



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**ANÁLISIS MULTIRESIDUO DE
MEDICAMENTOS VETERINARIOS
EN MUESTRAS DE LECHE
MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE
LÍQUIDOS DE ELEVADA
EFICACIA ACOPLADA A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS
EN TÁNDEM**

Alumna: Castilla Fernández, Delia

Tutor/a: Prof. Dr. Juan F. García Reyes

Tutor/a: Prof. Dr. David Moreno González

Departamento: Química Física y Analítica

Julio, 2018



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

**MÁSTER EN
AVANCES EN SEGURIDAD DE LOS ALIMENTOS**

**Análisis multiresiduo de
medicamentos veterinarios en
muestras de leche mediante
cromatografía de líquidos de
elevada eficacia acoplada a
espectrometría de masas en tándem**

Departamento: Química Física y Analítica

Trabajo de Fin de Máster presentado por:

Delia Castilla Fernández

Jaén, Julio de 2018

Fdo. Delia Castilla Fernández

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Resistencia a los Medicamentos.....	4
2.2. Legislación referente a medicamentos veterinarios en la Unión Europea ..	7
2.3. Definición y Familias de Medicamentos de Uso Veterinario.....	12
2.4. Antecedentes.....	14
2.4.1. <i>Tratamiento de muestra.....</i>	<i>18</i>
2.4.2. <i>Técnicas cromatográficas.....</i>	<i>23</i>
2.5. Objetivos.....	28
3. EXPERIMENTAL	28
3.1. Materiales y Reactivos	28
3.2. Tratamiento de Muestra.....	29
3.2.1. <i>Extracción en Fase Sólida (HLB PRIME).....</i>	<i>30</i>
3.2.2. <i>Extracción en Fase Sólida Dispersiva (EMR-Lipid).....</i>	<i>32</i>
3.3. Instrumentación	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1. Optimización del Método UHPLC-MS/MS	36
4.2. Evaluación del Tratamiento de Muestra	46
4.3. Validación del Método.....	52
4.4. Estudio de Muestras Reales	57
5. CONCLUSIONES	60
6. BIBLIOGRAFÍA	61
7. ANEXOS.....	64
7.1. Abreviaturas	64

1. RESUMEN

El uso de antimicrobianos en la alimentación animal se está convirtiendo en un problema mundial relacionado con la inocuidad de los alimentos y la salud pública. Este trabajo propone un método de análisis multiresiduo para la detección y cuantificación de medicamentos veterinarios en leche para asegurar el cumplimiento de la legislación vigente. Se determinaron 66 compuestos pertenecientes a diferentes clases de drogas veterinarias, entre las que destacan: macrolidos, sulfonamidas, quinolonas, penicilinas, AINEs, cefalosporinas, corticosteroides, nitroimidazoles, benzimidazoles, β -agonistas, entre otros. 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 Cuadrupolo (QqQ) equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo positivo. Estos compuestos fueron caracterizados a través de la masa del ión precursor ($[M+H]^+$), las 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 en Fase Sólida Dispersiva 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

The antibiotic usage in food animals is indeed becoming a global issue associated with food safety and public health. A multiresidue method has been proposed for the determination of veterinary drugs in milk, to assure that the legal limits are being respected. A total of 66 veterinary drugs investigated belonged to macrolides, sulfonamides, quinolones, penicillins, NSAIDs, cephalosporins, corticosteroids, nitroimidazoles, benzimidazoles, β -agonists, among others. They were determined 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, Dispersive Solid Phase Extraction with the sorbent EMR-Lipid. In order to check the presence of veterinary drugs in real samples 24 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, la seguridad alimentaria para garantizar que los alimentos sean inocuos se vuelve especialmente importante. Por lo que las autoridades deben hacer hincapié en la calidad de los productos que llegan a los ciudadanos y en que éstos no contengan sustancias que puedan perjudicar su salud. La administración a animales destinados a la producción de alimentos puede dejar residuos en los productos que llegan a los consumidores, pudiendo hacer que se desarrollen reacciones alérgicas en algunos individuos, además de que algunos de ellos pueden tener posibles efectos tóxicos o carcinogénicos. Por tanto, 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.

2.1. Resistencia a los medicamentos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) alerta que una de las mayores amenazas de la salud mundial la seguridad alimentaria y el desarrollo es la resistencia a los antimicrobianos (RAM) (OMS, Centro de Prensa, 02/2018). Dicha resistencia puede afectar a cualquier persona, sea cual sea su edad o el país en el que viva, y que en la

actualidad causa alrededor de 250 000 fallecimientos cada año (OMS, Centro de Prensa, 09/2017). Esta organización viene alertando de esta problemática desde hace una década, ya que 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 realizan sin la supervisión profesional (OMS, Centro de Prensa, 02/2017). Como consecuencia, los medicamentos se están volviendo ineficaces y por tanto las infecciones van a ser más persistentes, lo que conlleva un aumento en el coste de la atención sanitaria y del número de muertes (OMS, Centro de Prensa, 2016). Muertes por infecciones bacterianas multirresistentes que, en 2050, superarán al número de muertes por cáncer (OMS, 01/2017).

El pasado año, se publicó la primera lista de antibióticos requeridos con urgencia (OMS, Centro de Prensa, 02/2017); 12 clases de patógenos prioritarios, algunos de ellos causantes de infecciones frecuentes como la neumonía o las infecciones en las vías urinarias, que son cada vez más resistentes a los antibióticos existentes y requieren con urgencia nuevos tratamientos. Ya que la mayoría de los fármacos que se están desarrollando son modificaciones de clases de antibióticos ya existentes, como nuevas generaciones de cefalosporinas y quinolonas, las soluciones que ofrecen son solamente a corto plazo. El informe “Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis”, confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos. En él se mencionan 51 nuevos antibióticos y biofármacos en desarrollo clínico que se podrían utilizar para tratar infecciones causadas por los patógenos resistentes a los antibióticos. De los cuales sólo 8 de ellos se han considerado como alternativas válidas al problema.

Dado que una parte fundamental del problema es que la resistencia a los antibióticos puede producirse por el consumo de alimentos de origen animal, a los cuales se les hubiese suministrado un medicamento y el tiempo de espera no hubiera sido el suficiente como para asegurar que el alimento está libre de cualquier residuo del medicamento. 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. Con el objetivo de controlar la resistencia y reducir la exposición a los antimicrobianos la OMS ha redactado en 2017 una serie de directrices sobre el uso de estos compuestos en animales destinados a la producción de alimentos (OMS, 09/2017), entre las que destacan:

- Reducción general del uso de todas las clases de antimicrobianos de importancia médica.

Ya que muchos antimicrobianos utilizados en estos animales son idénticos o están estrechamente relacionados con los utilizados en el ser humano.

- Restricción completa de los antimicrobianos para estimular el crecimiento.

Aunque muchos países ya han adoptado esta medida, por ejemplo, esta práctica fue prohibida por la Unión Europea en 2006 (Reglamento (CE) Nº 1831/2003 del Consejo, 2003), siguen existiendo países que la permiten.

- Restricción completa de los antimicrobianos con el fin de prevenir enfermedades infecciosas que todavía no han sido diagnosticadas clínicamente.

Solo se debería administrar antibióticos a animales sanos para prevenir una enfermedad si esta ha sido diagnosticada en otros animales de la misma cabaña o población de peces.

- Antimicrobianos considerados de importancia crítica y de máxima prioridad para la medicina humana no deben utilizarse en el tratamiento de animales diagnosticados clínicamente ni para evitar su propagación de esas enfermedades a otros animales.

Debido a que estos antibióticos suelen ser el tratamiento de último recurso o forman parte de una serie limitada de tratamientos de los que se dispone para tratar infecciones bacterianas graves en humanos.

- Los antimicrobianos que no se utilizan actualmente en la producción de alimentos (animales o vegetales) no deberán utilizarse en el futuro para ese fin.

2.2. Legislación referente a medicamentos veterinarios en la Unión Europea

En vista de la problemática expuesta, se exigen unos requerimientos legales que regulen todo residuo de medicamento veterinario en los alimentos de consumo humano. A parte de Organizaciones internacionales, como la OMS, que tratan de concienciar a la sociedad de la importancia de los alimentos que tomamos y de que éstos 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, plaguicidas 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.

Actualmente, y 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, en el anexo I, se enumeran las sustancias en las que no es necesario restringir su uso y las que tienen establecido un Límite Máximo de Residuo (MRL, de

sus siglas en inglés), para cada matriz de origen animal: grasa, músculo, piel, hígado, riñón, leche y huevos. En el anexo II, aparecen las sustancias para las cuales no puede establecerse un MRL, es decir, sustancias prohibidas para su uso en animales. Dado que el reglamento actual no ofrece mucha información sobre en qué consiste la fijación de los límites máximos de residuo, es necesario acudir al Reglamento (CEE) Nº 2377/90 para obtener más información. Este surgió debido a los avances científicos en la época, con técnicas más sensibles para poder detectar sustancias a niveles traza y fijaba los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, como carne, pescado, huevos, leche y miel.

En el artículo 1 de este reglamento se definen dos conceptos fundamentales que han llegado hasta hoy día en el control de los medicamentos de uso veterinario. Por una parte, se define el límite máximo de residuo, que es el contenido máximo de residuos de un medicamento veterinario, expresado en $\mu\text{g kg}^{-1}$ sobre el peso del producto en fresco, reconocido como admisible en un producto alimenticio dentro de la Comunidad.

En los artículos 2, 3, 4 y 5 se describe el contenido de los anexos incluidos en este reglamento, en los cuales se enumeran 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. Los límites máximos provisionales de residuos se aplicarán por un período de tiempo definido, que no excederá de cinco años. En circunstancias excepcionales, podrán establecerse, límites máximos provisionales de residuos para una sustancia farmacológicamente activa que no se haya utilizado previamente en medicamentos veterinarios en la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento, siempre que no existan razones para suponer que los residuos de las sustancias de que se trate constituyen un riesgo para la salud
- Anexo IV: Sustancias para las que no puede establecerse ningún MRL, ya que son sustancias prohibidas. Por lo cual, queda prohibido, administrar las sustancias enumeradas en este anexo a animales productores de alimentos.

En los artículos 6, 7 y 8 se hace referencia a la inclusión de una sustancia que vaya a utilizarse como medicamento veterinario y que no aparezca en los anexos I, II o III. Para ello, se presentará una solicitud para la fijación de un límite máximo de residuo a la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos, la cual este reglamento denomina La Agencia. Y será la encargada de evaluar las solicitudes presentadas y elaborar un dictamen definitivo, el cual irá acompañado de un informe que contendrá una evaluación, realizada por el Comité de La Agencia, de la seguridad de la sustancia y una exposición de las razones que motiven sus conclusiones. El dictamen definitivo será enviado al solicitante y a la Comisión, la cual preparará un proyecto de medidas teniendo en cuenta la legislación comunitaria.

El artículo 9 establece que cualquier Estado miembro puede suspender el reglamento temporalmente y en su territorio cuando, resultado de una evaluación científica, se considere que es necesario modificar alguna de las disposiciones de cualquiera de los anexos. En esta situación la Comisión debe examinar con la mayor brevedad posible los motivos y, si fuera necesario, modificar alguna de las disposiciones existentes en los anexos.

Los artículos 13 y 14, hacen referencia al carácter europeo del reglamento, es decir, al ser de aplicación en los Estados Miembros Europeos todos deben respetarlo, lo cual favorece la globalización y la libre circulación de productos en la comunidad. El artículo 13 menciona que ningún estado puede impedir la entrada ni prohibir ningún producto de origen animal producido en otro estado que contenga un residuo siempre que no sobrepase el MRL o que no contenga una sustancia prohibida. El artículo 14 establece que queda prohibido utilizar una sustancia como medicamento veterinario que no aparezca en este reglamento (en los anexos I, II y III) o que, en su defecto, aparezca en el anexo IV.

Cabe destacar que, en este reglamento, como se dice en el artículo 15, no se encuentran reguladas las sustancias que causan un efecto hormonal, tireostático y sustancias con efecto anabolizante. Posteriormente, en la Directiva 96/23/CE del Consejo se prohibieron determinadas sustancias con estos efectos. 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
• Estilbenos (sus derivados, sus sales y ésteres). • Agentes anti-tiroideos. • Esteroides. • Lactonas de ácido resorcílico (incluyendo Zeranol). • β-agonistas. • Compuestos incluidos en el Anexo IV del Reglamento (CEE) nº 2377/90.

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

Grupo B: Drogas veterinarias y contaminantes
• Sustancias antibacterianas (incluidas sulfamidas y quinolonas). • Otras drogas veterinarias: - Antihelmínticos. - Anticoccidiostáticos (incluyendo nitroimidazoles). - Carbamatos y piretroides. - Tranquilizantes. - Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). - Otras sustancias farmacológicamente activas. • Otras sustancias y contaminantes medioambientales: - Compuestos organoclorados (incluidos los PCBs). - Compuestos organofosforados. - Elementos químicos. - Micotoxinas. - Colorantes. - Otros.

Otro aspecto a tener en cuenta, es qué sustancias pueden utilizarse en la Unión Europea como medicamento veterinario. La Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo dice que no se pondrá en el mercado ningún medicamento veterinario que no haya sido previamente autorizado, bien por las autoridades nacionales o comunitarias responsables en la materia. También esta directiva hace hincapié en la necesidad de especificar que los productos alimenticios de consumo humano no pueden proceder de animales que se hayan utilizado en pruebas clínicas de medicamentos veterinarios, salvo si se hubiera fijado un nivel máximo de residuos dicho medicamento. Además, se definen dos conceptos importantes en este campo. Se dice que un Medicamento Veterinario es toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales. También define Tiempo de Espera como el período de tiempo necesario entre la última administración del medicamento veterinario a un animal en las condiciones normales de empleo y la obtención de productos alimenticios que procedan de dicho animal, para garantizar que dichos productos alimenticios no contengan residuos en cantidades que superen los límites

máximos fijados. Es de extrema importancia que se respeten los tiempos de espera para asegurar que los alimentos de origen animal no contengan residuos de estos compuestos. Esta Directiva establece que, a no ser que el medicamento utilizado indique un período de espera para las especies de que se trate, no debe ser inferior al período de espera especificado para cada alimento:

- Huevos: 7 días.
- Leche: 7 días.
- Carne de aves de corral y mamíferos, la grasa y los menudillos incluidos: 7 días.
- Carne de pescado: 500 gramos/día

El Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo también pone de manifiesto que no se pueden utilizar otros medicamentos de uso veterinario que no estén recogidos en la legislación vigente. Y establece procedimientos comunitarios para la fijación de los MRLs de las sustancias farmacológicamente activas en alimentos de origen animal. Insiste en que una sustancia farmacológicamente activa puede utilizarse en animales productores de alimentos solamente si ha sido objeto de una evaluación favorable y que se establecen límites máximos de residuos para esta sustancia cuando se consideran necesarios para proteger la salud humana. Por lo que para la comercialización de cualquier sustancia que quiera administrarse a los animales productores de alimentos como medicamento debe ser objeto de un dictamen de La Agencia.

