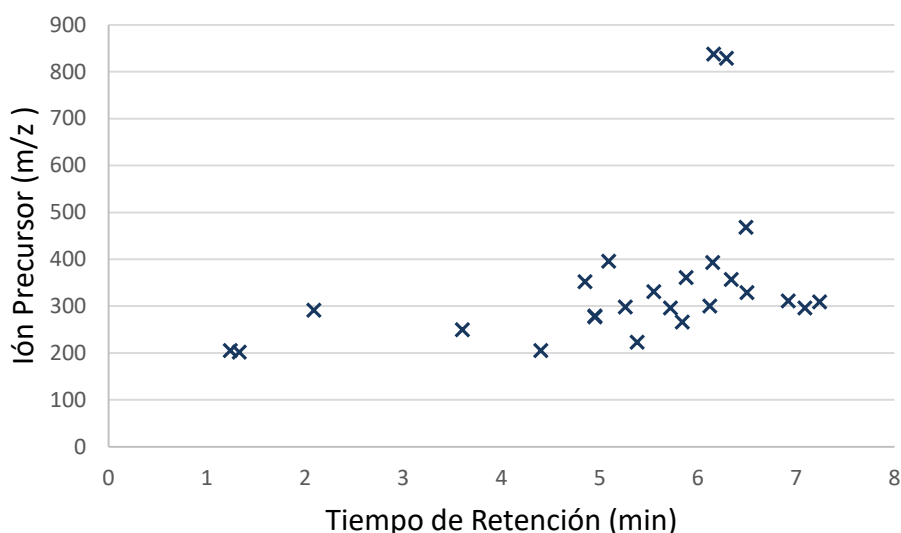
**Figura 13.** Mejora del pico cromatográfico del compuesto Clenbuterol (10 µg/Kg) con el aumento del porcentaje de ácido fórmico en las fases móviles. Donde N: número de platos teóricos para el Clenbuterol.

Además, en la Figura 13 puede observarse que se ha calculado el número de platos teóricos (N) para la columna con cada porcentaje de ácido fórmico en las fases móviles. El número de platos teóricos se relaciona con la eficacia de la columna. Con lo que al aumentar este, la eficacia también lo hace. Por lo que se comprueba que un aumento hasta el 1% de ácido fórmico aumenta la eficacia de la columna, al aumentar el número de platos.

Por tanto, se llega a la conclusión de que las fases móviles que mejor resuelven los picos cromatográficos y, en consecuencia, aumentan la eficacia de la columna son: agua (1% ácido fórmico) y acetonitrilo (1% ácido fórmico).

Adicionalmente, y en busca de la mejora del método cromatográfico, se realizó un estudio de la influencia del disolvente en el cual se inyectarían los analitos. Se preparó esta disolución en las siguientes proporciones de H<sub>2</sub>O:MeOH: 50:50; 70:30; 80:20; 90:10 y 95:5. A la vista de los resultados, se decidió que la proporción de disolvente H<sub>2</sub>O:MeOH más adecuada para el método es la 80:20.

Una vez optimizado completamente el método, se realizó un análisis para determinar el tiempo de retención de cada compuesto y poder fijar su ventana de detección. Lo que favorece la sensibilidad del análisis ya que el equipo solo se centra en detectar un compuesto durante un minuto específico y no durante todo el análisis. En la Figura 14 se puede observar cómo se distribuyen los compuestos a lo largo del tiempo total del análisis.



**Figura 14.** Distribución de los compuestos a la salida de la columna a lo largo del análisis cromatográfico.

Por último, en la Tabla 5 figura la lista de los compuestos estudiados en este trabajo, así como su caracterización por su tiempo de retención, masa del ión precursor y masa de los fragmentos de cuantificación y de confirmación.

Tabla 5. Caracterización de los compuestos estudiados.

	Compuesto	Masa Ión Precursor (m/z)	Masa Fragmento Cuantificación (m/z)	Masa Fragmento Confirmación (m/z)	Tiempo de Retención (min)
1	Acetamiprid	223,152	126,000	90,000	5,38
2	Albendazole	266,183	234,071	191,000	5,84
3	Albendazole Sulfone	298,183	159,054	266,071	5,26
4	Altrenogest	311,274	227,111	269,111	6,92
5	Betamethasone	393,274	373,165	355,165	6,15
6	Clenbuterol	277,183	203,000	132,111	4,95
7	Cloxacillin	468,183	160,054	178,000	6,49
8	Dapsone	249,522	156,111	108,921	3,60
9	Diclofenac	296,091	214,071	250,000	7,09
10	Fenbendazole	300,183	268,000	159,071	6,12
11	Fenthion	279,122	169,000	246,942	4,95
12	Josamycin	828,700	109,111	600,333	6,29
13	Leucomalachite Green	331,274	239,183	316,165	5,55
14	Levamisole	205,261	178,000	91,000	1,24
15	Lomefloxacin	352,213	265,111	308,111	4,85
16	Malachite Green	329,304	313,111	165,111	6,50
17	Mebendazole	296,183	264,054	105,000	5,72
18	Orbifloxacin	396,213	352,183	295,111	5,09
19	Phenylbutazone	309,213	160,165	77,000	7,24
20	Phenylthiouracil	205,261	103,000	188,000	4,40
21	Prednisolone	361,147	343,183	147,040	5,88
22	Roxithromycin	837,800	679,516	158,165	6,16
23	Sulindac	357,183	233,111	340,111	6,34
24	Thiabendazole	202,152	175,000	131,040	1,33
25	Trimethoprim	291,243	230,111	261,111	2,09

#### 4.2. Evaluación del Tratamiento de Muestra

Con el objetivo de comparar los dos tratamientos de muestra y la elección de uno de ellos para el estudio en muestras reales, se tuvieron en cuenta dos aspectos: el efecto matriz y el porcentaje de recuperación.

