



UNIVERSIDAD  
POLITECNICA  
DE VALENCIA

MÁSTER EN PRODUCCIÓN ANIMAL

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE  
UN MÉTODO ANALÍTICO DE  
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE  
ALTA EFICACIA CON DETECCIÓN  
POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS  
PARA LA DETERMINACIÓN DE  
ANTIINFLAMATORIOS NO  
ESTEROIDEOS EN LECHE Y TEJIDO  
MUSCULAR DE ORIGEN ANIMAL**

Tesis de Máster  
Valencia, Septiembre 2012  
**Ana Giménez Pérez**

Director:  
Dr. Francisco Moragues Ribes  
Directora:  
Dra. Pilar Hernández Pérez



# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>11</b>
1. Descripción del Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) – Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV).	13
2. Residuos de medicamentos veterinarios.	15
2.1. Legislación y normativas sobre residuos de medicamentos de uso veterinario.	15
2.2. Análisis y controles realizados en la Unidad de Residuos de medicamentos veterinarios del LSPV.	19
3. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).	21
3.1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos.	23
3.2. Legislación y control de la utilización de antiinflamatorios no esteroideos.	24
3.3. Metodologías para el análisis de antiinflamatorios no esteroideos.	27
4. Cromatografía líquida rápida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS).	30
4.1. Técnica de cromatografía líquida (LC).	30
4.2. Introducción a la espectrometría de masas (MS).	31
4.3. Acoplamiento LC-MS.	33
4.4. Equipos de espectrometría de masas tipo MS <sup>n</sup> o MS/MS.	35
<b>OBJETIVOS</b>	<b>37</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>41</b>
1. Procedimiento para la validación de métodos analíticos.	43
1.1. Introducción.	43
1.2. Definiciones.	44
1.3. Determinación y cálculo de los parámetros de validación.	46
2. Descripción del método analítico desarrollado para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en músculo y leche por UPLC-MS/MS.	48
2.1. Alcance del método.	48
2.2. Materiales, reactivos y equipos.	48
2.3. Preparación de los patrones, la muestra y el cromatógrafo.	50
2.4. Realización del método.	52
2.5. Tratamiento y expresión de los resultados.	56
2.6. Control de calidad.	58

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>59</b>
1. Desarrollo de un método analítico para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) no autorizados en sanidad animal en leche.	61
2. Determinación de carboxiibuprofeno, piroxicam, naproxeno, oxifenilbutazona, ácido niflúmico, flurbiprofen, suxibuzona, indometacina, fenilbutazona, ácido mefenámico, ácido flufenámico y ácido meclofenámico, en leche y tejido muscular por UPLC-MS/MS.	64
2.1. Validación del método.	77
2.2. Comparación de los límites establecidos con los de otras metodologías analíticas.	84
2.3. Control del factor respuesta.	85
2.4. Control de los patrones internos de las muestras.	85
2.5. Confirmación.	89
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>91</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO</b>	<b>101</b>

# **RESUMEN**



Se ha desarrollado un método analítico para la determinación de 12 antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en leche y tejido muscular de origen animal. Los AINEs investigados son los siguientes: carboxiibuprofeno (CXIBP), piroxicam (PIR), naproxeno (NPX), oxifenilbutazona (OPBZ), ácido niflúmico (NFL), flurbiprofen (FBP), suxibuzona (SBZ), indometacina (IND), fenilbutazona (PBZ), ácido mefenámico (MEF), ácido flufenámico (FFA) y ácido meclofenámico (MCF). Los 12 AINEs determinados son fármacos no autorizados en animales productores de alimentos y no tienen Límite Máximo de Residuos (LMR), pero se han tenido en cuenta los Límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) que se recomiendan para 4 de ellos (MEF, PBZ, NPX y OPBZ).