Por otra parte, 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 los contaminantes en alimentos, 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 (IPs) 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. 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 $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$.

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 macrolidos, sulfonamidas, quinolonas, penicilinas, AINEs, cefalosporinas, corticosteroides, nitroimidazoles, benzimidazoles, β -agonistas, 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, las tres familias de antibióticos que más representación tienen en este trabajo son: penicilinas, quinolonas y macrólidos.

Las penicilinas son compuestos β -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).

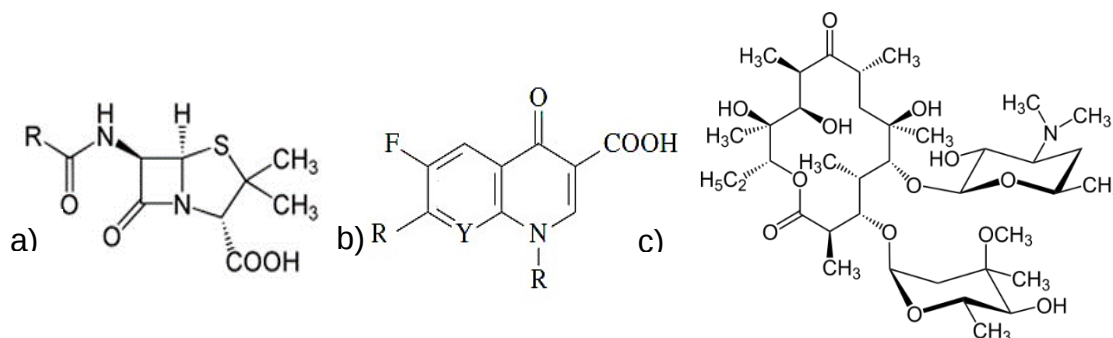


Figura 1. a) Estructura básica de las penicilinas. b) Estructura básica de las fluoroquinolonas. c) Estructura de la Eritromicina.

• 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.

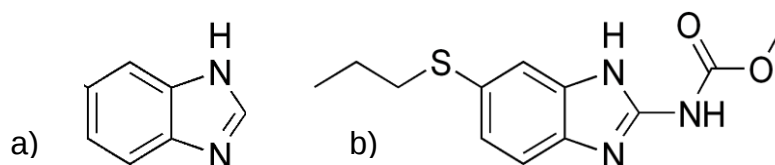


Figura 2. a) Estructura básica de los benzimidazoles. b) Estructura del Albendazol.

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

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 ciclooxygenasa 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).

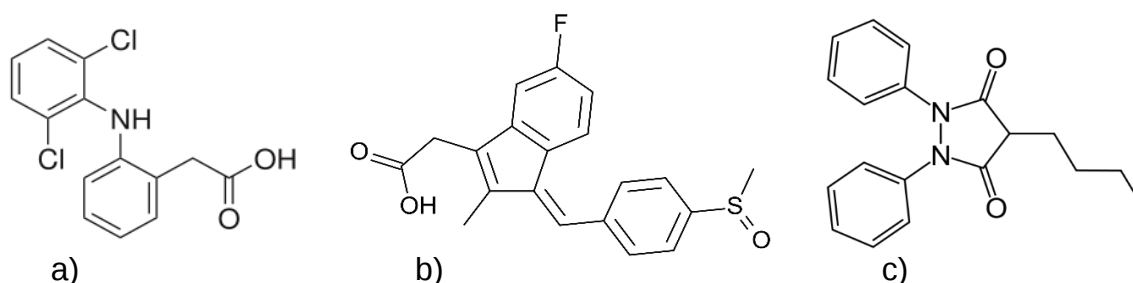


Figura 3. Antiinflamatorios no esteroideos. Ácidos: a) Diclofenaco; b) Sulindac.
No ácidos: c) Fenilbutazona.

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 $\mu\text{g kg}^{-1}$. 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 (IUPAC, 1997). 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 en leche. El escoger esta muestra para el estudio es debido a que es uno de los alimentos de origen animal más completos. Además de que 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). 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 hasta la actualidad el análisis multiresiduo de medicamentos veterinarios en muestras de leche.

Tabla 3. Evolución del análisis multiresiduo de medicamentos veterinarios en muestras de leche

Número de Analitos	Extracción	Purificación	Sistema de Detección	Tiempo de análisis	Referencia
101	LLE: MeCN	SPE: StrataX column	UHPLC-TOF-MS Columna BEH C ₁₈ . Fase móvil A: H ₂ O (0.001% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN (0.001% Ác. Fórmico)	8.5 min	Stolker, A. A. M. et al., 2008
25	LLE: MeCN	SPE: Oasis HLB. Evaporación del dvte. Ultrafiltración: Microcon YM-30 centrifugal filter	HPLC-MS/MS (QqQ) Columna YMC-AC reversed phase. Fase móvil A: H ₂ O (0.1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN	21 min	Turnipseed, S. B. et al., 2008
150	LLE: MeCN (1% Ác. Fórmico)	Ultrafiltración: Microcon cut-off membrane 3kD	UHPLC-TOF-MS Columna BEH C ₁₈ . Fase móvil A: H ₂ O (0.1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN (0.1% Ác. Fórmico)	9 min	Ortelli, D. et al., 2009
47	LLE: H ₂ O (20% TCA) + McIlvaine buffer	SPE: Oasis HLB. Evaporación del dvte. Disolución en 20% de MeCN en agua con 0.2% Ác. Fórmico.	HPLC-MS/MS (QqQ) Columna AQUA C ₁₈ . Fase móvil A: H ₂ O (0.2% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN (0.2% Ác. Fórmico)	25 min	Bohm, D.A. et al., 2009
38	QueChERS: MeCN +NaCl + Mg ₂ SO ₄	d-SPE (QueChERS): Sorbente C ₁₈ + PSA + Mg ₂ SO ₄	HPLC-MS/MS (QqQ) Columna Prodigy C ₁₈ . Fase móvil A: H ₂ O (25 mM Formiato Amónico) Fase móvil B: MeCN:MeOH 50:50 (12.5 mM Formiato Amónico)	15.5 min	Kinsella B., Lehotay S. J., et al., 2009

Tabla 3. Evolución del análisis multiresiduo de medicamentos veterinarios en muestras de leche (continuación)

Número de Analitos	Extracción	Purificación	Sistema de Detección	Tiempo de análisis	Referencia
21	QuEChERS: MeCN (1% Ác. Fórmico) + 0.1M de Na₂EDTA en H₂O + MgSO₄ Anhidro + Acetato de Sodio. Filtración: Millex-GN nylon filter	No clean up	UHPLC-MS/MS (QqQ) Columna Acquity UHPLC BEH C₁₈ Fase móvil A: H₂O (0.05% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeOH	3 min	Martínez-Vidal, J.L. et al., 2010
59	QuEChERS: MeCN (1% Ác. Acético) + EDTA + MgSO₄ Anhidro + Acetato de Sodio Anhidro. Evaporación del dvte. Redisolver en MeCN y Acetato de Amonio	No clean up	UHPLC-TOF-MS Columna Acquity UHPLC BEH C₁₈ Fase móvil A: H₂O (0.1% ácido fórmico) + 10mM de Formiato de Amonio Fase móvil B: MeCN	14 min	Wang, J. & Leung, D., 2012
90	QuEChERS: MeCN (1% Ác. Acético) + NaCl + Na₂SO₄	d-SPE (QuEChERS): Sorbente C₁₈ Evaporación del dvte. Disolución en 25% de MeCN en agua. Filtración: 0.22 µm PTFE filter	UHPLC-TOF-MS Columna Acquity UHPLC BEH C₁₈ Fase móvil A: H₂O (0.1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN UHPLC-MS/MS (QqQ) Waters XBridge MS C₁₈ Fase móvil A: H₂O Fase móvil B: MeCN (0.1% Ác. Fórmico)	26.1 min	Zhang, Y et al., 2015
25	LLE: MeCN	Retirada de lípidos con n-hexano (x2)		9.5 min	Li, J. et al., 2018
65	QuEChERS: MeCN (3.35% Ác. Fórmico) + NaCl + Na₂SO₄ + Acetato de Sodio Anhidro.	d-SPE (QuEChERS): Sorbente C₁₈ + PSA + Na₂SO₄ Anhidro Evaporación del dvte. Disolución en 20% de MeCN en agua. Filtración: 0.2 µm PTFE filter	UHPLC-MS/MS (QqQ) Columna Acquity UPLC CORTECS reversed phase. Fase móvil A: H₂O (0.1% Ác. Fórmico) Fase móvil B: MeCN (0.1% Ác. Fórmico)	20 min	Zhou, J. et al., 2018

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 comúnmente empleados 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.

A pesar de estas aproximaciones, como el uso de disolventes de naturaleza acuosa con ajuste de pH (Bohm, D.A. et al., 2009) o intentando utilizar sólo acetonitrilo para precipitar las proteínas (Li, J. et al., 2018), debido a la demanda de métodos multiresiduo capaces de extraer compuestos con propiedades muy dispares, la extracción líquido-líquido muchas veces 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 último tipo de cartuchos reciben diferentes nombres, StrataX u Oasis HLB “Hydrophilic-Lipophilic Balanced”, dependiendo la casa comercial, y son ampliamente empleados para el análisis de multiresiduo de medicamentos veterinarios (Stolker, A. A. M. et al., 2008; Turnipseed, S. B. et al., 2011; Bohm, D.A. et al., 2009). 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).

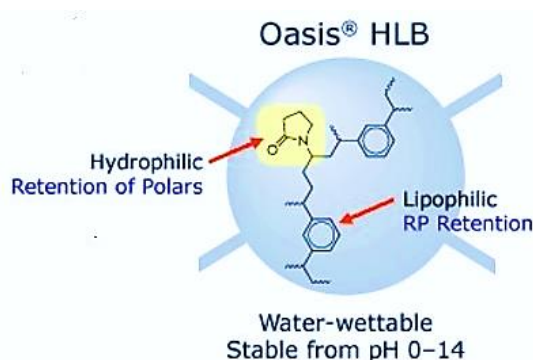


Figura 4. Estructura del sorbente polimérico HLB. *Imagen obtenida de la página web de la casa comercial Waters.*

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 β -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 plaguicidas 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, en su aplicación en matrices alimentarias. La adaptación de esta metodología al análisis de medicamentos veterinarios cada vez va teniendo más importancia como alternativa a los anteriores tratamientos de muestra; y, siendo ampliamente estudiada para el análisis multiresiduo de estos compuestos en leche. Esta metodología consta de 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 β -lactámicos ni quinolonas (Zhang, Y. et al., 2015). También se suele añadir ácido etilendiaminotetraacético EDTA para mejorar la recuperación de analitos como fluoroquinolonas, macrólidos y, sobre todo, de tetraciclinas. Estas últimas tienden formar complejos con cationes divalentes como Ca^{+2} y Mg^{+2} (Aguilera-Luiz, M. M. et al., 2008), lo cual no favorece la extracción. Como

el EDTA es un complejo que forma ligandos fuertes con metales, esto evita que sean los analitos los que formen complejos con los metales. Además, el cuidado de que el pH esté en torno a 5 también afecta a la estabilidad de los complejos de EDTA con metales divalentes, ya que estos son muy estables en disoluciones ligeramente ácidas. 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 o, 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 C₁₈ como sorbente, ya que al ser menos polar ayuda a la eliminación de compuestos lipofílicos de la matriz. El C₁₈ puede utilizarse solo (Zhang, Y. et al., 2015), o combinado con PSA (Kinsella B., Lehotay S. J., et al., 2009; Zhou, J. et al., 2018), 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).

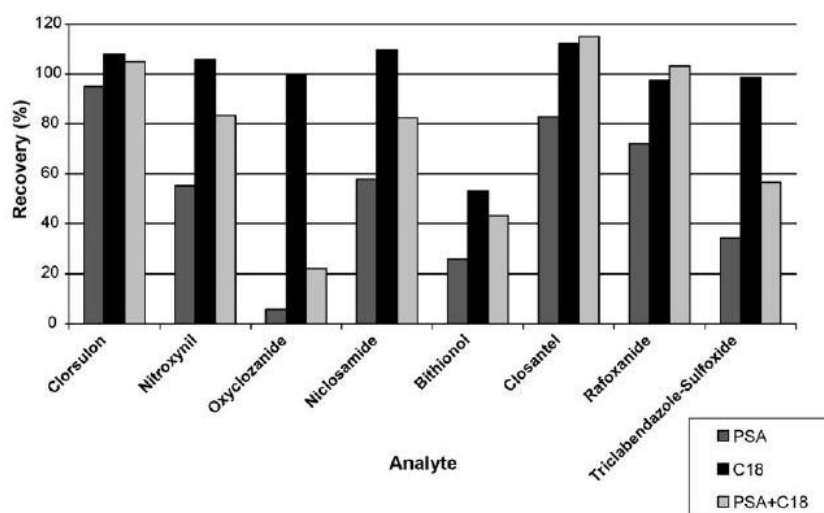


Figura 5. Recuperación de 8 analitos en leche dependiendo del sorbente utilizado en la técnica de purificación d-SPE. (Kinsella, B.; Lehotay, S. J. et al. *New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. 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 Elevada 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 plaguicidas, ya que la diversidad de las propiedades químicas de los medicamentos veterinarios es mucho mayor (Stubblings, 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 μm en HPLC a ser inferior a 2 μm 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 separativa por lo que se necesita un detector para poder identificar y cuantificar los compuestos. En la actualidad, según exige la Unión Europea para la detección y cuantificación de medicamentos veterinarios (Decisión de la Comisión 2002/657/EC, 2002), la técnica de detección a la que debe estar acoplada la cromatografía es la espectrometría de masas. Como también puede observarse en la Tabla 3, ya que, gracias a analizadores de 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 desarrollar métodos analíticos que confirmen y cuantifiquen la presencia de medicamentos veterinarios en leche de una forma inequívoca.

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 fuente de ionización por electrospray (ESI) es una de las 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.

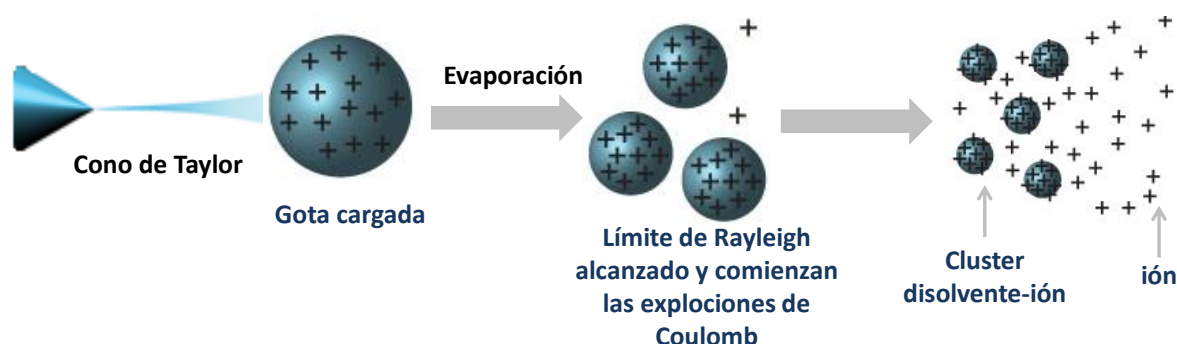


Figura 6. Esquema del proceso de formación del electrospray. (Moreno-González, D. *Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y aguas*. 2013).