- **Efecto Matriz.**

El efecto matriz es una perturbación de la señal analítica, aumento o disminución, como consecuencia de la presencia de otros componentes presentes en la muestra y distintos del analito. En cromatografía, se debe a la coelución de otros compuestos presentes en la matriz con el analito de interés, por lo que, su señal será distinta a la de una disolución estándar del compuesto puro. El efecto matriz provoca un error

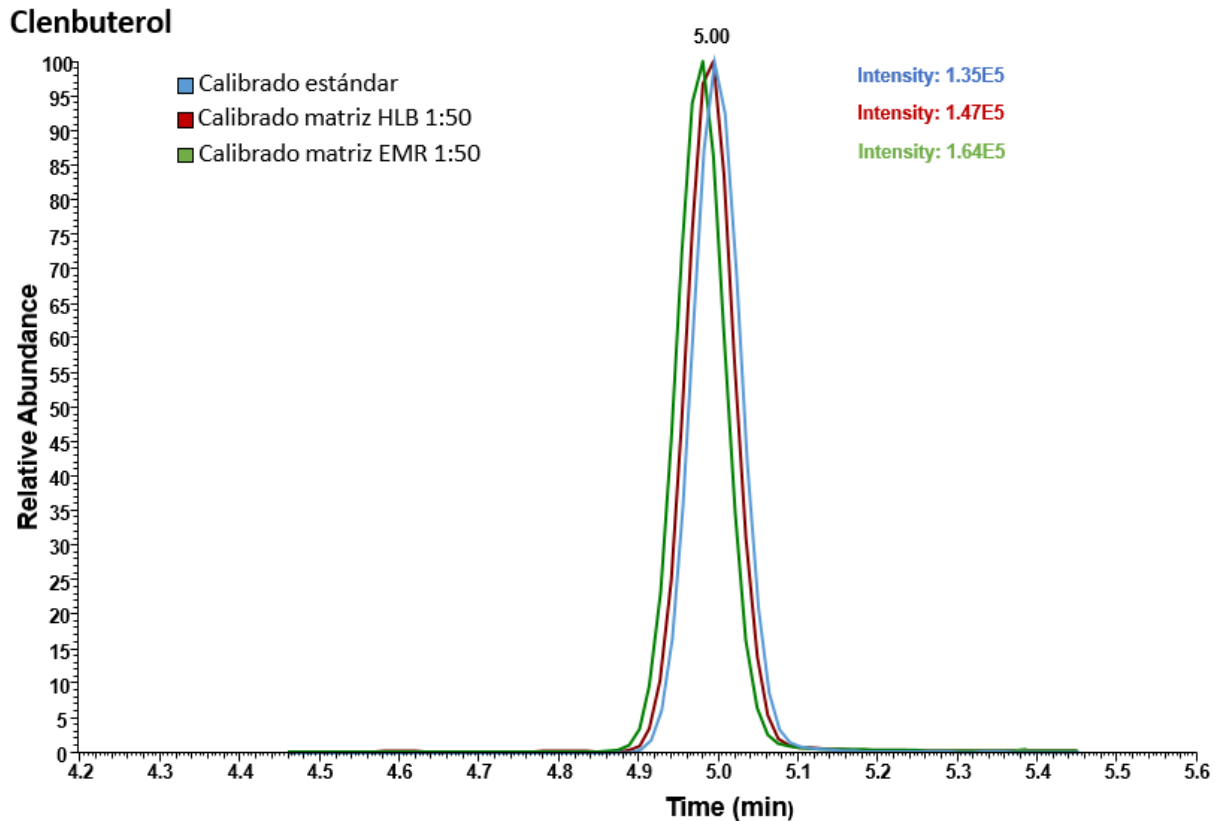
sistemático y es una de las mayores fuentes de interferentes en el análisis de trazas, ya que la proporción entre la masa de la matriz y la masa del analito es muy grande. Puede comprobarse comparando las pendientes de una recta de calibrado en disolvente con la de una recta de calibrado en presencia de matriz.

$$\text{Efecto matriz (\%)} = \left( \frac{\text{pendiente calibrado matriz}}{\text{pendiente calibrado estándar}} - 1 \right) \times 100$$

Si el efecto matriz se encuentra entre 10-20%, se considera que existe un efecto matriz suave, si está entre el 20-50%, se considera un efecto matriz medio y si es superior al 50% se dice que el efecto matriz es fuerte.