Las principales dificultades para la extracción y determinación de AINEs de matrices biológicas son la presencia de grasa y las estrechas interacciones de estos fármacos con las proteínas. Se han probado varios procedimientos para la extracción y purificación de las muestras de leche, obteniendo las mejores recuperaciones de los analitos mediante una extracción con metanol y la utilización de cartuchos de SPE (Extracción en Fase Sólida). El procedimiento de preparación de las muestras de tejido muscular se realiza mediante una hidrólisis química y una purificación de las muestras con los mismos cartuchos de SPE utilizados para las muestras de leche. Los análisis se han llevado a cabo con la utilización de un equipo de cromatografía líquida rápida de alta eficacia asociado a un espectrómetro de masas (UPLC-MS/MS).

Se han estudiado los parámetros de selectividad/especificidad, límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y capacidad de detección ( $CC\beta$ ) del método para validarlo de acuerdo con la Decisión de la Comisión 657/2002/EC y acreditarlo por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), con la finalidad de ponerlo en funcionamiento en los análisis de muestras oficiales del Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV).

Con los procedimientos de extracción y purificación de ambas matrices se han conseguido unas buenas recuperaciones de todos los analitos. El método es sensible y selectivo, y los límites de decisión ( $CC\alpha$ ) establecidos se encuentran entre un mínimo de 2.5  $\mu\text{g/Kg}$  para ácido niflúmico, fenilbutazona y piroxicam, y un máximo de 20  $\mu\text{g/Kg}$  para flurbiprofen.



# **INTRODUCCIÓN**



## **1. Descripción del Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) – Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV).**

El Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP) es una institución pública de la Generalidad de la Comunidad Valenciana y se encuentra adscrito a la Consejería de Sanidad. Su objetivo es desarrollar y coordinar los proyectos científicos que se propongan en la Dirección General de Salud Pública (DGSP).

El centro se creó a partir de la Ley 4/2005, de 17 de junio, de Salud Pública de la Comunidad Valenciana [1] y se rige por el Decreto del Consejo 120/2008, del 5 de Septiembre [2]. Presenta como finalidad coordinar los proyectos de investigación orientados al soporte científico de las políticas de salud pública comunitarias y desarrollar nuevos métodos, de modo que estos se apliquen en el ámbito de Salud Pública, permitiendo incrementar el nivel de salud de los ciudadanos.

En el CSISP se incluyen diferentes áreas de investigación:

- Ambiente y Salud.
- Cáncer y Salud Pública.
- Desigualdades en Salud.
- Enfermedades Raras.
- Genómica y Salud.
- Investigación en vacunas.
- Seguridad Alimentaria.
- Servicios de Salud.
- Salud Global.

El área en la que he realizado las prácticas es la de Seguridad Alimentaria, que se compone de un jefe de área y 14 investigadores, personal de la Dirección General de Salud Pública (DGSP) y, a su vez, del Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV). El área de Seguridad Alimentaria tiene la función de controlar y prevenir los principales peligros que pueden causar los productos alimenticios en la salud del consumidor, estos pueden ser debidos a una contaminación microbiológica, la presencia de toxinas bacterianas, el uso de aditivos, la presencia de contaminantes ambientales o industriales y los residuos procedentes de medicamentos, de plaguicidas o de sustancias químicas procedentes de la fase de envasado del producto alimenticio.

Esta área se compone de 4 líneas de investigación:

- Desarrollo de nuevos métodos de extracción de contaminantes orgánicos (PAHs, PCBs, PBDEs,...) en alimentos y matrices ambientales.
- Desarrollo de nuevos métodos analíticos, mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS), para la determinación de contaminantes orgánicos y residuos de medicamentos veterinarios.
- Desarrollo de métodos analíticos y de muestreo para el control de plaguicidas en aire ambiental, y evaluación de los impactos en los alimentos.

- Evaluación del riesgo derivado de la presencia de contaminantes en los alimentos.

Mi tutor, el Dr. Francisco Moragues Ribes, trabaja como veterinario investigador en la línea de investigación sobre el desarrollo de nuevos métodos analíticos, mediante HPLC-MS/MS, para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios.

A través de la investigación en esta línea de trabajo se ha alcanzado el desarrollo de nuevas metodologías analíticas de gran sensibilidad, especificidad y con capacidad de confirmación basados en el uso de la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a la espectrometría de masas en tándem (MS/MS), para el análisis de contaminantes de gran interés en seguridad alimentaria y cuyo control ha sido establecido en los últimos años por la Unión Europea mediante distintos Reglamentos.