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.

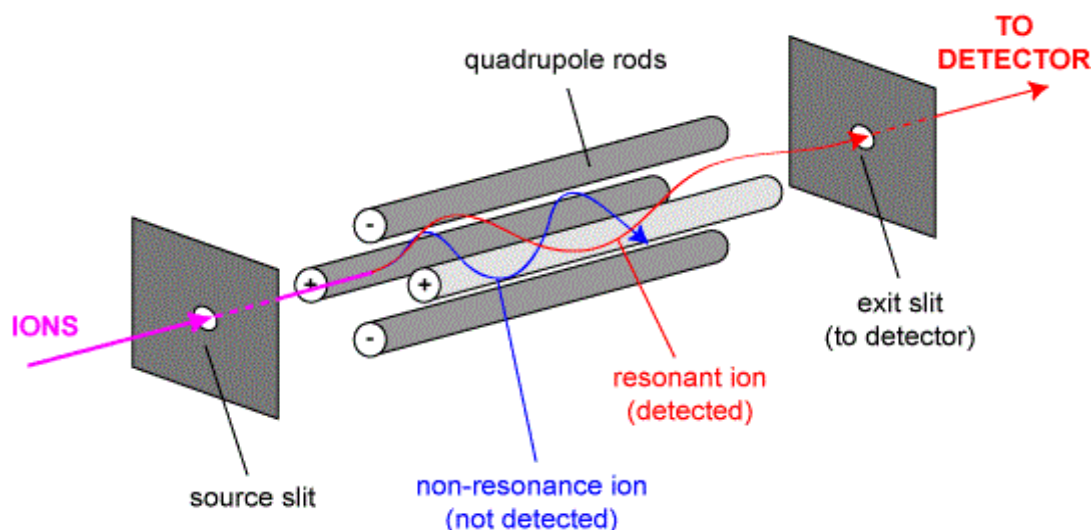


Figura 7. Trayectoria de los iones en un analizador de cuadrupolo. (Gates, P. University of Bristol. *Quadrupole Mass Analysis*. 2014).

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.

En este trabajo, el analizador utilizado es el de triple cuadrupolo, el cual consiste en tres cuadrupolos conectados en serie, según se observa en la Figura 8. El empleo de la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) hace que este equipo se caracterice por su alta selectividad y sensibilidad en la detección de los analitos, siendo instrumento excelente para la cuantificación de compuestos en la actualidad. El modo de adquisición en el que se ha operado en este estudio es el Multiple Reaction

Monitoring (MRM), en el cual, cada una de las partes que conforma el analizador tiene una misión concreta que permite llegar a la identificación y cuantificación del compuesto mediante sus iones producto. Este modo de adquisición consta de 3 etapas cada una de las cuales se desarrolla en cada uno de los cuadrupolos que forman el analizador:

- **Cuadrupolo 1, Q1.**

Analizador de tipo cuadrupolo encargado de seleccionar la relación m/z deseada, que suele ser la del ión precursor.

- **Cuadrupolo 2, 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).

- **Cuadrupolo 3, Q3.**

Analizador de tipo cuadrupolo encargado de separar los iones producto formados en el Q2.

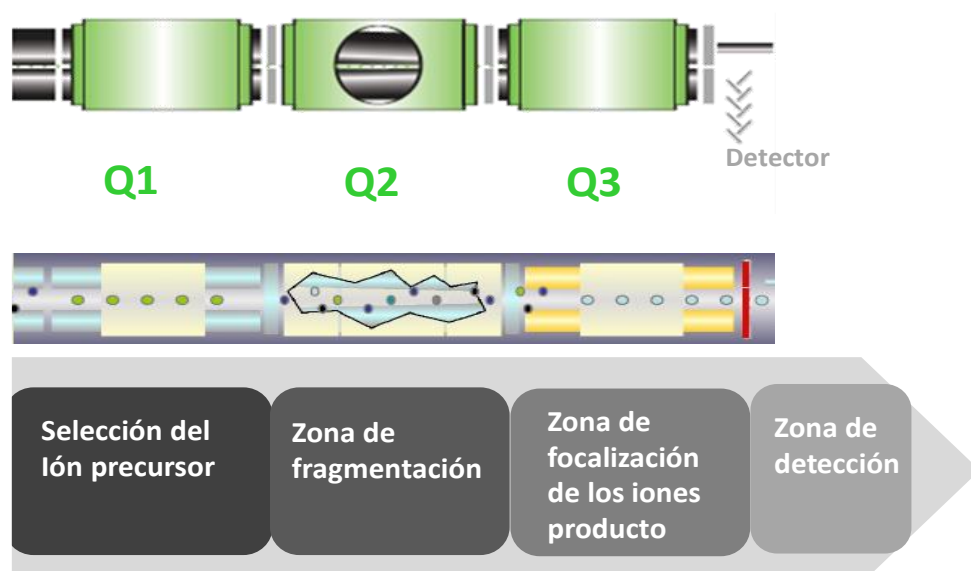


Figura 8. Esquema del proceso del analizador de triple cuadrupolo. (Moreno-González, D. *Desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de residuos de carbamatos en alimentos y aguas*. 2013).

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 leche.

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 L^{-1} que fueron almacenadas en el congelador a una temperatura de -18°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 L^{-1} , el disolvente fue metanol. Por último, se preparó otra dilución a partir de esta última, para obtener el nivel más alto de la recta de calibrado $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en la que la proporción de disolvente fue $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20). A partir de esta 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: $0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (blanco), $0.001 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $0.01 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $0.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ y $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

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 pertenecientes a la casa comercial DELTALAB. Para la extracción en fase sólida, se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida Oasis PRiME HLB 3cc de la casa comercial Waters (Milford, Massachusetts, EE.UU.) y para la extracción en fase sólida dispersiva se utilizaron tubos EMR-Lipid d-SPE y tubos EMR-Lipid Polish, ambos de la casa comercial Agilent Technologies (Santa Clara, California, EE.UU.).

Una centrífuga (Sartorius 2-16P from Sigma, St. Louis, MO, USA), un evaporador (TurboVap LV Concentration Evaporator from Caliper Life Sciences, Waltham, MA, USA) y un vortex (Vortex-Genie 2 from Scientific Industries, NY, USA) también fueron requeridos en los tratamientos de muestra.

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, su separación 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 realizar la cuantificación.

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 (87%) en su composición, 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^{-1} y otros como hierro, cobalto, zinc o selenio a niveles de trazas, es decir, por debajo de 100 mg kg^{-1} . 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. Debido a esta gran variedad de compuestos y, especialmente, la alta concentración de proteínas y lípidos, hacen complicado llegar a un extracto limpio y libre de interferentes para el análisis.

Con esta premisa, este trabajo pretende evaluar y establecer una comparación entre dos tratamientos de muestra diferentes, HLB PRiME y EMR-Lipid. Para ello, se tomó una marca de leche, 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 (HLB PRiME)

Para la realización de este tratamiento de muestra basado en una SPE se utilizan los cartuchos Oasis HLB PRiME, uno de los cuales aparece en la Figura 9. La novedad de los cartuchos HLB PRiME



Figura 9. Cartucho Oasis HLB PRiME.

“Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use”, reside en que el proceso de extracción en fase sólida 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, y otros cartuchos de SPE, 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 10) está basado en un método que proporciona la casa comercial, 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, que es el que corresponde a la 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. Después se hace una dilución del extracto con agua. Se obtiene así la composición final del disolvente en el vial de inyección de 80:20 acuoso:orgánico. La dilución final de la muestra tras todo el tratamiento de muestra es 1:50.

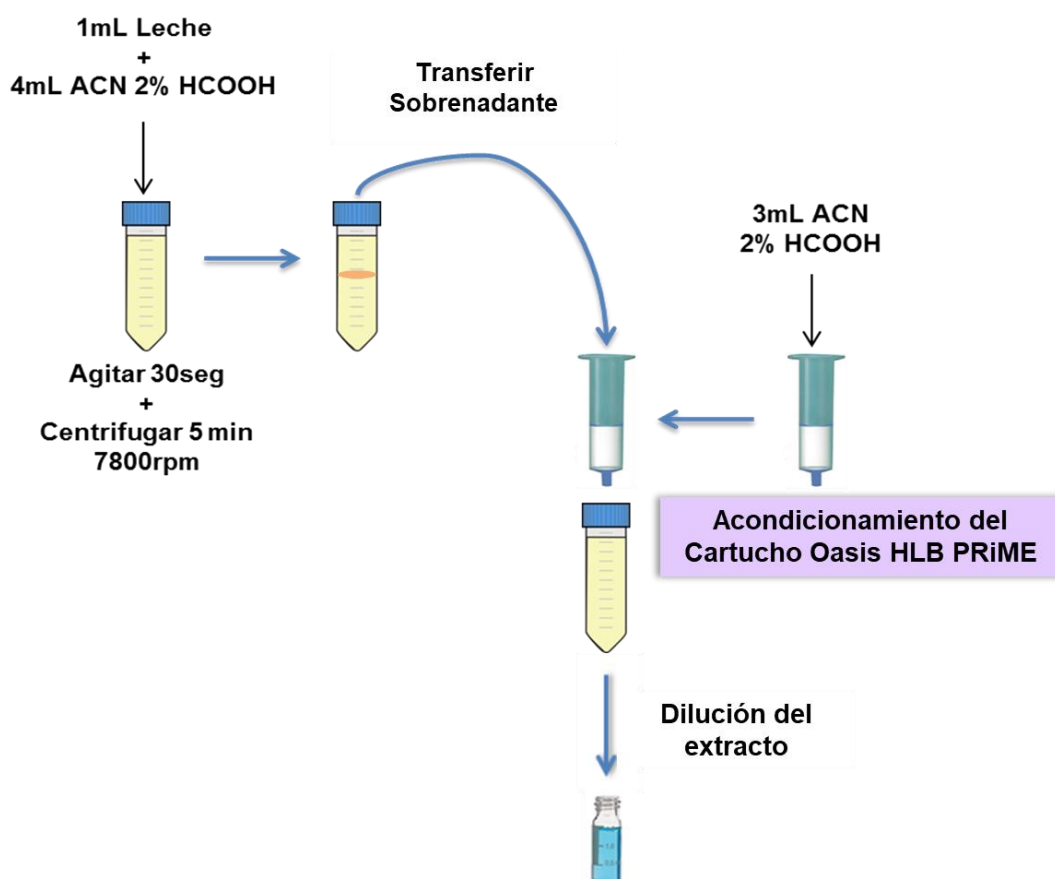


Figura 10. Tratamiento de muestra I. Extracción en Fase Sólida (HLB PRiME).

3.2.2. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (EMR-Lipid)

Para este tratamiento de muestra, los materiales utilizados son los que aparecen en la Figura 11, fueron adquiridos directamente en la casa comercial ya que el nuevo sorbente está bajo patente. En este tratamiento de muestra se realiza una extracción en fase sólida dispersiva basada en los principios de la metodología QuEChERS, implicando una etapa de extracción y etapas de limpieza. Se incorpora el nuevo sorbente para la limpieza del extracto, 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, utilizados en la metodología QuEChERS, PSA y C₁₈, logrando reducir significativamente interferentes de la matriz y mejorando la recuperación de los compuestos. Esto se debe a que con estos sorbentes el porcentaje de retirada de lípidos es bastante limitado con lo que puede producirse 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 C₁₈.

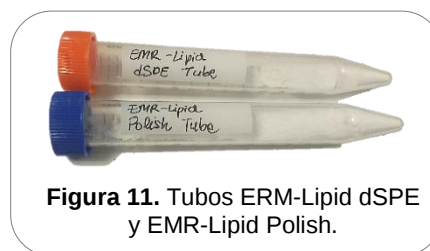


Figura 11. Tubos EMR-Lipid dSPE y EMR-Lipid Polish.

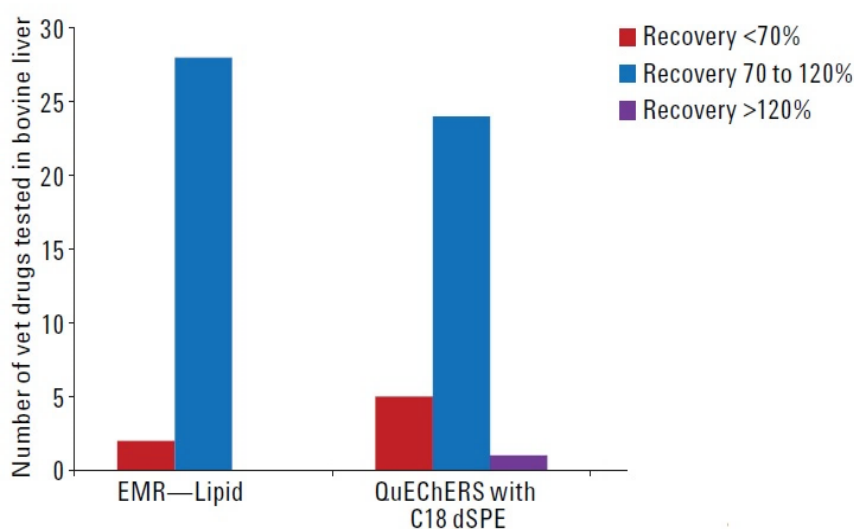


Figura 10. Porcentajes de recuperación de analitos en muestras de hígado de vaca fortificadas en 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de drogas veterinarias. (Zhao, L.; Lucas. *Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS*. Agilent Technologies Application Note. 2015).

El tratamiento de muestra que se realizó (Figura 11) está basado en una hoja de aplicación que proporciona la casa comercial Agilent para el análisis de 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 entre el sorbente y las sustancias que se quieren retirar de la matriz, especialmente los lípidos, por 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 durante 2 minutos, y se centrifuga a 5000 rpm durante 3 minutos. Una vez realizado esto, en el tubo aparece un sobrenadante en el cual no se aprecia separación de fases, ya que está constituido por una mezcla aproximadamente 50:50 de MeCN:H₂O 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 2 g de una mezcla de sales de MgSO₄ 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 de forma manual, apreciándose el calentamiento de este. Esto se debe a la reacción exotérmica que tiene lugar al producirse la hidratación del sulfato de magnesio anhidro cuando entra en contacto con el agua del sobrenadante. Después, el tubo se agita en el vortex, se centrifuga a 5000 rpm durante 3 minutos y se recoge el extracto del sobrenadante orgánico. Después se hace una dilución del extracto con agua. Se obtiene así la composición final del disolvente en el vial de inyección de 80:20 acuoso:orgánico. La dilución final de la muestra tras todo el tratamiento de muestra es 1:50.