Para la evaluación del efecto matriz en leche, se recogió el extracto obtenido en cada uno de los tratamientos de muestra y se les aplicó una dilución 1:10. Estos extractos diluidos fueron dopados con una concentración de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µg/Kg. Hay que tener en cuenta que se debe mantener la proporción de disolvente (H<sub>2</sub>O:MeOH, 80:20) optimizada anteriormente. Después se preparó una recta de calibrado estándar con las mismas concentraciones de analitos, pero solo con el disolvente H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20).

Después del análisis cromatográfico, se calculó el efecto matriz de cada tratamiento de muestra para cada uno de los compuestos (Tabla 6) y, al final, se calculó el efecto matriz medio para cada tratamiento. Los resultados indican que el tratamiento en el que los compuestos de la matriz interfieren menos es el Oasis HLB PRiME, con efecto matriz medio del 3%, en contraste con el efecto matriz del tratamiento EMR-Lipid, cuyo efecto matriz medio es de 11%. Por tanto, se puede afirmar que para ambos tratamientos de muestra se podría realizar un calibrado externo ya que el efecto matriz es suave. Esta afirmación también puede evidenciarse en la Figura 15, en la cual se pueden ver los picos cromatográficos del compuesto Clenbuterol para los tres calibrados realizados al nivel de 1 µg/Kg, observándose que las intensidades de los picos son equivalentes.



**Figura 15.** Evidencia de la existencia de un efecto matriz suave en el compuesto Clenbuterol en los distintos calibrados a un nivel de concentración de 1 µg/Kg. Calibrado estándar H<sub>2</sub>O:MeOH (azul), calibrado en matriz Oasis HLB PRiME con dilución 1:50 (rojo) y calibrado en matriz EMR-Lipid con dilución 1:50 (verde).

- **Estudio de Recuperación.**

La recuperación de un método analítico es la capacidad que tiene este para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como un porcentaje. Para que un método se considere aceptable el porcentaje de recuperación de los analitos debe estar entre el 70% y el 120%.

Para obtener el porcentaje de recuperación de cada tratamiento, se fortifican 10 alícuotas de leche con una concentración de 50 µg/Kg de todos los analitos, después se las somete al tratamiento de muestra elegido y, finalmente, a los extractos se les aplica la dilución 1:10. A continuación, se analizan cromatográficamente cada uno de los extractos y se obtiene la señal de cada una de las 10 réplicas de cada tratamiento. Se calcula el factor de recuperación de cada compuesto dividiendo la concentración media de cada compuesto, obtenida después del tratamiento, entre la concentración real añadida, es decir, entre 50 µg/Kg.

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{concentración experimental}}{\text{concentración real}} \times 100$$

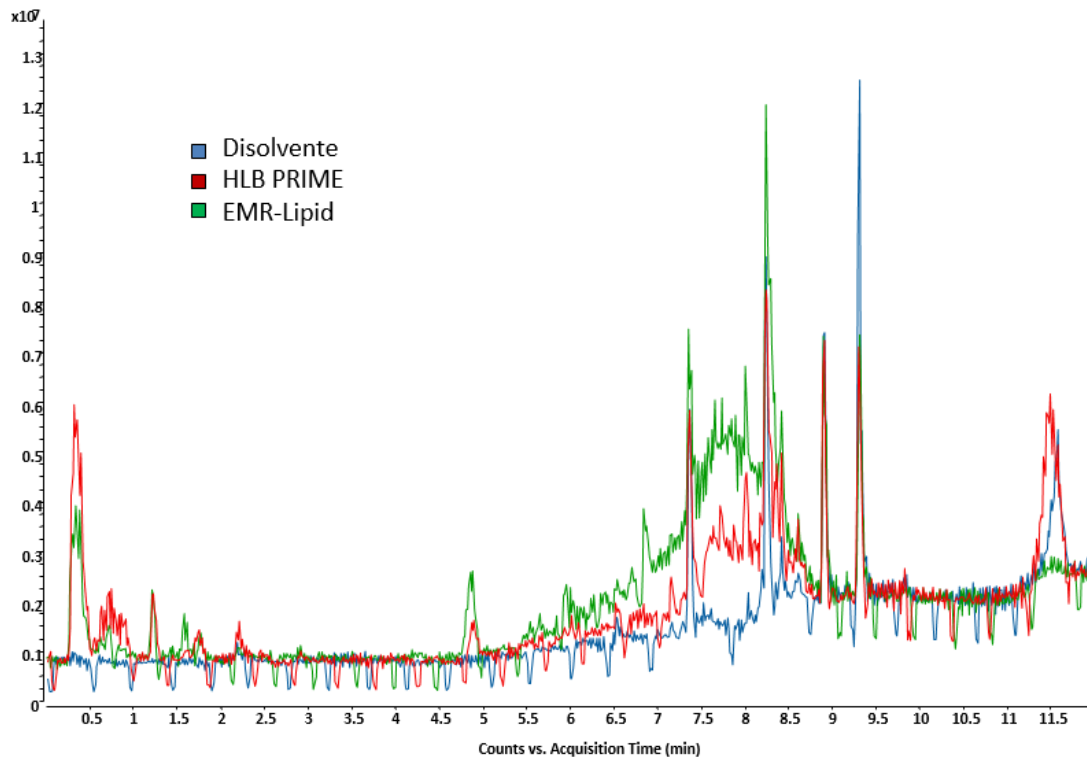
Con el fin de ver si el método ofrece un porcentaje de recuperación adecuado para todos los analitos, se calculó la media de los porcentajes de recuperación de todos los compuestos y de sus RSD (n=10), cuyos resultados pueden verse en la Tabla 6. Se obtiene como resultado que el porcentaje de recuperación medio para ambos tratamientos. Con el tratamiento Oasis HLB PRiME el porcentaje de recuperación medio es del 99,3% con una RSD media del 12,1%, mientras que el tratamiento con EMR-Lipid tiene un porcentaje de recuperación medio del 113,9% con una RSD media del 10,8%. Por tanto, se puede concluir que en ninguno de los tratamientos hay una pérdida de analitos, ya que se recuperan adecuadamente todos, aunque el primero ofrece una recuperación algo mejor que el segundo.