Los análisis rutinarios para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios se realizan en la Unidad de Residuos de Medicamentos Veterinarios del Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV), donde además se trabaja en esta línea de investigación del CSISP.

Los Laboratorios de Salud Pública se crearon para realizar el control y la prevención de los problemas sanitarios que pueden presentarse en la población, en el caso de los productos alimenticios, para asegurar la calidad y seguridad alimentaria tanto en el sector de química como en el de microbiología.

Según el Programa de Vigilancia Sanitaria de Alimentos y de acuerdo con los principios del Reglamento (CE) 882/2004 [3], se procesa el control oficial de los alimentos mediante la toma de muestras y sus análisis.

El objetivo general de los laboratorios es garantizar la verificación del cumplimiento de la normativa dirigida para prevenir, eliminar o reducir a niveles aceptables los riesgos para la salud de las personas y los animales.

El Laboratorio de Salud Pública de Valencia (LSPV) se encuentra situado en la Avda. Cataluña nº 21 de Valencia (C.P. 46 020). Los responsables son: el jefe de sección D. Pedro Martí, y las jefas de negociado D<sup>a</sup>. Carmen Igualada, D<sup>a</sup>. Carmen González, y D<sup>a</sup>. Marisa Camaró. Este laboratorio se divide en diferentes unidades, que se nombran a continuación:

- Unidad de Registro (D. Pedro Martín).
- Unidad de Garantía y Calidad (D. Pedro Martí).
- Unidad de Microbiología (D<sup>a</sup> Marisa Camaró).
- Unidad de Contaminantes Orgánicos (D<sup>a</sup> Carmen González).
- Unidad de Residuos de Medicamentos Veterinarios (D<sup>a</sup> Carmen Igualada).
- Unidad de Química de Aguas y Alimentos (D<sup>a</sup> Carmen Igualada).
- Unidad de Análisis de Metales (D<sup>a</sup> Carmen González).

## **2. Residuos de medicamentos veterinarios.**

En animales productores de alimentos se utiliza una gran variedad de productos farmacológicos para diferentes fines, ya sean terapéuticos o zootécnicos. La utilización de la mayoría de estos fármacos puede repercutir en la presencia de residuos medicamentosos (principio activo del fármaco o sus metabolitos) en los alimentos procedentes de animales tratados.

En la mayoría de los casos, la utilización de medicamentos en ganadería es necesaria para garantizar la salud y el bienestar de los animales, pero cuando se utilizan de manera fraudulenta, indiscriminada y abusiva, la entrada de residuos en la cadena alimentaria puede suponer un grave riesgo para la salud de los consumidores [4]. Las Buenas Prácticas de Manejo en producción animal, la utilización racional de los medicamentos de uso veterinario y respetar los tiempos de espera, permiten disminuir o eliminar los residuos hasta niveles aceptables en el organismo animal antes del ordeño o del sacrificio.

La presencia de residuos veterinarios en los alimentos de origen animal constituye una preocupación creciente en el ámbito de la Salud Pública y los consumidores. Existen estudios que demuestran que estos residuos pueden ser perjudiciales dando lugar a diversos trastornos en los consumidores, como alergias, inhibiciones terapéuticas, daños fisiológicos, teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad, cambios morfo-fisiológicos y resistencias microbianas [4], por lo que se establecen parámetros que garanticen que aun consumiendo durante toda la vida de una persona alimentos con cierto nivel de residuos, en límites inferiores a los establecidos, no produzcan ningún riesgo, y se prohíben aquellos residuos medicamentosos que puedan ser considerados sustancias de elevado riesgo.

El objetivo principal de la vigilancia de residuos de medicamentos de uso veterinario en alimentos, es evitar que lleguen al consumidor alimentos con residuos de sustancias que puedan tener consecuencias negativas para la salud.