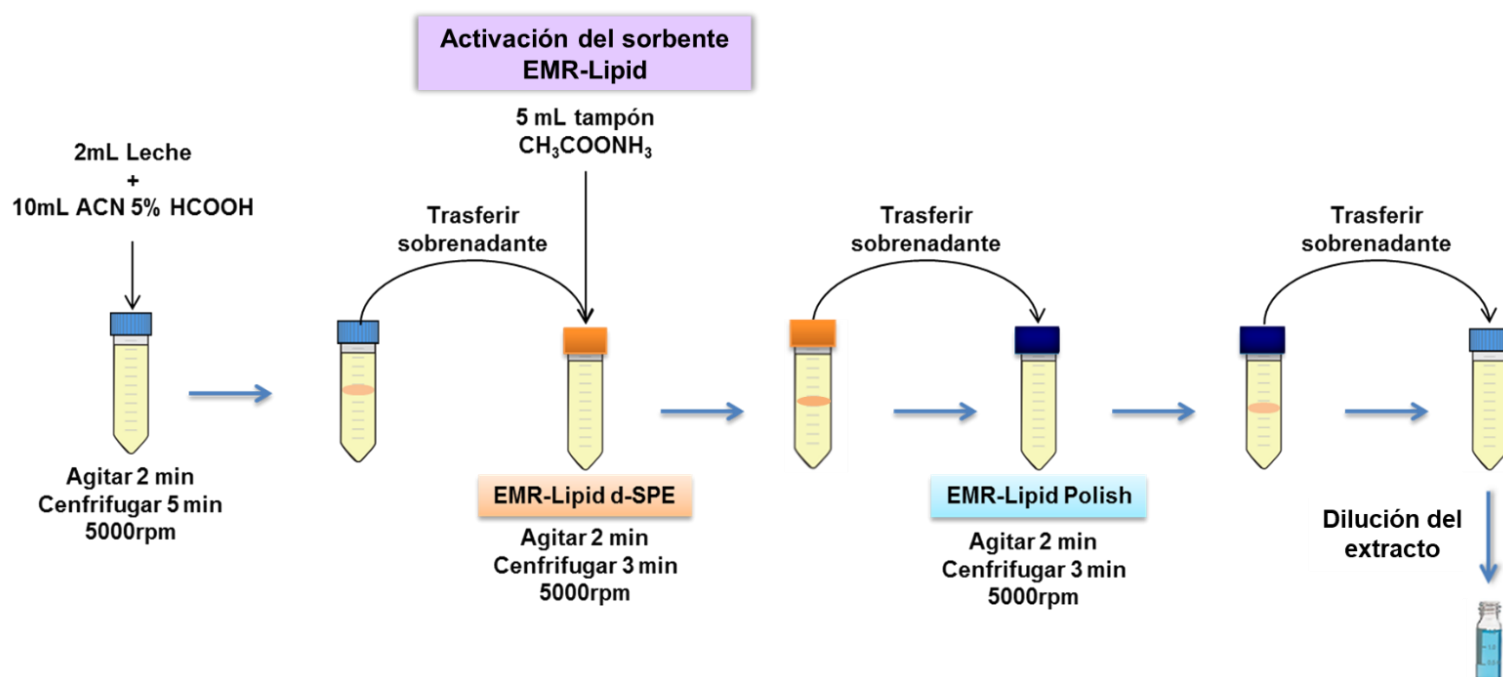


Figura 11. Tratamiento de muestra II. Extracción en Fase Sólida Dispersiva (EMR-Lipid).

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 Cuadrupolo, 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 y las condiciones utilizadas mediante los análisis en el espectrómetro de masas aparecen en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones del espectrómetro de masas.

Parámetro	Valor utilizado
Volaje del Capilar	3500 V
Sheath Gas	35 unidades arbitrarias
Auxiliar Gas	15 unidades arbitrarias

Sweep Gas	1 unidades arbitrarias
Temperatura Transfer Tube	250 °C
Temperatura de Vaporización	300 °C
CID Gas	2 mTorr
Fragmentación en fuente	0 V
Resolución Q1 y Q3	0.7 FMWH

Se utilizó una columna de fase reversa Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 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 5). 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⁻¹. La inyección se hace mediante un sistema automatizado y el volumen de inyección de cada muestra fue de 20 µL.

Tabla 5. Gradiente de elución.

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 UHPLC-MS/MS

Para el análisis de los medicamentos veterinarios propuestos se realizó mediante un método utilizando un equipo de UHPLC-MS/MS y el modo de adquisición de datos fue MRM. Utilizar este analizador en este modo de adquisición, 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.

Antes de realizar una separación cromatográfica de los analitos, fue necesario realizar una infusión directa de cada uno de los compuestos por separado. Para ello se utilizó una solución con una concentración de 1 mg L^{-1} de cada medicamento. Las cuales se prepararon a partir de las disoluciones patrón estándar de 500 mg L^{-1} y se inyectaron en el equipo mediante una jeringa. El compuesto llega directamente al espectrómetro de masas, con lo que se consigue caracterizar perfectamente el compuesto, es decir, saber la masa del ión precursor formado tras la ionización, los fragmentos resultantes y sus intensidades relativas. Además, también permite optimizar parámetros del espectrómetro de masas, como son, la energía de colisión y el voltaje de las lentes.

La infusión de los compuestos es realmente importante ya que permite poder identificar la presencia del compuesto en los posteriores análisis. Según la legislación vigente (Decisión de la Comisión 2002/657/EC, 2002) utilizando la MS/MS son necesarios dos iones producto para poder identificar un compuesto. El ión producto con mayor intensidad es el que se utiliza para la cuantificación del compuesto en una muestra. Y el segundo fragmento más intenso sirve para la confirmación inequívoca del compuesto.

Los datos resultantes de la infusión directa de cada uno de los analitos, es decir, las masas del ión precursor y de los dos iones producto se encuentran en la Tabla 6, además, en ella también se encuentran los datos optimizados de la energía de colisión y del voltaje de las lentes. Cabe destacar que, a ionización de los compuestos se hizo en modo positivo, detectándose en todos los casos el ión $[M+H]^+$, excepto para el compuesto Cloxacillin cuyo ión precursor detectado fue el aducto con metanol $[M+CH_3OH]^+$.

Una vez caracterizado cada uno de los compuestos, se realizó un estudio para optimizar el método cromatográfico y conseguir la mejor separación de los analitos y resolución de los picos. Para esto se colocó la columna en el equipo y se procedió a la inyección de una disolución que contenía $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los compuestos. Se realizaron múltiples pruebas con el fin de obtener los mejores resultados.

En primer lugar, se probó con una columna en fase reversa C_{18} Accucore aQ $100 \times 2.1 \text{ mm}$ de $2.6 \mu\text{m}$ (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_{18} Rapid Resolution HD ($2.1 \times 50 \text{ mm}$ y $1.8 \mu\text{m}$), con la que se observaron mejores resultados.

Para obtener una buena separación de los compuestos y una satisfactoria ionización se probaron composiciones diferentes de las fases móviles. Por una parte, se probaron diferentes composiciones de la fase móvil orgánica, siendo esta metanol o acetonitrilo. Por otra parte, se estudió la influencia de dos aditivos a las fases móviles, en este caso, formiato amónico y ácido fórmico.

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 orbifloxacina con las diferentes composiciones de fase orgánica. Cuando la fase orgánica es metanol, se observa un pico con una cola mayor que cuando es acetonitrilo, con lo que se evidencia la mejora al cambiar la composición de esta fase móvil.

Orbifloxacin

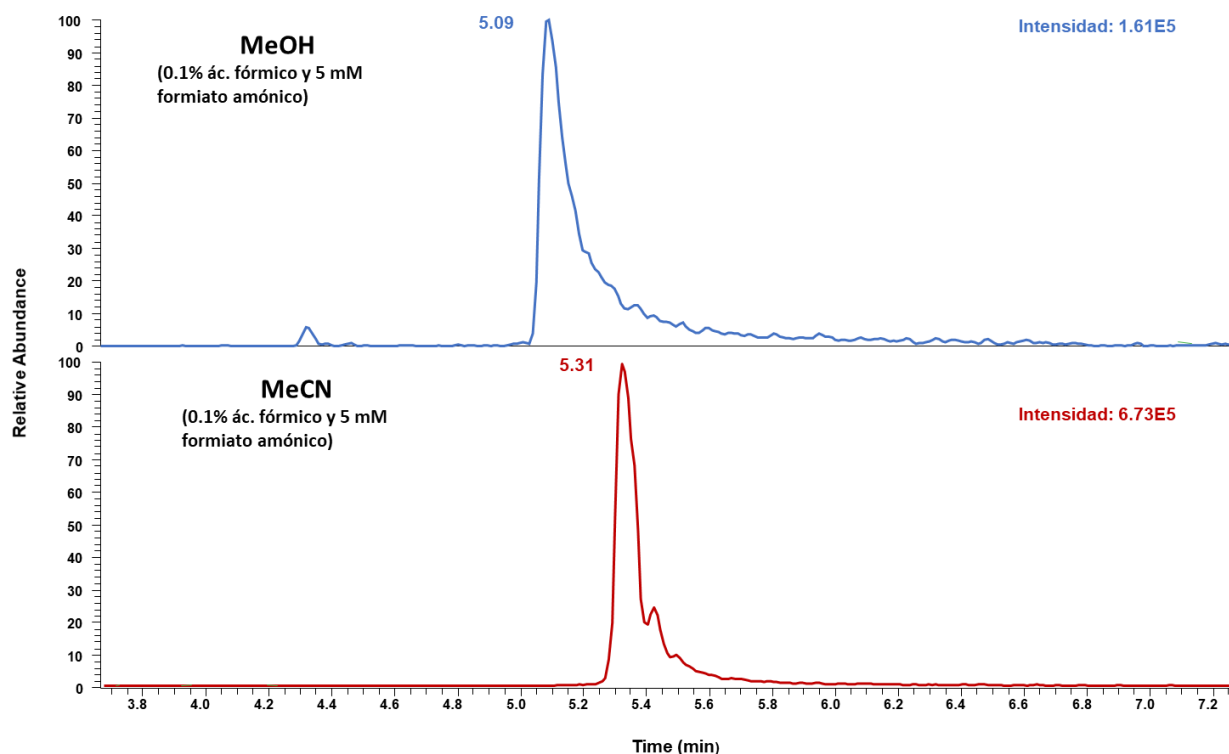


Figura 12. Pico cromatográfico del compuesto orbifloxacin ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) con dos composiciones diferentes de la fase móvil orgánica.

Se justifica así la elección de acetonitrilo como el disolvente de la fase móvil orgánica. También se obtuvo el gradiente de elución óptimo, el cual es el que aparece en la Tabla 6 y se encuentra representado a continuación en la Figura 13.

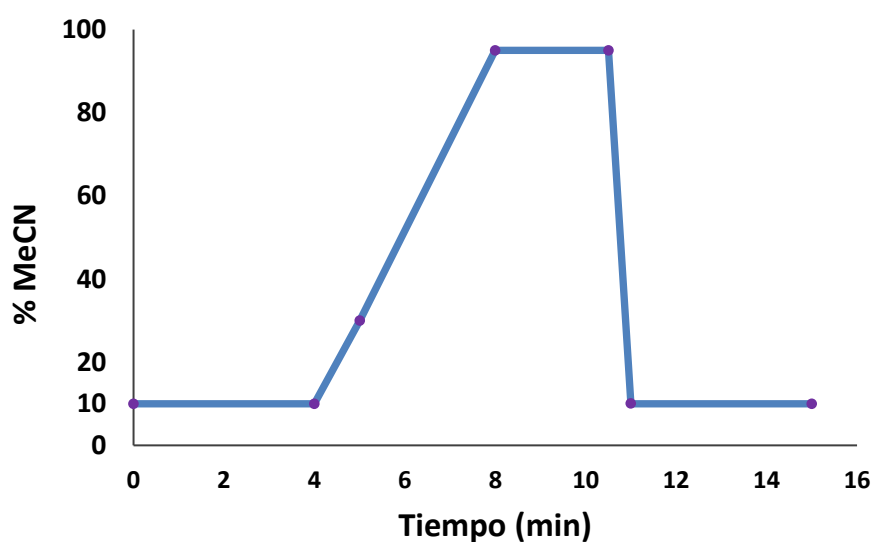


Figura 13. Gradiente de elución óptimo.

Después, se evaluó la presencia y la concentración de los dos aditivos mencionados. Estos se escogieron porque, como a través de las infusiones directas, se detectó como ión precursor, en la mayoría de los compuestos, 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, para formar así el ión precursor de cada compuesto. Se probó formiato amónico a una concentración de 5 mM y diferentes concentraciones de ácido fórmico (de 0.1 a 1% v/v) en ambas fases móviles. 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.

Se observó una gran mejora cuando se suprimía el formiato amónico de las fases móviles y se incrementaba la concentración de ácido fórmico hasta el 1% la intensidad de los iones aumentaba significativamente y se obtenían unos picos mucho más estrechos. Este efecto puede verse para el compuesto clenbuterol en la Figura 14.

Clenbuterol

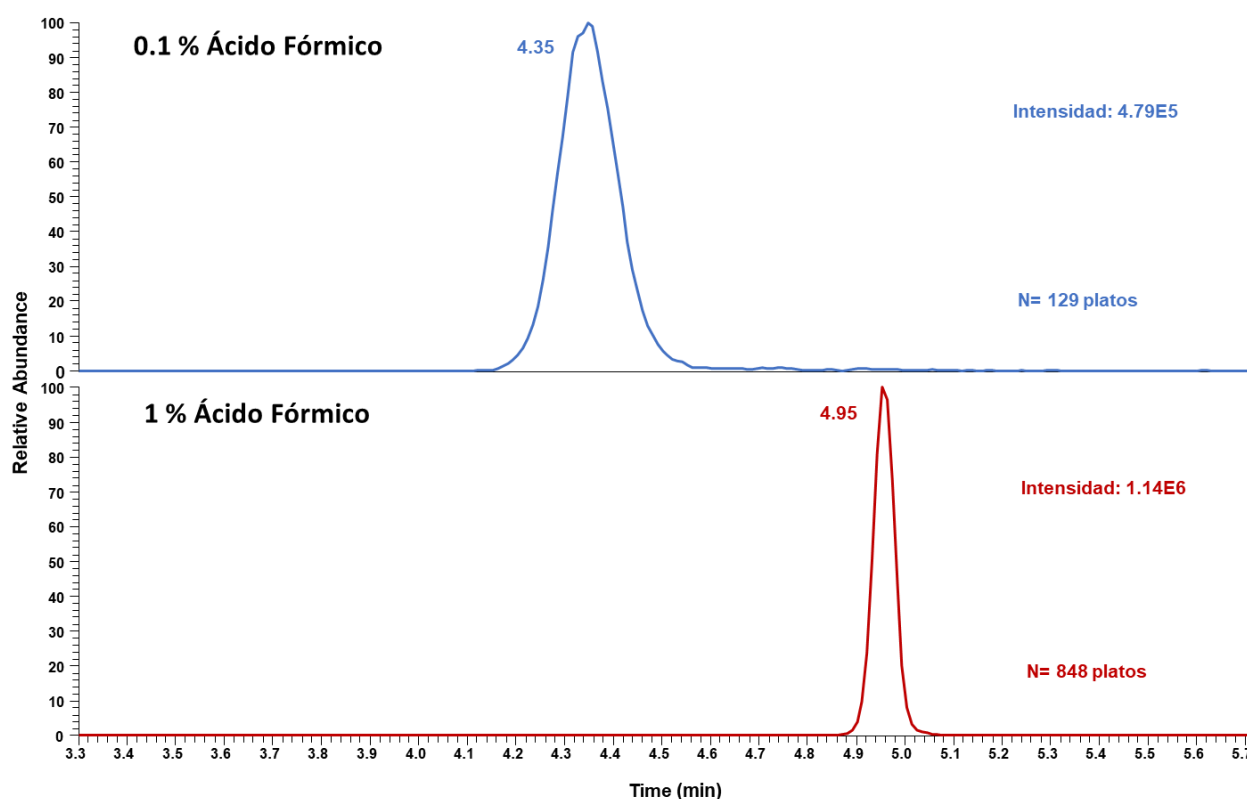


Figura 14. Mejora del pico cromatográfico y de la intensidad de la señal del compuesto clenbuterol ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) con el aumento del porcentaje de ácido fórmico y la supresión del formiato amónico en las fases móviles. Donde N: número de platos teóricos para el Clenbuterol.