**Tabla 6.** Efecto matriz y porcentajes de recuperación calculados para los compuestos estudiados.

Compuesto	Efecto Matriz (%)		% Recuperación (%RSD)	
	HLB PRiME	EMR-Lipid	HLB PRiME	EMR-Lipid
Acetamiprid	9	13	110,8 (14,7)	79,0 (10,9)
Albendazole	1	20	118,8 (8,5)	132,3 (6,1)
Albendazole Sulfone	17	19	114,6 (11,2)	117,3 (22,2)
Altrenogest	0	8	85,4 (16,5)	168,1 (8,1)
Betamethasone	-2	-1	102,7 (11,0)	94,3 (6,0)
Clenbuterol	6	13	71,9 (11,8)	109,3 (6,5)
Cloxacillin	-7	6	110,9 (15,8)	81,3 (5,7)
Dapsone	-10	5	120,1 (13,4)	121,3 (5,3)
Diclofenac	13	21	92,6 (17,4)	140,3 (6,5)
Fenbendazole	9	24	114,4 (12,6)	106,5 (7,4)
Fenthion	9	24	91,5 (18,4)	128,4 (11,6)
Josamycin	-7	-10	96,6 (14,3)	91,2 (8,1)
Leucomalachite Green	-8	11	109,0 (7,6)	117,0 (12,5)
Levamisole	17	18	83,5 (9,3)	108,8 (13,9)
Lomefloxacin	-10	5	120,2 (6,8)	100,9 (16,8)
Malachite Green	0	4	85,2 (14,5)	115,7 (8,7)
Mebendazole	-2	-1	113,2 (12,9)	60,7 (9,1)
Orbifloxacin	-5	21	96,3 (7,0)	125,9 (5,8)
Phenylbutazone	19	9	91,7 (15,3)	91,4 (7,8)
Phenylthiouracil	4	10	102,9 (10,2)	115,7 (11,6)
Prednisolone	0	4	95,1 (11,1)	118,6 (20,7)
Roxithromycin	-9	-6	113,1 (12,2)	100,5 (6,7)
Sulindac	8	28	94,9 (13,8)	170,8 (8,3)
Thiabendazole	15	20	77,2 (9,3)	106,8 (36,8)
Trimethoprim	10	20	70,1 (6,2)	144,9 (7,1)
<b>MEDIA</b>	<b>3</b>	<b>11</b>	<b>99,3 (12,1)</b>	<b>113,9 (10,8)</b>

Como prueba adicional, y con el fin comprobar la eficacia de la etapa de limpieza de los dos tratamientos de muestra, se comparó el Total Ion Chromatogram (TIC) de ambos tratamientos. Para ello, se utilizó el equipo UHPCL-TOF-MS operando en modo full scan, con un modo de ionización positivo y con la misma columna y gradiente que fueron optimizadas para el anterior equipo.

Para la comparación, se requiere un blanco de disolvente, H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20), y un blanco de matriz de cada tratamiento. Pero los extractos de leche son recogidos en acetonitrilo en ambos tratamientos de muestra. Por lo que, para que los blancos de matriz estuvieran en el mismo disolvente que se ha optimizado, fue necesaria una evaporación el acetonitrilo bajo una corriente de Nitrógeno y una posterior reconstitución en ese disolvente. Para ello, se tomó una alícuota de 1 ml de cada extracto blanco y se introdujo en el evaporador a 40°C durante media hora. Después se reconstituyó en 1 ml de H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20). Tras vortear unos segundos, cada extracto se filtró con un filtro PTFE de 0,45 µm y se analizaron cromatográficamente. En la Figura 16, puede verse la superposición de los tres cromatogramas obtenidos. En ella se puede apreciar que el tratamiento con el que se consigue un extracto más limpio, es decir, el que presenta un TIC más parecido similar al del blanco de disolvente, es el tratamiento con el cartucho Oasis HLB PRiME. Esto supone una gran ventaja, ya que, cuanto más similar sea un blanco de matriz a un blanco estándar significará que habrá menos especies que coeluyan con los analitos de interés, con lo que el análisis cromatográfico y por espectrometría de masas tendrá menos interferentes.