### **2.1. Legislación y normativas sobre residuos de medicamentos de uso veterinario.**

La base de la normativa legal vigente que regula los medicamentos se encuentra en la **Ley 29/2006** de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios [5], donde se define:

- Medicamento de uso veterinario como “toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades animales o que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar sus funciones fisiológicas ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico veterinario”. También se considerarán medicamentos veterinarios las premezclas para piensos medicamentosos elaboradas para ser incorporadas a un pienso.

El principal objetivo de la legislación es que los productos alimenticios obtenidos de animales tratados con medicamentos veterinarios no contengan residuos o metabolitos de los mismos que puedan constituir un peligro para la salud del consumidor. Para ello, la Comisión elaboró el **Reglamento (UE) n° 37/2010** de 22 de diciembre, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos (LMR) en los productos alimenticios de origen animal [6]. En este Reglamento se definen los siguientes términos:

- Residuos de medicamentos veterinarios 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”.
- Límite Máximo de Residuos (LMR) como “el contenido máximo de residuos resultante de la utilización de un medicamento veterinario, expresado en mg/Kg (ppm) o en µg/Kg (ppb) sobre la base del peso en fresco, autorizada en la Comunidad Europea o reconocida en la Comunidad Europea o reconocida como admisible en un producto alimenticio”.

Este Reglamento tiene un Anexo, en el que se muestran:

- Las sustancias autorizadas en producción animal: lista de sustancias farmacológicamente activas para las que se establecen LMRs según la especie y la matriz analizada.
- Las sustancias prohibidas en producción animal: lista de sustancias farmacológicamente activas para las que no puede establecerse límite máximo alguno debido a su elevado riesgo en la población. Las sustancias de prohibida utilización en ganadería que se nombran en este apartado, son las siguientes:
  - *Aristolochia spp.* y sus formulaciones.
  - Cloranfenicol.
  - Cloroformo.
  - Clorpromacina.
  - Colchicina.
  - Dapsona.
  - Dimetridazol.
  - Metronidazol.
  - Nitrofuranos (incluida la furazolidona).
  - Ronidazol.

El Anexo de este Reglamento se modifica continuamente para cambiar o introducir valores de Límite Máximo de Residuos de medicamentos utilizados en animales productores de alimento, así como para introducir sustancias farmacológicamente activas que sean consideradas de alto riesgo y hasta el momento se desconocía su peligrosidad.

En la **Directiva 96/23/CE** del Consejo de 29 de abril, relativa a las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos [7], se clasifican las sustancias farmacológicas en dos grupos, A y B:

GRUPO A: Sustancias con efecto anabolizante y sustancias no autorizadas

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

GRUPO B: Medicamentos veterinarios y contaminantes

1. Fármacos antibacterianos, incluidas las sulfamidas, quinolonas.
2. Otros medicamentos veterinarios:
  - Antihelmínticos.
  - Anticoccidianos, incluidos los nitroimidazoles.
  - Carbamatos y piretroides.
  - Tranquilizantes.
  - Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).
  - Otras sustancias con actividad farmacológica.
3. Otras sustancias y contaminantes medioambientales:
  - Compuestos organoclorados.
  - Compuestos organofosforados.
  - Elementos químicos.
  - Micotoxinas.
  - Colorantes.
  - Otros.

En el presente estudio, se desarrolla un método para determinar antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), un tipo de sustancias farmacológicas que pertenecen al Grupo B según esta Directiva. Este tipo de fármacos se desarrolla más detalladamente en el apartado 3 de la introducción del presente trabajo.

En el **Real Decreto 1749/1998**, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos [8]. En este Real Decreto se crea la Comisión Nacional de Coordinación de Investigación y Control de Residuos o Sustancias en Animales Vivos y sus Productos, se regulan aspectos relativos a las infracciones y sanciones aplicables en caso de incumplimiento, ya que la administración ilegal de sustancias a animales de abasto se considera un delito contra la Salud Pública. También se designan los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR).