Además, en la Figura 14 puede observarse el cálculo del 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. Con 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.

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).

También, en busca de la mejora del método cromatográfico, se realizó un estudio de la influencia del disolvente en el cual se inyectan los analitos. Se optimizó el disolvente en el que se inyectaría la muestra. Se probó como disolvente H₂O:MeOH en las siguientes proporciones: 50:50; 70:30; 80:20; 90:10 y 95:5. A la vista de los resultados, se decidió que la proporción de disolvente H₂O:MeOH más adecuada para el método es 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 15 se puede observar cómo se distribuyen los compuestos a lo largo del tiempo total del análisis y a qué composición de fase móvil orgánica son eluidos.

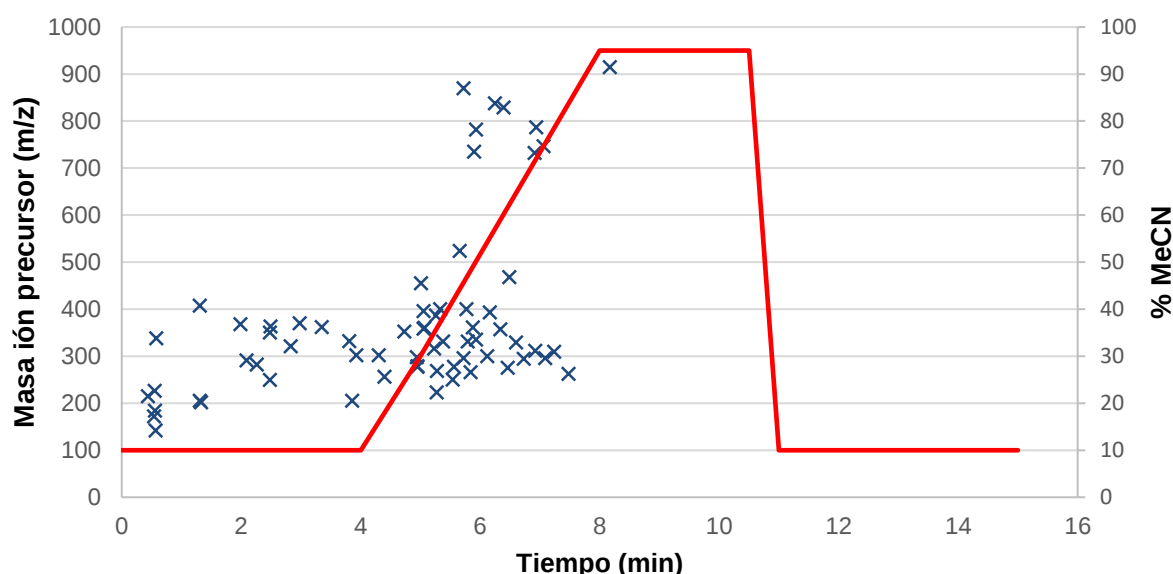


Figura 15. Gradiente de elución (en rojo), composición de la fase móvil a la que son eluidos los analitos y su distribución a lo largo del análisis cromatográfico.

Por último, en la Tabla 6 figura la lista de los compuestos estudiados en este trabajo, ordenados según el orden en el que eluyen. En ella se puede observar su caracterización por su tiempo de retención, masa del ión precursor y masas de los iones producto, además de, la energía de colisión y el voltaje de las lentes optimizadas para cada uno de compuestos.

A modo de ejemplo, en las Figuras 16 y 17 aparece el Cromatograma de Ión Extraído (EIC) para dos compuestos, enrofloxacin y josamycin, a la concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en disolvente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20). Junto a él, aparece su espectro de masas, en el que se pueden apreciar las masas de sus dos principales fragmentos y la relación de intensidades entre ellos.

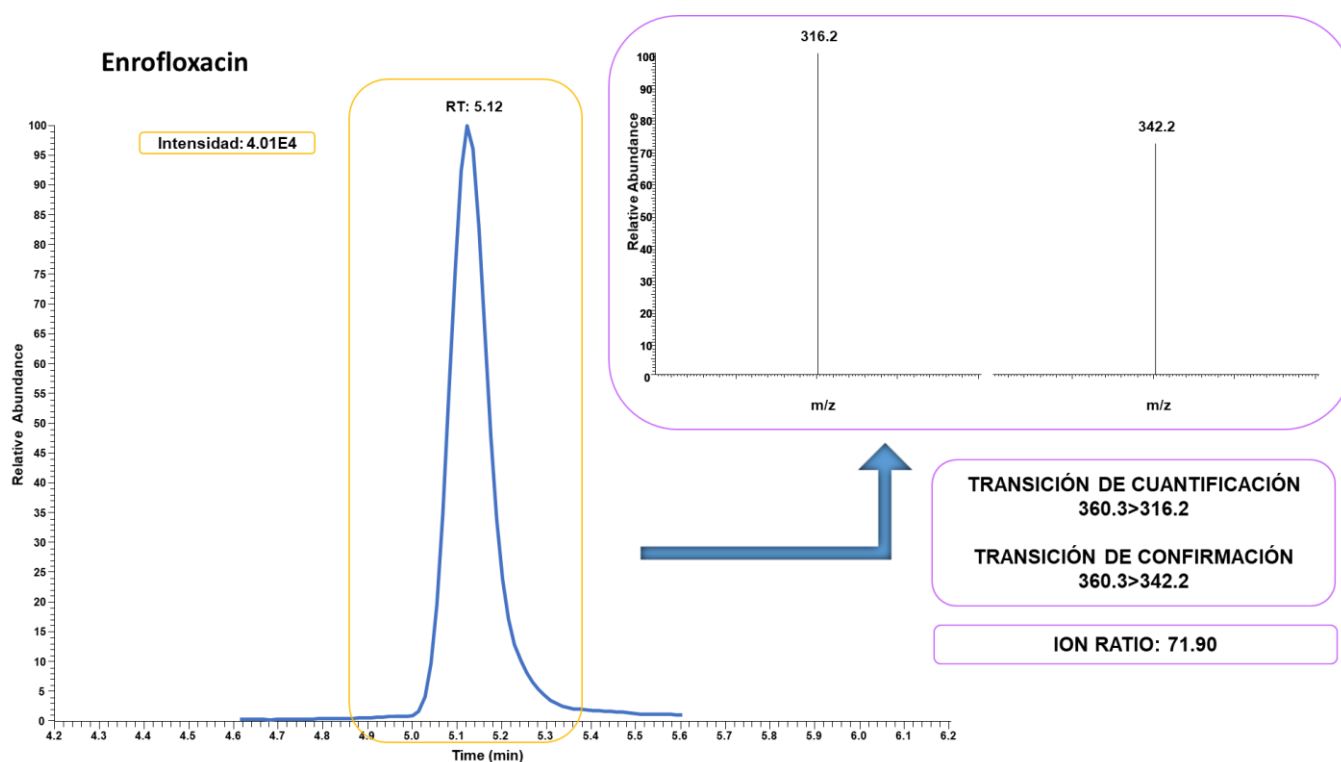


Figura 16. Pico cromatográfico y espectro de masas del compuesto enrofloxacin a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en disolvente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20).

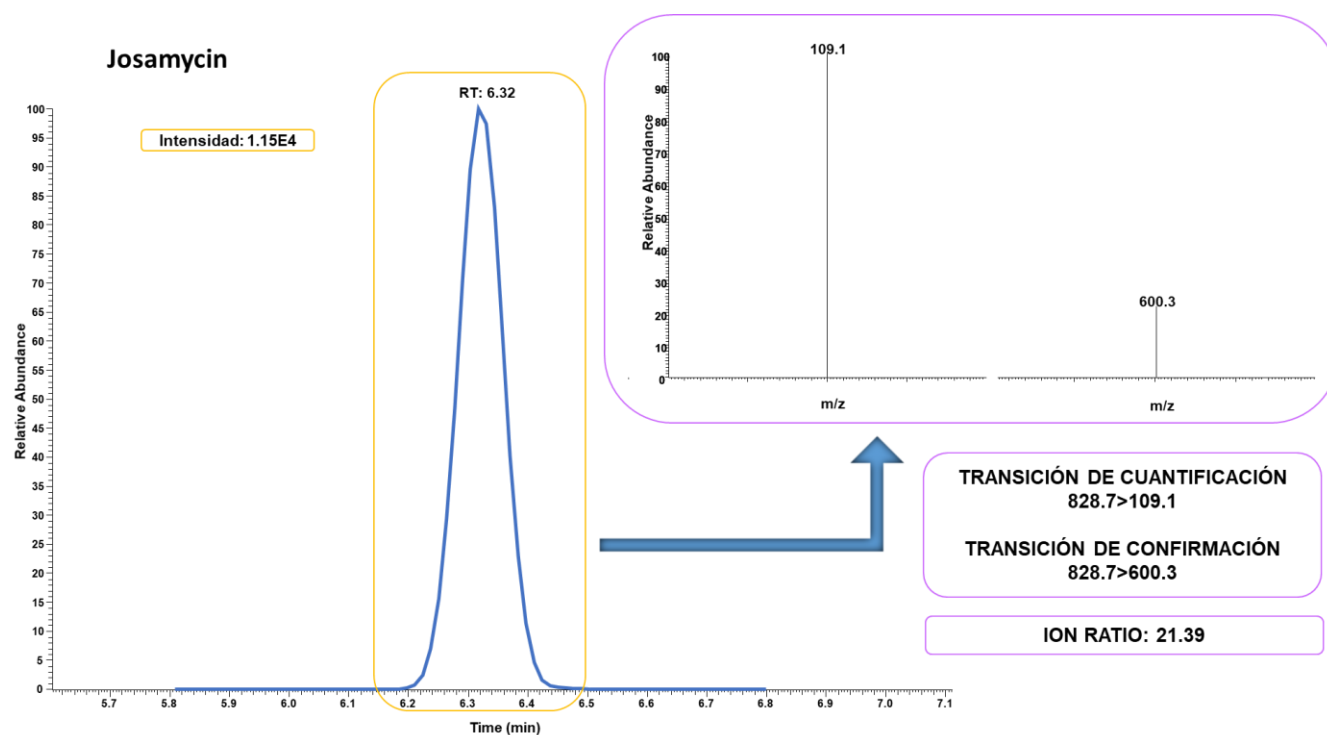


Figura 17. Pico cromatográfico y espectro de masas del compuesto josamycin a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ en disolvente $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20).

Tabla 6. Caracterización de los compuestos estudiados.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Masa Ión Precursor (m/z)	Masa Fragmento de Cuantificación (m/z)	Energía de Colisión (V)	Masa Fragmento de Confirmación (m/z)	Energía de Colisión (V)	RF Lentes (V)
1 Sulfaguanidine	0.44	215.2	156.0	14.3	92.0	24.3	60
2 Metronidazole	0.54	172.2	128.1	14.0	82.0	23.8	58
3 Terbutaline	0.55	226.3	152.1	15.1	107.0	28.8	56
4 Acephate	0.56	184.1	143.0	10.3	125.0	17.7	32
5 Dimetridazole	0.57	142.2	96.1	15.7	81.0	24.9	62
6 Famotidine	0.58	338.2	189.1	19.1	259.1	10.3	63
7 Levamisole	1.31	205.3	178.0	20.5	91.0	35.2	80
8 Lincomycin	1.31	407.3	126.1	27.0	359.2	17.4	88
9 Thiabendazole	1.33	202.2	175.0	25.1	131.0	32.7	93
10 Cefaclor	1.99	368.3	191.1	10.3	174.1	12.8	67
11 Trimethoprim	2.09	291.2	230.1	23.5	261.1	25.2	92
12 Albendazole Sulfoxide	2.26	282.2	240.1	13.3	208.1	23.4	74
13 Ampicillin	2.48	350.2	106.1	18.3	160.0	10.6	65
14 Dapsone	2.48	249.5	156.1	11.9	108.9	17.2	74
15 Marbofloxacin	2.49	363.2	320.1	14.9	345.1	19.4	79
16 Enoxacin	2.83	321.2	303.1	20.6	232.0	33.5	86
17 Fleroxacin	2.98	370.2	326.1	17.8	269.1	25.5	92
18 Ofloxacin	3.35	362.2	318.1	17.9	261.1	26.2	87
19 Ciprofloxacin	3.81	332.2	314.1	19.2	231.1	36.7	90
20 Phenylthiouracil	3.86	205.3	103.0	26.4	188.0	18.0	78
21 Ractopamine1	3.93	302.2	121.1	21.3	164.1	15.3	64
22 Ractopamine2	4.30	302.2	121.1	21.3	164.1	15.3	64
23 Imidacloprid	4.40	256.2	209.1	17.1	175.1	19.2	61
24 Lomefloxacin	4.73	352.2	265.1	22.7	308.1	15.7	88
25 Albendazole Sulfone	4.94	298.2	159.1	37.1	266.1	19.1	91
26 Clenbuterol	4.95	277.2	203.0	15.4	132.1	27.3	55
27 Fenthion	4.95	279.1	169.0	18.2	246.9	10.8	74
28 Cefazolin	5.01	455.3	323.0	10.3	156.0	14.3	67
29 Danofloxacin	5.05	358.4	340.2	21.1	314.1	16.2	93

Tabla 6. Caracterización de los compuestos estudiados (continuación).