**Figura 16.** Superposición de los TIC obtenidos mediante el análisis en modo full scan de los blancos en un equipo UHPLC-TOF-MS para el blanco de disolvente estándar H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20) (azul), blanco de matriz Oasis HLB (rojo) y blanco de matriz EMR-Lipid (verde).

Como conclusión, se puede afirmar que ambos tratamientos de muestra son muy efectivos para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en muestras de leche. Atendiendo a los resultados, se podría escoger cualquiera de los dos para la validación del método. Se decidió escoger el primer tratamiento Oasis HLB PRiME, atendiendo a razones económicas y medioambientales. Esto es, porque, al tener un menor número de etapas, el consumo de materiales, reactivos y tiempo es menor, lo que supone una ventaja económica a la hora de aplicar este método en cualquier empresa; además de ser un proceso más respetuoso con el medio ambiente, ya que la cantidad de residuos generados y disolventes utilizados es menor.

### **4.3. Validación del Método**

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la validación del método seleccionado (Oasis HLB PRiME) fueron el límite de detección, el límite de cuantificación y la precisión (intraday e interday). Estos parámetros aparecen en la Tabla 7, junto con el Límite Máximo de Residuo (MRL) permitido de cada compuesto en leche y su coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de la recta de calibrado en matriz con dilución 1:50.



Tabla 7. Parámetros de Validación del Método.

Compuesto	Intraday (% RSD)	Interday (% RSD)	R <sup>2</sup>	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	MRL (µg/kg)
Acetamiprid	2,5	10,2	1,0000	0,04	0,12	10
Albendazole	1,3	8,4	1,0000	0,02	0,06	100
Albendazole Sulfone	3,7	6,0	0,9999	0,05	0,17	100
Altrenogest	3,5	13,5	1,0000	0,06	0,20	10
Betamethasone	8,1	11,1	1,0000	0,37	1,22	0,30
Clenbuterol	3,8	7,8	1,0000	0,01	0,05	0,05
Cloxacillin	3,3	3,3	0,9999	0,12	0,39	30
Dapsone	1,8	8,5	1,0000	0,24	0,80	NO LEGISLADO
Diclofenac	4,4	7,7	0,9997	0,29	0,98	0,10
Fenbendazole	3,0	8,1	0,9996	0,05	0,16	10
Fenthion	7,8	7,8	1,0000	2,25	7,50	10
Josamycin	5,4	11,9	1,0000	0,25	0,82	NO LEGISLADO
Leucomalachite Green	8,1	14,3	1,0000	0,02	0,08	10
Levamisole	2,5	8,3	1,0000	0,13	0,44	NO LEGISLADO
Lomefloxacin	2,7	5,4	1,0000	0,31	1,02	NO LEGISLADO
Malachite Green	4,0	6,6	1,0000	0,01	0,03	10
Mebendazole	4,0	3,7	1,0000	0,01	0,04	NO LEGISLADO
Orbifloxacin	5,2	7,1	1,0000	0,09	0,31	NO LEGISLADO
Phenylbutazone	2,8	9,0	0,9999	0,44	1,47	NO LEGISLADO
Phenylthiouracil	8,9	7,6	1,0000	1,73	5,78	NO LEGISLADO
Prednisolone	6,0	10,9	1,0000	0,57	1,90	6
Roxithromycin	1,4	8,2	0,9997	0,08	0,26	NO LEGISLADO
Sulindac	6,2	3,8	1,0000	0,08	0,27	NO LEGISLADO
Thiabendazole	2,7	9,8	1,0000	0,09	0,31	100
Trimethoprim	2,6	8,2	1,0000	0,02	0,07	50

- **Precisión: Reproducibilidad y Repetibilidad.**

La precisión es el grado de concordancia entre una serie de resultados obtenidos al aplicar representativa e independientemente el mismo método a una muestra. Se evalúa mediante parámetros estadísticos, en este trabajo se utilizará la RSD.

La precisión tiene en cuenta dos factores:

- La Reproducibilidad (Intraday) tiene en cuenta la dispersión de los resultados de análisis independientes realizados en el mismo día. Se toma el nivel de 1 µg/Kg de la recta de calibrado en matriz con dilución final 1:50 y se analiza cromatográficamente 9 veces (n=9). Se obtuvo una RSD media de todos los analitos del 4%.
- La Repetibilidad (Interday) tiene en cuenta la dispersión de los resultados de análisis independientes realizados durante 3 días consecutivos. Se utilizó el mismo nivel que para el caso de la Reproducibilidad y también se

realizaron un total de 9 análisis (n=9). Se obtuvo una RSD media de todos los analitos del 8%.

En la Tabla 7 se muestran la RSD de todas las medidas de cada uno de los compuestos para la concentración de 1 µg/Kg. Como todas las RSD obtenidas en este estudio de precisión son menores del 20%, esto es que la dispersión entre los resultados es pequeña, quiere decir que el resultado obtenido con este método es estable y no sufre fluctuaciones al realizarse en momentos distintos, por tanto, el método se considera preciso. La reproducibilidad suele ser más baja que la repetibilidad ya que, al realizarse todos los análisis el mismo día, las condiciones son más similares entre ellos que si los análisis se realizan en días diferentes.