Según el **Real Decreto 1945/83**, de 22 de junio, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agroalimentaria [9], en concreto en el Artículo 13 (Inspección), y en el Artículo 16 (Análisis), se detalla como debe realizarse la toma de una muestra oficial y los diferentes análisis que se pueden realizar (inicial, contradictorio y dirimente), como se indica a continuación:

Inicialmente el inspector toma una muestra oficial, de la siguiente forma:

- 1) Levanta un acta formalizada, por triplicado.
- 2) Toma 3 muestras (precintándolas y etiquetándolas adecuadamente, y firmando cada una de ellas).

En el laboratorio se realiza el análisis inicial con el primer ejemplar de la muestra, según métodos acreditados, si en el resultado de este análisis se deduce una infracción a la normativa vigente, se realiza un expediente sancionador, pudiendo ocurrir dos cosas:

- 1) Que el expedientado esté de acuerdo con los resultados, por lo tanto se le aplique la sanción correspondiente.
- 2) Que el expedientado no esté de acuerdo con los resultados y solicite, por su cuenta, la realización de otro análisis, el llamado análisis contradictorio, con el segundo ejemplar de la muestra. Si el resultado de este análisis coincide con el del inicial se aplica la sanción. Si hay un desacuerdo entre los dictámenes de los dos primeros análisis, el órgano competente designa otro laboratorio oficial que realizará, con el tercer ejemplar de la muestra, un tercer análisis con carácter urgente que será un análisis dirimente y definitivo.

La **Decisión de la Comisión 657/2002/CE**, de 12 de agosto, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados, trata sobre el análisis y control de las sustancias medicamentosas [10]. En esta Decisión se indica el período de adaptación del método según el grupo al que pertenece la sustancia (las sustancias del grupo A tienen un período de adaptación de 2 años mientras que las del grupo B de 5), y se especifican los métodos e instrumentos adecuados para la identificación de los diferentes residuos orgánicos o contaminantes.

Por último, es necesario indicar que para la puesta en funcionamiento de un nuevo método desarrollado para la determinación de residuos de medicamentos, éste debe ser validado, según las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea [10], y acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), según la **Norma UNE EN-ISO/IEC 17025** sobre evaluación de la conformidad.

## **2.2. Análisis y controles realizados en la Unidad de Residuos de medicamentos veterinarios del LSPV.**

Actualmente, en el LSPV se realizan análisis para la determinación de los residuos de medicamentos que se nombran en la Tabla 1.1, todos los ensayos están acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), y se encuentran detallados en el Anexo Técnico Rev. 15 del LSPV [11]. Este Anexo se modifica y amplía tras las auditorías realizadas por ENAC.

La próxima auditoría del departamento de Residuos de Medicamentos del LSPV se va a realizar en octubre de 2012, en la que se va a acreditar el método desarrollado en el presente estudio. Como se puede observar en la Tabla 1.1 de la página siguiente, hasta la actualidad se determinaban 4 AINEs en músculo. Tras el desarrollo y validación del método propuesto en este estudio, se ha ampliado la cantidad de analitos a analizar en tejido muscular, y se ha desarrollado un nuevo ensayo para determinar AINEs en leche. En la auditoría que se realizará en octubre de este año, se acreditará el método para la determinación de 12 AINEs tanto en músculo como en leche.

Las cantidades de muestra por analitos a determinar varían anualmente, y los servicios de inspección se encargan de la recogida de las muestras correspondientes. La muestra debe ser aleatoria, representativa y homogénea, y debe llegar al laboratorio en perfecto estado y precintada, además debe tener una etiqueta donde se indique la solicitud del análisis (parámetros solicitados), la naturaleza de la muestra, el nº de muestra, el nº de precinto oficial y el nº de acta.

Tabla 1.1. Ensayos realizados en el LSPV. Se nombran en el Anexo Técnico Rev. 15 del LSPV.