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Masa Ión Precursor (m/z)	Masa Fragmento de Cuantificación (m/z)	Energía de Colisión (V)	Masa Fragmento de Confirmación (m/z)	Energía de Colisión (V)	RF Lentes (V)
30	Orbifloxacin	396.2	352.2	16.9	295.1	23.4	93
31	Enrofloxacin	360.3	316.2	18.0	342.2	20.4	87
32	Oxfendazole	316.2	159.0	29.9	284.0	17.4	91
33	Sarafloxacin	386.4	342.1	17.3	299.0	25.5	93
34	Acetamiprid	223.2	126.0	20.9	90.0	31.5	64
35	Sulfisoxazol	268.4	156.0	10.3	113.3	13.6	62
36	Difloxacin	400.2	356.1	18.3	299.1	27.0	96
37	Leucomalachite Green	331.3	239.2	30.3	316.2	20.6	92
38	Oxibendazole	250.2	218.1	18.1	176.1	27.0	78
39	Sulfabenzamide	277.2	156.1	12.8	157.0	10.3	47
40	Ceftiofur	524.1	241.0	16.1	125.0	53.3	96
41	Mebendazole	296.2	264.1	20.5	105.0	33.7	91
42	Tilmicosin	869.8	696.5	39.7	174.1	42.7	206
43	Colchicine	400.2	358.2	21.1	310.1	25.5	101
44	Febantel	331.2	254.1	20.1	239.1	24.6	82
45	Albendazole	266.2	234.1	17.8	191.0	31.5	79
46	Prednisolone	361.4	343.2	10.3	147.0	20.5	54
47	Erythromycin	734.7	576.4	17.8	158.2	28.2	99
48	Digoxin	781.6	651.1	10.30	97.1	23.1	89
49	Penicillin G	335.3	217.1	13.0	202.0	22.4	97
50	Fenbendazole	300.2	268.0	20.7	159.1	33.9	89
51	Betamethasone	393.3	373.2	10.3	355.2	10.3	59
52	Roxithromycin	837.7	679.5	20.2	158.2	33.2	107
53	Sulindac	357.2	233.1	49.3	340.1	19.7	96
54	Josamycin	828.7	109.1	40.7	600.3	25.0	130
55	Nandrolone	275.3	109.0	25.5	257.2	15.0	73
56	Cloxacillin	468.2	160.1	17.7	178.0	32.7	78
57	Malachite Green	329.3	313.1	35.6	165.1	55.0	118
58	Paclobutrazol	294.2	70.0	20.0	125.0	38.0	72

Tabla 6. Caracterización de los compuestos estudiados (continuación).

	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Masa Ión Precursor (m/z)	Masa Fragmento de Cuantificación (m/z)	Energía de Colisión (V)	Masa Fragmento de Confirmación (m/z)	Energía de Colisión (V)	RF Lentes (V)
59	Spinosyn A	6.91	732.5	142.2	28.1	98.0	45.0	113
60	Altrenogest	6.92	311.3	227.1	21.8	269.1	14.9	81
61	Rifaximin	6.94	786.6	754.3	20.6	151.1	34.7	129
62	Spinosyn D	7.06	746.5	142.2	28.6	98.0	44.4	116
63	Diclofenac	7.09	296.1	214.1	34.0	250.0	12.8	60
64	Phenylbutazone	7.24	309.2	160.2	19.4	77.0	45.8	79
65	Tolfenamic Acid	7.48	262.3	244.1	13.7	209.1	26.1	58
66	Eprinomectin	8.17	914.7	186.0	18.3	154.1	29.1	93

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 como consecuencia de la presencia de otros componentes presentes en la muestra y distintos del analito. Por tanto, puede obtener un valor positivo o negativo, porque puede deberse a un aumento o una supresión de la señal. 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.

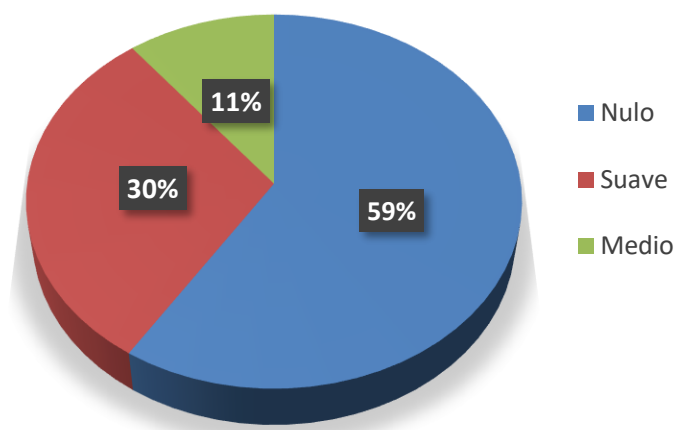
$$\text{Efecto matriz (\%)} = \left(\frac{\text{pendiente calibrado matriz}}{\text{pendiente calibrado estándar}} - 1 \right) \times 100$$

Si el valor se encuentra entre el 0-10% se considera un efecto matriz nulo, si está entre el 10-20%, se considera que existe un efecto matriz suave, si está entre el 20-50% hay 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 y fueron dopados con los niveles de concentración de la recta de calibrado en disolvente, obteniendo así la recta de calibrado en matriz. Hay que tener en cuenta que se debe mantener la proporción de disolvente (H₂O:MeOH, 80:20).

Después del análisis cromatográfico, se calculó el efecto matriz de cada tratamiento de muestra para cada uno de los compuestos (Tabla 7) y el porcentaje de compuestos con efecto matriz nulo, suave, medio y fuerte (Figura 18).

Efecto Matriz HLB PRiME



Efecto Matriz EMR-Lipid

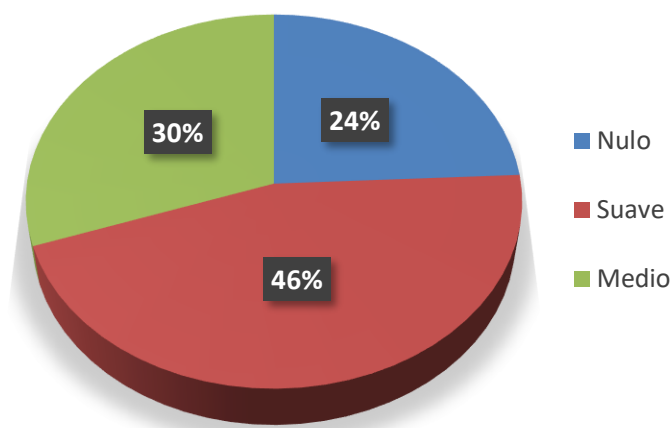


Figura 18. Efecto matriz de los dos tratamientos de muestra propuestos.

De la Figura 18, cabe destacar que en ninguno de los tratamientos de muestra hay analitos que tengan un efecto matriz fuerte, lo que evidencia ambos tratamientos son capaces de eliminar adecuadamente los interferentes. En el caso del tratamiento con cartuchos Oasis HLB PRiME, la mayoría de compuestos, el 89%, tienen un efecto matriz, nulo o suave, que permitiría realizar un calibrado en estándar. Por el contrario, el tratamiento con EMR-Lipid tiene un mayor porcentaje de compuestos con efecto matriz medio, con respecto al anterior, con lo que sería conveniente realizar un calibrado con presencia de matriz para cuantificar esos compuestos.

Para mostrarlos buenos resultados en términos de efecto matriz en la Figura 19 se pueden ver los picos cromatográficos del compuesto clenbuterol a una concentración

de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada uno de los tres calibrados realizados. Se observa que las intensidades de los picos son equivalentes. Esto concuerda con los valores calculados del efecto matriz para el Clenbuterol, el cual indica que tiene un efecto matriz suave.

Clenbuterol

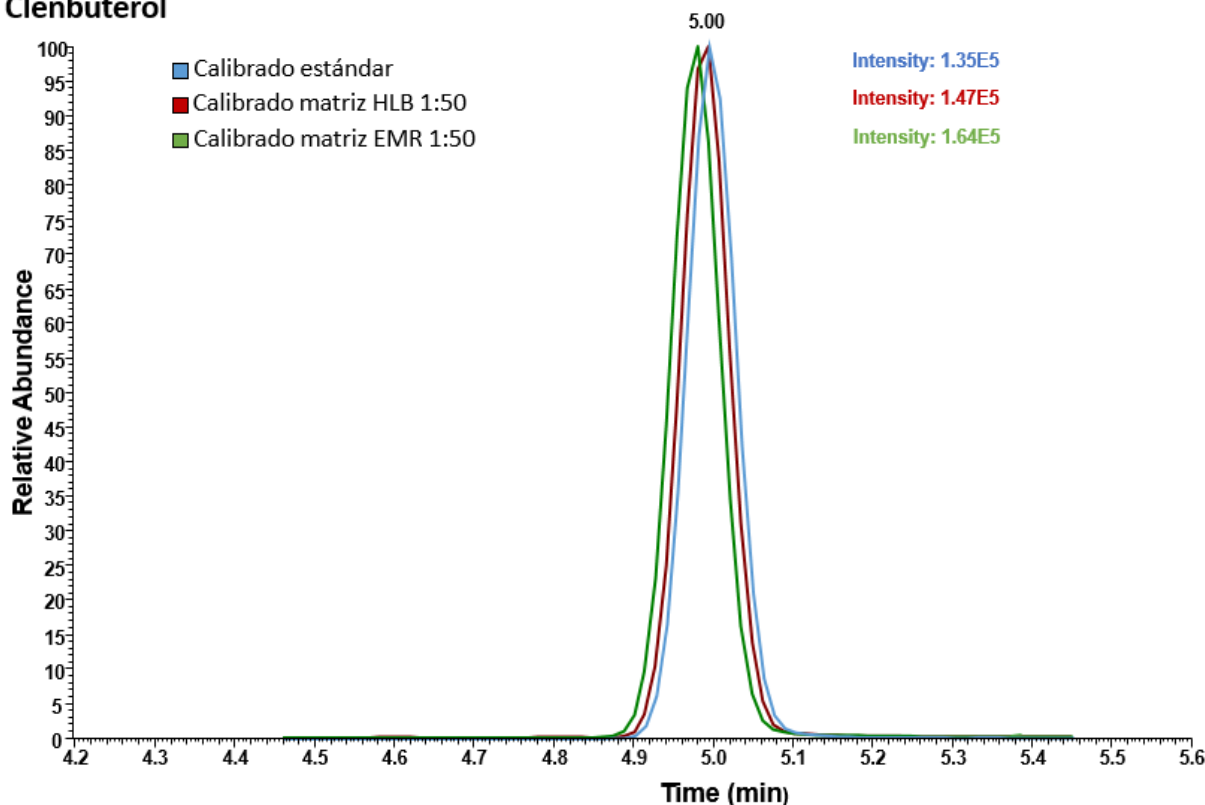


Figura 19. Evidencia de la existencia de un efecto matriz suave en el compuesto Clenbuterol en los distintos calibrados a un nivel de concentración de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

• 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. La finalidad es saber si debido al tratamiento de muestra propuesto, el analito de interés se perdería totalmente, con lo cual, no se podría detectar y no sería un tratamiento adecuado para su análisis. O, por el contrario, si el analito sigue estando en el extracto, cuál es la concentración y cómo difiere respecto a la concentración añadida antes del tratamiento, es decir, en qué 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 $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de cada uno de los analitos, después se las somete al tratamiento de muestra elegido y, finalmente, a los extractos se les aplica la dilución 1:10, manteniendo la proporción de $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ (80:20). 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 de cada réplica entre la concentración real añadida, es decir, entre 50 µg kg⁻¹.

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

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 valores se indican en la Tabla 7. Según los resultados obtenidos, los porcentajes de recuperación de todos los compuestos se encuentran dentro de los límites aceptables, por lo que se puede concluir que ambos tratamientos de muestra son adecuados para estudiar la presencia de estos 66 medicamentos veterinarios en leche.

Tabla 7. Efecto matriz y porcentajes de recuperación calculados para los compuestos estudiados.

Compuesto	Efecto matriz (%)		% Recuperación (%RSD)	
	HLB PRiME	EMR-Lipid	HLB PRiME	EMR-Lipid
Acephate	9	10	108.1 (18.9)	118.6 (6.2)
Acetamiprid	9	13	110.8 (14.7)	115.5 (8.9)
Albendazole	1	20	118.8 (8.5)	116.4 (5.9)
Albendazole Sulfone	17	19	114.6 (11.2)	118.9 (18.1)
Albendazole Sulfoxide	9	15	112.0 (5.9)	115.7 (22.2)
Altrenogest	0	8	85.4 (16.5)	94.3 (8.1)
Ampicillin	-16	-12	113.2 (5.4)	117.9 (3.6)
Betamethasone	-2	-1	102.7 (11.0)	109.3 (6.0)
Cefaclor	6	14	76.7 (39.8)	71.0 (23.5)
Cefazolin	-21	-20	118.6 (11.7)	116.5 (14.7)
Ceftiofur	5	24	100.9 (15.8)	101.4 (9.1)
Ciprofloxacin	-21	-22	115.6 (10.7)	89.4 (8.8)
Clenbuterol	13	19	71.9 (11.8)	81.3 (6.5)
Cloxacillin	-7	6	110.9 (15.8)	119.4 (5.4)
Colchicine	0	3	120.1 (13.4)	117.0 (4.3)
Danofloxacin	-19	-25	116.7 (11.6)	91.0 (11.1)
Dapsone	0	2	117.8 (12.8)	118.5 (5.2)
Diclofenac	21	17	92.6 (17.4)	106.5 (6.5)
Difloxacin	-6	17	118.5 (7.5)	115.5 (8.7)
Digoxin	-14	-23	115.1 (22.0)	119.4 (24.7)
Dimetridazole	8	9	118.6 (25.2)	116.4 (28.3)
Enoxacin	-19	21	119.2 (11.2)	84.8 (9.7)
Enrofloxacin	8	9	118.8 (10.2)	112.4 (10.6)
Eprinomectin	1	12	87.5 (13.8)	78.0 (38.0)
Erythromycin	-20	-22	108.1 (18.9)	119.6 (10.4)
Famotidine	-8	7	92.3 (10.2)	76.2 (1.4)
Febantel	7	17	72.4 (8.6)	92.3 (7.3)
Febendazole	6	18	113.4 (12.6)	116.2 (7.3)
Fenthion	9	24	91.5 (18.4)	91.2 (11.6)
Fleroxacin	13	22	111.0 (9.7)	100.5 (9.7)