- **Límite de Detección (LOD) y Límite de Cuantificación (LOQ).**

El Límite de Detección (LOD) se define como la mínima concentración de analito que proporciona una señal que puede distinguirse del ruido de fondo. El Límite de Cuantificación (LOQ) es la menor concentración de analito que puede cuantificarse con suficiente fiabilidad. Los LOD y LOQ fueron calculados por el software Xcalibur a partir de la relación señal/ruido (S/N). El LOD es tres veces la relación S/N mientras que el LOQ es diez veces la relación S/N. Como puede observarse en la Tabla 7, los LOQ obtenidos para la mayoría de los compuestos fueron inferiores a los MRLs establecidos por la legislación vigente (Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión, 2009).

#### **4.4. Estudio de Muestras Reales**

Para terminar este trabajo se realizó el estudio de residuos de medicamentos veterinarios en 24 muestras de leche diferentes, las cuales pertenecían a marcas distintas. Además, se buscó la diversidad entre ellas para que tuvieran diferente contenido graso (enteras, semidesnatadas y desnatadas), contuvieran o no lactosa o estuviesen enriquecidas en calcio u omega 3. Se contó tanto con marcas tradicionales como con marcas blancas de leche de vaca y, también, con la representación de una leche de oveja. Las muestras se encuentran enumeradas en la Tabla 8 y fueron adquiridas en supermercados locales.

**Tabla 8.** Muestras de leche analizadas; E: entera; S: semidesnatada; D: desnatada.

Muestra	Marca	Muestra	Marca
0	Aliada E.	12	Milsani E.
1	Milbona Sin Lactosa D.	13	El Corte Inglés Sin Lactosa D.
2	Muuu E.	14	La Vaquera E.
3	Levasa E.	15	Hacendado E.
4	Eliges Sin Lactosa S.	16	Puleva Enriquecida en Calcio E.
5	Central Lechera Asturiana Sin Lactosa S.	17	El Corte Inglés Enriquecida en Calcio E.
6	Levasa S.	18	DIA E.
7	Alteza E.	19	Puleva Omega 3 Nueces D.
8	Pascual E.	20	Puleva Omega 3 Avena D.
9	Carrefour Discount E.	21	Puleva Omega 3 Almendras D.
10	Carrefour E.	22	Puleva E.
11	Covap E.	23	Gaza Leche de Oveja S.

Se tomó una alícuota de cada una de las muestras y se las sometió al tratamiento de muestra con los cartuchos Oasis HLB PRiME. Una vez obtenido el extracto, se le aplicó una dilución 1:10 y se filtró con un filtro de jeringa de membrana PTFE de 0,45 µm. Por último, se analizaron mediante UHPLC-MS/MS (QqQ).

Para la cuantificación se tuvo en cuenta, además de los parámetros de caracterización de cada compuesto, que el área de pico fuese significativamente mayor a la del blanco y que la relación entre las intensidades de los fragmentos de cuantificación y confirmación fuera la misma que en el calibrado en matriz.

Así, las muestras que dieron positivo en residuos de medicamentos veterinario en este estudio son las que se observan en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Positivos en residuos veterinarios en distintas marcas comerciales de leche.

Compuesto	Muestra	Concentración (µg/kg)	LOQ (µg/kg)	MRL (µg/kg)
Albendazol	Levasa Entera	0,35	0,06	100
	Milsani Entera	0,33	0,06	100
	El Corte Inglés Sin Lactosa Desnatada	0,41	0,06	100
	Hacendado Entera	0,82	0,06	100
Fenbendazol	Levasa Entera	0,49	0,16	10
	Alteza Entera	2,21	0,16	10
	Milsani Entera	0,44	0,16	10

## 5. CONCLUSIONES

Este Trabajo de Fin de Grado desarrolla una metodología completa para la detección de residuos de medicamentos veterinarios en leche. Evaluando la eficacia de los nuevos tratamientos de muestra que están apareciendo actualmente, con motivo del análisis multiresiduo y de la necesidad de la sociedad de contar con alimentos libres de estos compuestos para el consumo humano. Cabe destacar que la selección de tratamiento de muestra se basó en técnicas ampliamente estudiadas, SPE y QuEChERS, pero adaptadas al análisis de drogas veterinarias y utilizando nuevos materiales que proponen las casas comerciales para el análisis de estos analitos en matrices de origen animal. Cumpliendo con los siguientes objetivos de:

- 1) Optimizar un método cromatográfico para la detección y confirmación de medicamentos de uso veterinario. Además, la utilización de un equipo de UHPLC acoplado a un detector de espectrometría de masas en tándem (triple cuádruplo) hace posible la cuantificación de estos compuestos, ya que se trata de un equipo muy sensible, capaz de detectar concentraciones muy bajas.
- 2) Comprobar que las nuevas técnicas de tratamiento de muestra comerciales, cartuchos Oasis HLB PRiME y la metodología QuEChERS usando EMR-Lipid como sorbente en la etapa de limpieza, son adecuadas en el análisis multiresiduo para productos de uso veterinario. Puesto que cumplen las expectativas que asegura la casa comercial, retirando perfectamente la muestra de sustancias no deseadas e interferentes, sin que esto suponga una pérdida en la recuperación de los analitos. Esto se evidencia al recuperarse el 100% de los analitos propuestos en este trabajo, además de contar con un efecto matriz suave. Con lo cual, la elección de un tratamiento u otro para este fin, solo va a depender de la preferencia del analista y no de si con uno se obtienen mejores resultados que con el otro.
- 3) Validar el método cromatográfico con el tratamiento de muestra Oasis HLB PRiME. Comprobándose que, además de ser adecuado para el fin propuesto, es un método preciso, reproducible y estable ya que los resultados del análisis no dependen de otros factores externos a él, como diferentes horas o días o condiciones ambientales.
- 4) Obtener bajos límites de detección y cuantificación que hacen posible llegar a detectar compuestos con concentraciones de hasta de partes por trillón

(ng/Kg), niveles muy por debajo de los MRLs permitidos en la actualidad por la Unión Europea, que se encuentran a niveles de partes por billón ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ).

- 5) Analizar diferentes marcas de leche presentes en los supermercados. Los resultados indican que en cinco de ellas se han encontrado residuos de medicamentos veterinarios, ambos (Albendazol y Fenbendazol) pertenecientes a la familia de los benzimidazoles, usados como antihelmínticos. Aunque, gracias a que el método es capaz de cuantificarlos, se observa que están por debajo del límite permitido, por lo que no entrañan un peligro para la salud del consumidor.
- 6) Confirmar la hipótesis inicial de que las marcas blancas de leche tienen una mayor cantidad de residuos veterinarios. Ya que a la vista de los resultados, de las cinco marcas que han dado positivo en estos residuos, cuatro de ellas corresponden a productos de marca blanca.

Para terminar, al comprobar que los datos obtenidos con estos nuevos tratamientos son comparables a los que se venían estudiando, se trata de un trabajo con gran impacto. Abriéndose el camino hacia dos campos:

- El ámbito empresarial.

Son técnicas sencillas, rápidas y eficaces; con lo que podría ser una alternativa mejor a los tratamientos de muestra utilizados anteriormente. Además, al tratarse de técnicas comerciales, su implantación en cualquier laboratorio es muy simple, ya que pueden ser adquiridos con facilidad en la casa comercial de cada uno de ellos. Al ser los dos igualmente adecuados, la empresa solo tendrá que tener en cuenta razones de disponibilidad de materiales y de sostenibilidad del proceso, es decir, no debe preocuparse de cuál cubre mejor su necesidad, sino que solo debe sopesar razones económicas y medioambientales.

- Investigación.

Al tratarse de materiales relativamente nuevos, no se dispone de una gran cantidad de estudios sobre la utilidad de estas dos técnicas. Por lo que, este trabajo puede servir como base para estudios posteriores que quieran aplicar estos tratamientos de muestra en el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en leche o en otras matrices alimentarias.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Luiz, M. M.; Vidal, J. L. M.; Romero-González, R. & Frenich, A. G. (2008). *Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1205(1-2), 10-16.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, D. & Schenck, F. J. (2003). *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and «dispersive solid-phase extraction» for the determination of pesticide residues in produce*. Journal of AOAC International, 86(2), 412-431.
- Berendsen, B. J. A.; Stolker, L. A. A. M. & Nielen, M. W. F. (2013). *Selectivity in the sample preparation for the analysis of drug residues in products of animal origin using LC-MS*. Trends in Analytical Chemistry, 43, 229-239.
- [31] Gates, P. University of Bristol. School of Chemistry. Mass Spectrometry Facility. (2014). *Quadrupole Mass Analysis*. Disponible en web: <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/quadrupole.xhtml>
- Gentili, A.; Perret, D & Marchese, S. (2005). *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of veterinary drugs in animal-food products*. Trends in Analytical Chemistry, 24(7), 704-733.
- Huang D.; Tran K. V. & Young, M. S. (2015). *A Simple Cleanup Protocol Using a Novel SPE Device for UHPLC-MS / MS Analysis of Multi-Residue Veterinary Drugs in Milk*. Waters Technical Note.
- Kim, D.; Choi, J. O. ; Kim, J. & Lee, D. W. (2003). *Application of a Polymeric Solid Phase Extraction for the Analysis of Sulfonamides in Milk by LC/MS*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 26(7), 1149-1159.
- 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.
- Kinsella, B.; O'Mahony, J.; Malone, E.; Moloney, M.; Cantwell, H.; Furey, A. & Danaher, M. (2009). *Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis*. Journal of Chromatography A, 1216(46), 7977-8015.