<b>Producto a analizar</b>	<b>Medicamento determinado en el ensayo</b>	<b>Técnica analítica</b>
Orina animal	<b>Corticoesteroides</b> (dexametasona, betametasona, flumetasona, metilprednisolona)	LC-MS/MS
	<b>Hormonas</b> (dienestrol, hexestrol, taleranol, zearalenona, zeranol, $\alpha$ -boldenona, dietilestilbestrol, $\beta$ -boldenona, $\beta$ -nortestosterona, stanozolol, stanozolol-OH, $\alpha$ -nortestosterona)	LC-MS/MS
	<b>Tranquilizantes y b-bloqueantes</b> (acepromacina, azaperona, propionilpromacina, carazolol, clorpromacina)	LC-MS/MS
Músculo animal	<b>Tetraciclinas</b> (clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tetraciclina)	LC-DAD
	<b>Antiinflamatorios no esteroideos</b> (ácido mefenámico, fenilbutazona, naproxeno, oxifenilbutazona)	LC-MS/MS
Músculo de ave y pescado Agua de bebida de animales	<b>Quinolonas</b> (ácido oxonílico, ciprofloxacina, diflozacina, enrofloxacina, flumequina, danoflozacina)	LC-MS/MS
Miel Leche Tejido animal Huevos y ovoproductos	<b>Cloranfenicol</b>	LC-MS/MS
Tiroides Músculo Orina animal	<b>Tireostáticos</b>	LC-MS/MS
Orina animal Hígado animal Piensos Agua de bebida de Animales	<b><math>\beta</math>-agonistas</b> (brombuterol, clenbuterol, clenpenterol, hidroximetilclenbuterol, mabuterol, mapenterol, ractopamina)	LC-MS/MS
Músculo Riñón	<b>Sulfamidas</b>	CL-MS/MS
Músculo Piensos	<b>Nitroimidazoles</b> (dimetridazol, ronidazol, metronidazol, ipromidazol, ipromidazol-OH, dimetridazol-OH, metronidazol-OH)	LC-MS/MS

### **3. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).**

Los antiinflamatorios se utilizan extensamente tanto en medicina humana como en veterinaria. Son un grupo de medicamentos usados debido a su efectividad para suprimir o prevenir la inflamación, tratar alergias, reducir la fiebre y el dolor, entre otras funciones.

Hay una gran variedad de clases de antiinflamatorios que difieren según su acción hacia los mediadores bioquímicos que son liberados durante la inflamación y que provocan la respuesta inflamatoria. Esos mediadores son la histamina, la serotonina, los péptidos, las citoquinas, los eicosanoides, y el factor de activación plaquetaria.

Los antiinflamatorios se dividen en dos categorías principales: antiinflamatorios esteroideos (generalmente corticoides) y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). También existen otros grupos de analgésicos entre los que se encuentran los AINEs como analgésicos no opiáceos, junto con otro grupo de fármacos denominados opioides, entre los que se encuentran la morfina o el fentanilo. Entre las principales clases de antiinflamatorios también se incluyen los antagonistas de bradicinina y kallidina, y los antihistamínicos. Algunos de estos antiinflamatorios actúan antagonizando la acción de los mediadores bioquímicos y otros inhibiendo su producción. En medicina veterinaria, las clases de antiinflamatorios más frecuentemente utilizadas son los corticosteroides y los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

A continuación se explican detalladamente los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), ya que este estudio se basa en la determinación de residuos de este grupo de medicamentos en productos de origen animal:

Los AINEs son un grupo heterogéneo de medicamentos con estructura química diferente pero con efectos bastante semejantes. Se utilizan extensamente tanto en medicina humana como en veterinaria, debido a sus propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Además, tienen la ventaja de no poseer el efecto inmunosupresor que causan los corticosteroides [12]. Sin embargo, pueden causar efectos adversos en el sistema gastrointestinal, hematopoyético y renal. La úlcera gastrointestinal es uno de los efectos secundarios más frecuente y grave, especialmente en casos de sobredosis y abuso crónico. Además, como todos los medicamentos, pueden interaccionar con otros medicamentos y pueden causar reacciones alérgicas. Este tipo de medicamentos se utilizan en animales productores de alimentos para el tratamiento de enfermedades músculo esqueléticas, mastitis, enfermedades pulmonares, enteritis, entre otras.