Imidacloprid	13	23	109.5 (13.7)	96.8 (4.7)
Josamycin	-7	-10	96.6 (14.3)	117.0 (8.1)
Leucomalachite Green	-8	11	109.0 (7.6)	108.8 (12.5)
Levamisole	17	18	83.5 (9.3)	100.9 (13.9)
Lincomycin	11	10	106.3 (7.7)	75.6 (30.6)
Lomefloxacin	-10	5	118.7 (5.8)	115.7 (16.8)
Malachite Green	10	23	85.2 (14.5)	71.6 (4.3)
Marbofloxacin	8	18	112.4 (11.3)	103.0 (11.0)
Mebendazole	5	22	113.2 (12.9)	117.5 (8.2)
Metronidazole	7	4	114.3 (5.3)	79.0 (4.9)
Nandrolone	7	-12	104.1 (34.9)	83.0 (36.2)
Ofloxacin	-12	-10	118.8 (10.6)	99.9 (10.5)
Orbifloxacin	-5	21	96.3 (7.0)	91.4 (5.8)
Oxfendazole	6	20	119.1 (9.3)	119.9 (10.8)
Oxybendazole	8	13	112.3 (7.7)	117.2 (9.6)
Paclobutrazol	8	18	95.0 (15.4)	113.7 (9.6)
Penicillin G	-11	-3	119.2 (15.4)	117.4 (7.7)
Phenylbutazone	19	9	91.7 (15.3)	115.7 (7.8)
Phenylthiouracil	4	10	102.9 (10.2)	118.6(11.6)
Prednisolone	0	4	95.1 (11.1)	100.5 (20.7)
Ractopamine	5	19	110.1 (8.5)	114.9 (12.5)
Rifaximin	8	14	108.9 (9.0)	114.7 (9.6)
Roxithromycin	-9	-6	113.1 (12.2)	115.1 (4.7)
Sarafloxacin	-5	19	117.7 (8.3)	106.8 (8.6)
Spinosyn A	18	15	79.0 (14.3)	88.8 (5.3)
Spinosyn D	22	19	78.2 (13.3)	88.4 (9.0)
Sulfabenzamide	3	6	115.9 (9.8)	117.9 (6.4)
Sulfaguanidine	-22	-7	111.4 (10.1)	85.2 (8.2)
Sulfisoxazol	13	10	109.7 (9.9)	115.7 (7.2)
Sulindac	8	23	94.9 (13.8)	106.8 (8.3)
Terbutaline	-2	14	87.4 (8.3)	79.9 (5.9)
Thiabendazole	15	20	77.2 (9.3)	120.6 (36.4)
Tilmicosin	20	22	75.8 (5.7)	78.6 (6.2)
Tolfenamic Acid	-11	19	116.8 (31.3)	119.3 (12.9)
Trimethoprim	10	20	73.1 (6.2)	79.5 (7.1)

A fin de corroborar los resultados obtenidos y comprobar la eficacia de la etapa de limpieza efectuada en ambos tratamientos, se compararon los blancos obtenidos en cada uno de los tratamientos de muestra con un blanco de disolvente, H₂O:MeOH (80:20). Para ello, se utilizó un Cromatógrafo de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia acoplado a un detector de alta resolución con analizador de tiempo de vuelo (UHPLC-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. Así se obtuvo el Cromatograma Total de Iones (TIC) de cada uno de los tratamientos.

Indicar que, para la obtención de cada uno de los extractos en blanco de cada uno de los tratamientos, se sigue un proceso que requiere la evaporación y redisolución del extracto, esto es necesario porque se deben comparar blancos que tengan la misma composición que el blanco de disolvente, la cual ya ha sido previamente optimizada. El procedimiento seguido se detalla a continuación, teniendo en cuenta que al final de

ambos tratamientos de muestra el disolvente en el que se encuentra el extracto de leche es acetonitrilo. Se tomó una alícuota de 1 mL de cada extracto blanco y se introdujo en el evaporador a una temperatura de 40°C durante media hora. Después se reconstituyó en 1 mL de H₂O:MeOH (80:20). Tras agitar unos segundos empleando el vortex, cada extracto se analizó cromatográficamente.

En la Figura 20, puede verse la superposición de los tres TIC obtenidos, en ella puede apreciarse que el tratamiento con el que se consigue un extracto más limpio, es decir, el que presenta un TIC más 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. En otras palabras, gracias a estos cromatogramas podemos ver el número total de interferentes que pueden quedar después de los respectivos tratamientos de muestra. En esta figura, se observa también que, el tratamiento que presenta mayor número de interferentes es el que corresponde al EMR-Lipid, ya que en la zona comprendida entre el minuto 6 y el 8.5, el número de interferentes es mayor que en el cromatograma correspondiente al tratamiento con HLB PRiME.

Por tanto, se puede concluir que ambas son técnicas sencillas, rápidas y eficaces; con lo que podría ser una alternativa 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.

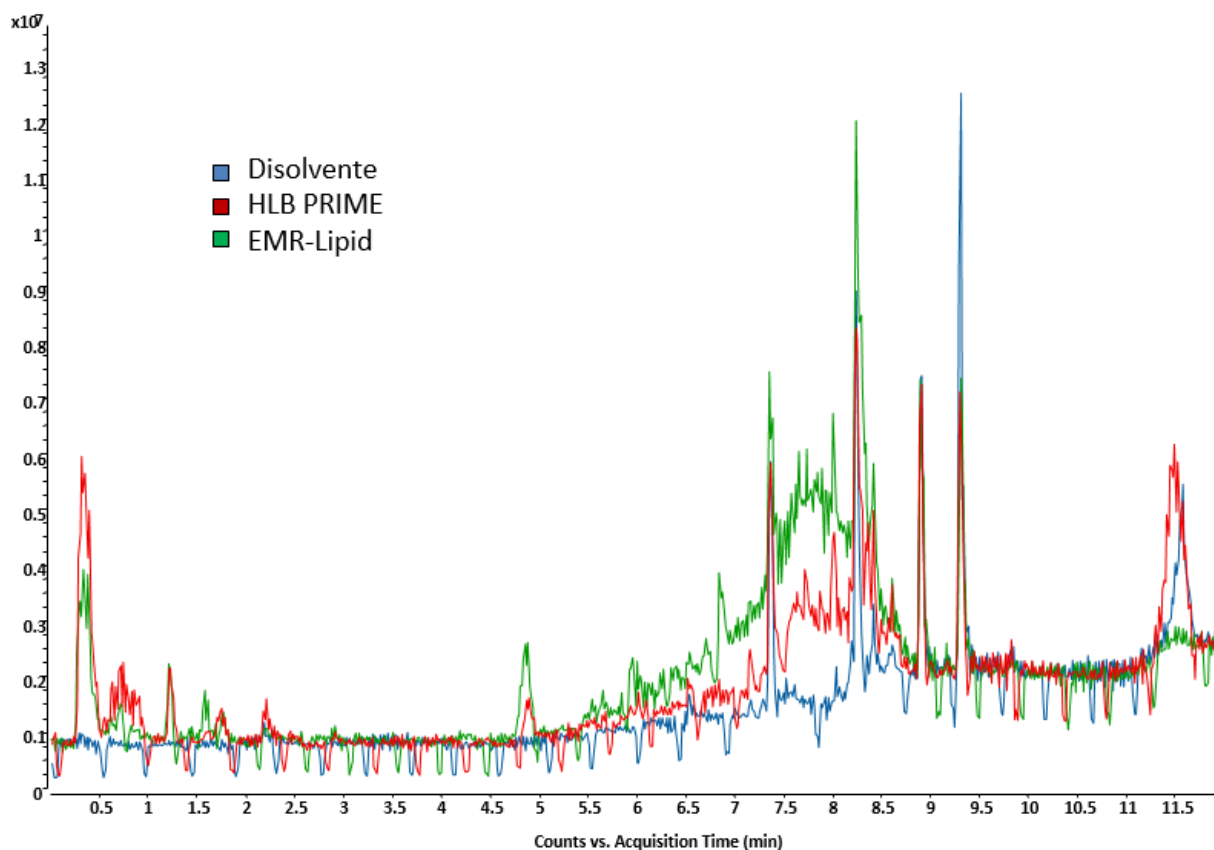


Figura 20. Superposición de los TIC obtenidos mediante el análisis en modo full scan de los blancos en un equipo UHPLC-TOF-MS para el blanco de disolvente estándar H₂O:MeOH (80:20) (azul), blanco de matriz Oasis HLB (rojo) y blanco de matriz EMR-Lipid (verde).

4.3. Validación del Método

Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la validación de ambos métodos la precisión (intra-day e inter-day) y el límite de cuantificación (LOQ). Estos parámetros aparecen en las Tablas 8 y 9, en esta última también se incluye el límite máximo de residuo para poder establecer una comparación con el LOQ.

- **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 desviación estándar relativa (RSD).

La precisión tiene en cuenta dos factores:

- La Reproducibilidad (Intra-day) tiene en cuenta la dispersión de los resultados de análisis independientes realizados en el mismo día. Se toma el nivel de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada recta de calibrado en matriz con dilución final 1:50 y se analiza cromatográficamente 9 veces ($n=9$).
- La Repetibilidad (Inter-day) 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 ($n=9$).

Los resultados de la precisión de cada método para cada uno de los analitos expresados en % RSD se encuentran en la Tabla 8. 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.

Tabla 8. Parámetros de precisión del método.

Compuesto	Intra-day (%RSD)		Inter-day (%RSD)	
	HLB PRiME	EMR-Lipid	HLB PRiME	EMR-Lipid
Acephate	6.3	5.2	17.7	8.7
Acetamiprid	3.4	2.5	10.2	9.5
Albendazole	1.3	3.5	8.4	6.9
Albendazole Sulfone	3.7	3.9	6.0	6.3
Albendazole Sulfoxide	2.3	1.6	6.6	5.8
Altrenogest	4.2	2.6	13.5	9.7
Ampicillin	7.7	6.1	4.3	6.7
Betamethasone	7.8	7.1	11.1	4.0
Cefaclor	6.1	11.2	17.2	11.1
Cefazolin	4.8	10.5	18.2	13.9
Ceftiofur	8.5	7.1	10.5	7.9
Ciprofloxacin	3.8	2.5	6.6	7.3
Clenbuterol	3.6	1.6	7.8	7.2
Cloxacillin	3.2	3.5	3.3	3.9
Colchicine	5.9	3.7	6.5	7.4
Danofloxacin	5.4	2.9	16.4	13.7
Dapsone	1.8	2.1	8.5	5.8
Diclofenac	5.3	3.3	7.7	5.1
Difloxacin	4.0	2.5	13.2	5.1

Digoxin M-H	15.9	16.7	16.5	18.3
Dimetridazole	2.1	2.7	4.0	2.7
Enoxacin	3.4	2.6	11.4	8.8
Enrofloxacin	2.7	4.0	15.0	11.1
Eprinomectin	4.5	3.6	9.3	6.2
Erythromycin	12.7	7.2	19.4	18.2
Famotidine	4.3	2.5	3.1	2.9
Febantel	4.4	2.9	4.9	7.2
Febendazole	3.7	4.8	8.1	7.2
Fenthion	7.8	8.6	7.8	10.7
Fleroxacin	2.8	3.0	9.1	6.8
Imidacloprid	3.0	4.5	9.6	9.6
Josamycin	5.2	7.9	11.9	7.3
Leucomalachite Green	7.7	7.1	14.3	11.2
Levamisole	2.5	2.6	8.3	8.8
Lincomycin	1.7	2.6	5.5	6.9
Lomefloxacin	3.4	3.1	5.4	3.9
Malachite Green	3.9	3.0	6.6	7.7
Marbofloxacin	8.3	6.2	12.2	6.6
Mebendazole	3.8	2.9	3.7	4.9
Metronidazole	2.5	2.0	2.7	2.6
Nandrolone	8.3	8.4	7.6	7.4
Ofloxacin	4.9	3.4	9.9	5.8
Orbifloxacin	5.0	4.3	7.1	3.3
Oxfendazole	3.7	2.7	4.8	6.1
Oxybendazole	2.7	3.2	7.4	8.0
Paclobutrazol	4.5	4.3	2.9	5.2
Penicillin G	9.0	7.2	7.9	5.6
Phenylbutazone	4.2	5.7	9.0	11.8
Phenylthiouracil	8.9	7.3	7.6	7.2
Prednisolone	9.0	7.8	10.9	8.4
Ractopamine	2.3	1.7	3.2	3.2
Rifaximin	6.0	5.1	7.6	7.1
Roxithromycin	1.4	1.3	8.2	10.1
Sarafloxacin	5.3	3.4	5.3	3.9
Spinosyn A	2.6	2.8	9.7	9.6
Spinosyn D	3.8	3.2	10.1	8.7
Sulfabenzamide	3.5	3.6	9.4	6.3
Sulfaguanidine	3.5	2.8	8.1	5.9
Sulfisoxazol	4.3	4.5	6.3	7.5
Sulindac	6.4	3.9	3.8	3.1
Terbutaline	2.7	3.0	4.4	3.5
Thiabendazole	2.7	4.1	9.8	8.3
Tilmicosin	5.8	5.0	6.8	6.1
Tolfenamic Acid	4.7	3.7	4.2	4.2
Trimethoprim	2.6	1.5	8.2	6.7

• Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la menor concentración de analito que puede cuantificarse con suficiente fiabilidad. El LOQ fue calculado mediante el uso del software Xcalibur con el que se obtuvo la relación señal/ruido (S/N). El LOQ es diez veces la relación S/N. En la Tabla 9 se encuentran los datos del LOQ de cada compuesto de los dos métodos comparados, además para la comparación de estos datos con los límites legales, se ha incluido en esta tabla los MRLs vigentes para cada compuesto. Los MRLs de los compuestos son los que aparecen en el reglamento vigente sobre antibióticos (Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión, 2009) y en el reglamento vigente sobre plaguicidas (Reglamento (CE) N° 396/2005, 2005), ya que algunos de ellos también suelen emplearse como insecticidas. Como puede observarse, los LOQs obtenidos para la mayoría de los compuestos fueron inferiores a los MRLs establecidos por la legislación vigente.

Tabla 9. Límites de cuantificación para cada compuesto según los métodos aplicados y límite máximo de residuo de cada compuesto.