- Koesukwiwat, U.; Jayanta, S. & Leepipatpiboon, N. (2007). *Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in Bovine's milk*. Journal of Chromatography A, 1149(1), 102-111.
- Márquez-Lara, D. (2007). *Resistencia a Los Antihelmínticos en Nematodos de Rumiantes Y Estrategias Para Su Control*. Corpoica.
- Martínez Vidal, J. L.; Frenich, A. G.; Aguilera-Luiz, M. M. & Romero-González, R. (2010). *Development of fast screening methods for the analysis of veterinary drug residues in milk by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397(7), 2777-2790.
- McGee, H. (2007). *On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen*. Environment International. Scribner.
- Moreno-González, D. (2013). Tesis Doctoral: *Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y agua*.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) & Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). *CODEX ALIMENTARIUS. Maximum residue limits (MRLs) and risk management recommendations (RMRs) for residues of veterinary drugs in foods*.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Portal Lácteo. (2017). *Leche y productos lácteos*. Disponible en web:  
[http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/#.WS0\\_0Gjyg2x](http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/es/#.WS0_0Gjyg2x)
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Centro de Prensa. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Disponible en web:  
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). Centro de Prensa. (2016). *Resistencia a los antimicrobianos*. Disponible en web:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Ortelli, D.; Cognard, E.; Jan, P. & Edder, P. (2009). *Comprehensive fast multiresidue screening of 150 veterinary drugs in milk by ultra-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 877(23), 2363-2374.
- Seija, V. & Vignoli, R. (2006). *Temas de bacteriología y Virología Médica*. Capítulo

34. *Principales grupos de antibióticos.*

- Stolker, A. A. M.; Rutgers, P.; Oosterink, E.; Lasaroms, J. J. P.; Peters, R. J. B.; Van Rhijn, J. A. & Nielen, M. W. F. (2008). *Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UHPLC-ToF-MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391(6), 2309-2322.
- Stolker, A. A. M.; Zuidema T. & Nielen, M. W. F. (2007). *Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents*. Trends in Analytical Chemistry, 26(10), 967-979.
- Stubbings, G. & Bigwood, T. (2009). *The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach*. Analytica Chimica Acta, 637(1-2), 68-78.
- Turnipseed, S. B.; Andersen, W. C.; Karbiwnyk, C. M.; Madson, M. R. & Miller, K. E. (2008). *Multi-class, multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometry screening and confirmation methods for drug residues in milk*. Rapid communications in mass spectrometry, 22, 1467-1480.
- Turnipseed, S. B.; Storey, J. M.; Clark, S. B. & Miller, K. E. (2011). *Analysis of veterinary drugs and metabolites in milk using quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(14), 7569-7581.
- Unión Europea. (2002). *Decisión de la Comisión 2002/657/CE*.
- Unión Europea. (2003). *Decisión de la Comisión 2003/181/CE*.
- Unión Europea. (2003). *Reglamento (CE) N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo*.
- Unión Europea. (2005). *Reglamento (CE) N° 396/2005 del Consejo*.
- Unión Europea. (1990). *Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo*.
- Unión Europea. (2009). *Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión*.
- Valsecia, M. E. & Malgor, L. A. (2000). *Farmacología Médica*. Volumen 4. Capítulo 7. *Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)*. Springer.
- Vargas-Mamani, M. C.; Reyes-Reyes, F. G. & Rath, S. (2009). *Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD*. Food Chemistry, 117(3), 545-552.
- Wang, J. & Leung, D. (2012). *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 Testing and Analysis, 4(SUPPL.1), 103-111.

- Zhang, Y.; Li, X.; Liu, X.; Zhang, J.; Cao, Y.; Shi, Z. & Sun, H. (2015). *Multi-class, multi-residue analysis of trace veterinary drugs in milk by rapid screening and quantification using ultra-performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry.* Journal of Dairy Science, 98(12), 8433-8444.
- Zhao, L. & Lucas, D. (2015). *Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC / MS / MS Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal — Lipid.* Agilent Technologies Application Note.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Abreviaturas

<b>AECOSAN</b>	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
<b>AINE</b>	Antiinflamatorios no esteroideos
<b>d-SPE</b>	Extracción en Fase Sólida Dispersiva
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
<b>EMR</b>	Enhanced Matrix Removal
<b>ESI</b>	Ionización por electrospray
<b>GC-MS</b>	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
<b>HLB</b>	Hidrophilic Lipophilic Balance
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
<b>IP</b>	Puntos de Identificación
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry

<b>LC-MS</b>	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas
<b>LLE</b>	Extracción Líquido-Líquido
<b>LOD</b>	Límite De Detección
<b>LOQ</b>	Límite De Cuantificación
<b>MeCN / ACN</b>	Acetonitrilo
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MRL</b>	Límite Máximo de Residuo
<b>MRM</b>	Multiple Reaction Monitoring
<b>MRPL</b>	Límites Mínimos de Funcionamiento
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PCB</b>	Bifenilos policlorados
<b>PRIME</b>	Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use
<b>PSA</b>	Amina Primaria/Secundaria
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>Q</b>	Cuadrupolo
<b>QqQ</b>	Triple cuadrupolo
<b>QuEChERS</b>	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
<b>RAM</b>	Resistencia a los antimicrobianos
<b>rpm</b>	Revoluciones Por Minuto
<b>RSD</b>	Desviación estándar
<b>SPE</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>TIC</b>	Total Ion Chromatogram
<b>TLC</b>	Cromatografía de Capa Fina
<b>TOF</b>	Tiempo De Vuelo
<b>UE</b>	Unión Europea
<b>UHPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia
<b>UHPLC-MS/MS</b>	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia acoplada a Espectrometría de Masas
<b>UHPLC-TOF-MS</b>	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia con detector de Tiempo De Vuelo