El mecanismo de acción de los AINEs se basa en la inhibición de la ciclooxigenasa (COX), una enzima que permite sintetizar prostaglandinas a partir del ácido araquidónico. La ciclooxigenasa tiene varias isoformas, las más conocidas son las isoenzimas COX-1 y COX-2, al inhibirlas se impide la formación de prostaglandinas y tromboxanos [13]. La COX-1 tiene la función de sintetizar prostaglandinas protectoras y es constitutiva, mientras que la COX-2 es inducible y aparece durante el desarrollo de un proceso inflamatorio al sintetizar las prostaglandinas que intervienen en la inflamación. Por ello los AINEs que inhiben la acción simultáneamente de la COX 1 y 2, tienen mayor probabilidad de causar hemorragias y úlceras gastrointestinales,

mientras que los AINEs con capacidad selectiva para la COX-2 tienen menos efectos secundarios. Sin embargo, algunos AINEs, como la indometacina o el piroxicam, tienen mayor afinidad por la inhibición de COX-1, por lo que pueden ser todavía más tóxicos que los que inhiben por igual ambas isoenzimas.

Las prostaglandinas son mediadoras de la inflamación (las prostaglandinas sintetizadas por COX-2) pero también tienen funciones protectoras de la mucosa gástrica, el riñón y el endotelio (las prostaglandinas sintetizadas por COX-1). Debido a estas funciones protectoras de las prostaglandinas cuando se administran AINEs, que inhiben tanto a las prostaglandinas protectoras como a las que influyen en el proceso inflamatorio, no solo obtenemos los efectos antiinflamatorios que deseamos sino que también hay efectos adversos por la inhibición de las funciones protectoras.

Por otra parte, también se inhibe la síntesis de tromboxanos, lo que disminuye o impide la agregación plaquetaria, efecto secundario que muchas veces se utiliza para tratar trombos o infartos de miocardio en medicina humana.

Hay que destacar que recientemente se han comenzado a utilizar AINEs con acción inhibitoria selectiva hacia la COX-2, entre ellos el meloxicam, el firocoxib y la nimesulida, que al tener mayor capacidad para inhibir la COX-2 tienen menos efectos secundarios respecto a los inhibidores no selectivos. Aunque uno de los inconvenientes del uso de este tipo de fármacos selectivos es que se tienen que administrar a dosis más altas que los no selectivos para conseguir un mismo efecto antiinflamatorio y, por otra parte, con estos nuevos fármacos se han observado otros efectos secundarios como el aumento del riesgo de padecer problemas cardiovasculares [14].

El uso de AINEs en veterinaria se ha incrementado en los últimos años [12], sobretodo en el tratamiento de mamitis, administrándolos con o sin antibiótico, y su extendida utilización presenta un riesgo potencial para los consumidores del alimento procedente de animales tratados, ya que si el alimento contiene residuos, estos entran en la cadena alimentaria humana y pueden ocasionar trastornos en los consumidores debido a los efectos adversos que presentan, a interacciones con otros medicamentos de los que se esté tratando el consumidor o alergias al medicamento. Por estas razones, es necesario controlar los residuos de los AINEs en productos de origen animal, y desarrollar nuevos métodos para monitorizar la conformidad de las muestras a analizar con la legislación vigente.