Compuesto	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)		MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
	HLB PRiME	EMR-Lipid	
Acephate	3.33	6.21	20
Acetamiprid	0.12	0.10	10
Albendazole	0.06	0.06	100
Albendazole Sulfone	0.17	0.27	100
Albendazole Sulfoxide	0.67	0.66	100
Altrenogest	0.20	0.25	10
Ampicillin	3.11	2.59	4
Betamethasone	1.22	0.96	0.30
Cefaclor	23.97	42.61	NO LEGISLADO
Cefazolin	2.38	9.19	50
Ceftiofur	0.84	0.38	100
Ciprofloxacin	2.08	1.45	100 (*)
Clenbuterol	0.05	0.11	0.05
Cloxacillin	0.39	0.42	30
Colchicine	0.31	0.29	SUSTANCIA PROHIBIDA
Danofloxacin	0.35	0.18	30
Dapsone	7.18	2.97	SUSTANCIA PROHIBIDA
Diclofenac	0.98	1.88	0.10
Difloxacin	0.30	0.32	SUSTANCIA PROHIBIDA
Digoxin	1.61	2.33	NO LEGISLADO
Dimetridazole	1.33	0.92	SUSTANCIA PROHIBIDA
Enoxacin	1.45	1.54	NO LEGISLADO
Enrofloxacin	0.35	0.23	100 (*)

Eprinomectin	0.09	0.36	20
Erythromycin	1.75	4.79	40
Famotidine	0.16	0.08	NO LEGISLADO
Febantel	0.02	0.04	10
Febendazole	0.16	0.09	10
Fenthion	7.50	5.52	10
Fleroxacin	1.59	1.31	NO LEGISLADO
Imidacloprid	1.74	3.88	100
Josamycin	0.82	0.31	NO LEGISLADO
Leucomalachite Green	0.08	0.03	NO LEGISLADO
Levamisole	0.44	0.47	NO LEGISLADO
Lincomycin	0.67	0.41	150
Lomefloxacin	1.01	1.42	NO LEGISLADO
Malachite Green	0.03	0.02	NO LEGISLADO
Marbofloxacin	3.17	1.99	75
Mebendazole	0.04	0.08	10
Metronidazole	0.42	0.25	SUSTANCIA PROHIBIDA
Nandrolone	7.89	5.79	NO LEGISLADO
Ofloxacin	0.97	1.09	NO LEGISLADO
Orbifloxacin	0.31	0.22	NO LEGISLADO
Oxfendazole	0.24	0.21	10
Oxibendazole	0.05	0.04	NO LEGISLADO
Paclobutrazol	0.04	0.11	20
Penicillin G	7.27	4.02	NO LEGISLADO
Phenylbutazone	1.47	2.10	NO LEGISLADO
Phenylthiouracil	5.78	18.25	NO LEGISLADO
Prednisolone	1.90	5.97	6
Ractopamine	1.47	1.77	NO LEGISLADO
Rifaximin	0.03	0.63	60
Roxithromycin	0.26	0.06	NO LEGISLADO
Sarafloxacin	1.23	1.10	NO LEGISLADO
Spinosyn A	0.02	0.02	20 (**)
Spinosyn D	0.05	0.04	20 (**)
Sulfabenzamide	0.31	0.26	NO LEGISLADO
Sulfaguanidine	3.44	2.31	NO LEGISLADO
Sulfisoxazol	0.98	1.60	NO LEGISLADO
Sulindac	0.27	0.29	NO LEGISLADO
Terbutaline	0.14	0.14	NO LEGISLADO
Thiabendazole	0.07	0.10	100
Tilmicosin	0.04	0.01	50
Tolfenamic Acid	2.09	2.10	50
Trimethoprim	0.28	0.21	50

(*) Según el Reglamento (UE) 37/2010 el MRL corresponde a la suma de enrofloxacin y ciprofloxacin y no debe ser superior a 100 µg kg⁻¹.

(*) Según el Reglamento (CE) 396/2005 el MRL corresponde al Spinosad (suma de Spinosyn A y Spinosyn D) y no debe ser superior a 20 µg kg⁻¹.

4.4. Estudio de muestras reales

Atendiendo a los resultados, se podría escoger cualquiera de los dos tratamientos de muestra evaluados para el análisis de las muestras reales. Se decidió escoger el tratamiento HLB PRiME, atendiendo a razones económicas y medioambientales y de reducción del tiempo requerido para tratamiento. Esto es, porque, al tener un menor número de etapas, el consumo de materiales, reactivos y, consecuentemente, de tiempo es menor.

Se estudió 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 10 y fueron adquiridas en supermercados locales.

Tabla 10. Muestras de leche analizadas; E: entera; S: semidesnatada; D: desnatada.

Muestra	Marca	Muestra	Marca
1	Aliada E.	13	Milsani E.
2	Milbona Sin Lactosa D.	14	El Corte Inglés Sin Lactosa D.
3	Muuu E.	15	La Vaquera E.
4	Levasa E.	16	Hacendado E.
5	Eliges Sin Lactosa S.	17	Puleva Enriquecida en Calcio E.
6	Central Lechera Asturiana Sin Lactosa S.	18	El Corte Inglés Enriquecida en Calcio E.
7	Levasa S.	19	DIA E.
8	Alteza E.	20	Puleva Omega 3 Nueces D.
9	Pascual E.	21	Puleva Omega 3 Avena D.
10	Carrefour Discount E.	22	Puleva Omega 3 Almendras D.
11	Carrefour E.	23	Puleva E.
12	Covap E.	24	Gaza Leche de Oveja S.

Para la cuantificación se tuvieron en cuenta las exigencias de la legislación vigente (Decisión de la Comisión 2002/657/EC, 2002). Esto es que el tiempo de retención del compuesto no varíe más de ± 0.1 min respecto al tiempo de retención obtenido cuando se optimizó el método (Tabla 11). Además de que la relación entre las intensidades de los fragmentos de cuantificación y confirmación, es decir la ratio, fuese el mismo que en el calibrado en disolvente con una tolerancia del $\pm 30\%$. Con el fin de ilustrar

cómo se hizo la cuantificación y mostrar uno de los analitos que se puede cuantificar en la Figura 21 aparecen los picos cromatográficos del ión de cuantificación (Q) y del de Confirmación (C) del compuesto danofloxacin, tanto en disolvente como en la muestra 4, Levasa Entera.

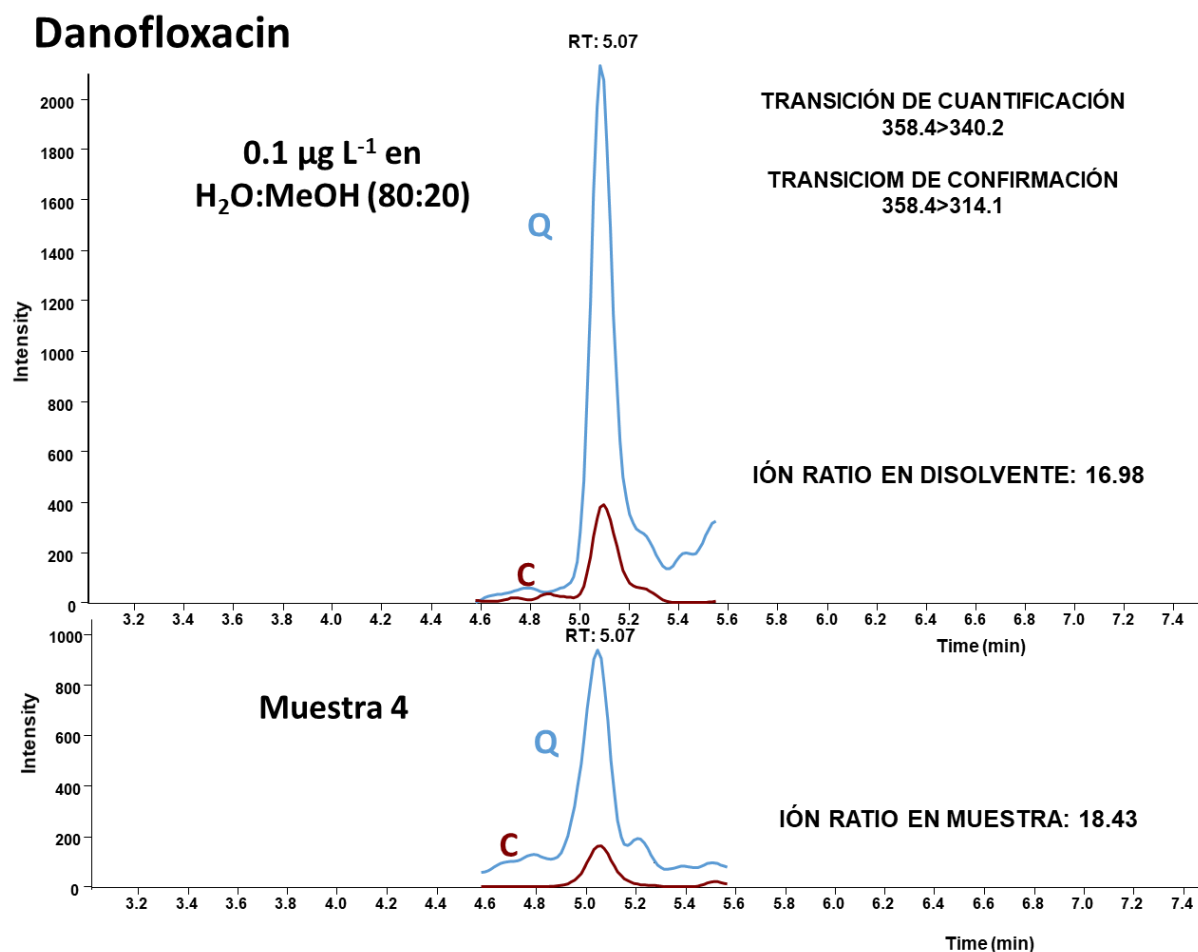


Figura 21. Picos correspondientes a las transiciones MRM y el ión ratio del compuesto danofloxacin en: disolvente con una concentración de 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (arriba) y la muestra 4 (abajo)

Así, las muestras que dieron positivo en residuos de medicamentos veterinario en este estudio son las que se observan en la Tabla 11.

Tabla 11. Positivos en residuos veterinarios en distintas marcas comerciales de leche.

Compuesto	Muestra	Concentración ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Albendazol	Levasa Entera	0.59	0.06	100
	Hacendado Entera	0.37	0.06	100
Danofloxacin	Aliada Entera	2.68	0.35	30
	Levasa Entera	2.05	0.35	30
	Eliges sin lactosa Semidesnatada	2.53	0.35	30
	Hacendado Entera	3.79	0.35	30
Fenbendazol	Levasa Entera	2.01	0.16	10
	Puleva Omega 3 Nueces Desnatada	0.81	0.16	10
	Puleva Enriquecida en Calcio Entera	0.34	0.16	10
Lincomycin	Covap Entera	1.91	0.67	150
	Puleva Enriquecida en Calcio Entera	10.20	0.67	150
Paclobutrazol	Muuu Entera	2.90	0.04	20
	Levasa Entera	3.11	0.04	20
Rifaximin	Milbona Sin Lactosa Desnatada	0.32	0.03	60
Spinosyn A	Milbona Sin Lactosa Desnatada	1.35	0.02	20*
	Muuu Entera	2.41	0.02	20*
Spinosyn D	Milbona Sin Lactosa Desnatada	3.42	0.05	20*
	Muuu Entera	4.48	0.05	20*

(*) Según el Reglamento (CE) 396/2005 el MRL corresponde al Spinosad (suma de Spinosyn A y Spinosyn D) y no debe ser superior a $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

En esta tabla, se observa que se detectan y cuantifican 8 compuestos utilizados como medicamentos veterinarios. Como en todos los casos su concentración está por encima del límite de cuantificación del método se puede considerar que es un resultado fiable. Aunque estos residuos de medicamentos veterinarios puedan cuantificarse, no suponen un positivo ni una alerta alimentaria ya que no superan el límite máximo de residuo establecido para cada uno de ellos. Destacar que con respecto a los compuestos Spinosyn A y D, cuyo MRL es conjunto ya que la formulación comercial utilizada incluye a los dos compuestos, se detectan en la misma leche los dos compuestos, aunque, sumando la concentración de ambas en cada una de las muestras no se supera el límite de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$.

5. CONCLUSIONES

Tras la realización de este Trabajo de Fin de Máster se puede afirmar que:

- 1) Se ha optimizado un método de análisis multiresiduo 66 medicamentos veterinarios mediante UHPLC-MS/MS.
- 2) Se comprueba que los dos tratamientos de muestra propuestos, HLB PRiME y EMR-Lipid, son eficaces para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en leche.
- 3) Se obtienen porcentajes de recuperación adecuados para los 66 compuestos con ambos tratamientos de muestra y que, para la mayoría de compuestos, el efecto matriz es nulo o suave.
- 4) El método es preciso, estable y reproducible.
- 5) Los bajos límites de cuantificación consiguen cuantificar los analitos por debajo de su MRL.
- 6) Se encuentran residuos de 8 compuestos utilizados como medicamentos veterinarios en 9 marcas de leche distintas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- 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):412-31
- 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.
- 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
- Bohm, D. A.; Stachel, C. S. & Gowic, P. (2009). *Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC*.
- 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.
- International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- 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.
- Li, J.; Ren, X.; Diao, Y.; Chen, Y.; Wang, Q.; Jin, W.; Zhou, P.; Fana, Q.; Zhanga, Y & Liua, H. (2018). *Multiclass analysis of 25 veterinary drugs in milk by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Food Chemistry. 257, 259-264.
- 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 Mundial de la Salud (OMS). Centro de Prensa. (02/2017). *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. (02/2018). *Resistencia a los antibióticos*. Disponible en web: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
 - Organización Mundial de la Salud (OMS). Centro de Prensa. (09/2017). *Un informe de la OMS confirma que el mundo se está quedando sin antibióticos*. Disponible en web: <http://www.who.int/es/news-room/detail/20-09-2017-the-world-is-running-out-of-antibiotics-who-report-confirms>
 - 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/>
 - 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
 - Organización Mundial de la Salud (OMS). (01/2017). *Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos*.
 - Organización Mundial de la Salud (OMS). (09/2017). *Antibacterial agents in clinical development – an analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*.
 - 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.
 - Seijja, 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.
 - 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. (1990). *Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo*.
 - Unión Europea. (1996). *Directiva 96/23/CE del Consejo*.
 - Unión Europea. (2001). *Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo*.
 - 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. (2009). *Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo*.
 - Unión Europea. (2009). *Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión*.
 - Valsecchia, M. E. & Malgor, L. A. (2000). *Farmacología Médica*. Volumen 4. Capítulo 7. *Analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios no esteroides (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.
 - Zhou, J.; Xu, J. J.; Cong, J. M.; Cai, Z. X.; Zhang, J. S.; Wang, J. L. & Ren, Y. P. (2018). *Optimization for quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of mycotoxins and veterinary drugs by response surface methodology for application to egg and milk*. J. Chromatogr. A, 1532 20-29.

7. ANEXOS

7.1. Abreviaturas

AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
AINE / NSAID	Antiinflamatorios no esteroideos / Nonsteroidal anti-inflammatory drugs
CID Gas	Collision Induced Dissociation Gas
d-SPE	Extracción en Fase Sólida Dispersiva
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMR	Enhanced Matrix Removal
ESI	Ionización por electrospray
GC-MS	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
HLB	Hidrophilic Lipophilic Balanced
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Elevada Eficacia
UHPLC-MS/MS	Cromatografía de Líquidos de Elevada Eficacia acoplada a Espectrometría de Masas
IP	Puntos de Identificación
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas
LLE	Extracción Líquido-Líquido
LOQ	Límite De Cuantificación
MeCN / ACN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
MRL	Límite Máximo de Residuo
MRM	Multiple Reaction Monitoring

MRPL	Límites Mínimos de Funcionamiento
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCB	Bifenilos policlorados
PRIME	Process Robustness improvements in Matrix effects Easy of use
PSA	Amina Primaria Secundaria
PTFE	Politetrafluoroetileno
Q	Cuadrapolo
QqQ	Triple cuadrapolo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe
RAM	Resistencia a los antimicrobianos
rpm	Revoluciones Por Minuto
RSD	Desviación estándar
SPE	Extracción en Fase Sólida
TCA	Ácido Tricloroacético
TIC	Total Ion Chromatogram
TLC	Cromatografía de Capa Fina
TOF	Tiempo De Vuelo
UE	Unión Europea
UHPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia
UHPLC-MS/MS	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem
UHPLC-TOF-MS	Cromatografía de Líquidos de Ultra-Elevada Eficacia con detector de Tiempo De Vuelo