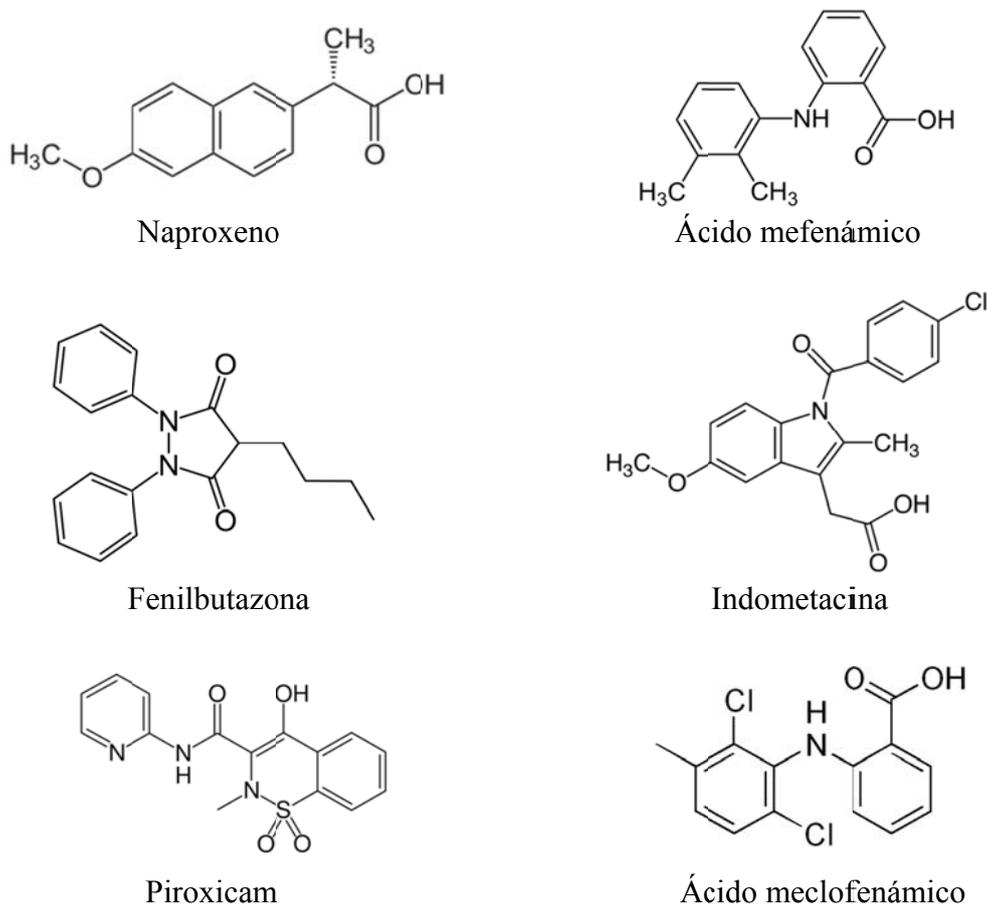
La gran cantidad de análisis necesarios y los bajos límites de residuos de AINEs que se deben detectar, hacen que la técnica preferible para su análisis sea la de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), técnica desarrollada en el apartado 4 de la introducción de este trabajo. Aunque también se han desarrollado métodos por cromatografía de gases y otros tipos de detectores. A pesar de la utilización de instrumentos analíticos tan sensibles, la correcta preparación de las muestras es tan necesaria como el correcto funcionamiento del equipo para obtener unos resultados seguros. Sin embargo, el principal cambio en la determinación de residuos de este tipo de medicamentos es la necesidad de desarrollar procedimientos multi-residuos o multi-analitos, con los que se pueda determinar un amplio número de fármacos, ya que existen una gran cantidad de AINEs en el mercado, y los procedimientos que determinan uno o varios AINEs son muy poco prácticos en el trabajo de rutina de un laboratorio.

### 3.1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos.

Los AINEs se dividen en diferentes grupos según su estructura química (Figura 1.1), a continuación se muestran los grupos más importantes y algunos de los fármacos prototipo de cada grupo [15]:

- **Salicilatos:** ácido acetilsalicílico y ácido metilsalicílico.
- **Paraaminofenoles:** paracetamol.
- **Pirazolonas:** fenilbutazona, oxifenilbutazona, metamizol y suxibuzona.
- **Derivados del ácido indolacético:** indometacina.
- **Derivados del ácido antranílico:** ácido meclofenámico, ácido tolfenámico, flunixin y diclofenaco.
- **Derivados del ácido arilpropionico:** ibuprofeno, carprofeno y naproxeno.
- **Derivados del Oxicams:** piroxicam y meloxicam.

Figura 1.1. Estructura química de algunos AINEs analizados con el método desarrollado en este estudio.



### 3.2. Legislación y control de la utilización de antiinflamatorios no esteroideos.

En el Anexo del Reglamento nº 37/2010 [6], se nombran los AINEs que están permitidos para el tratamiento de animales productores de alimentos, la mayoría tienen establecido un LMR y otros no tienen LMR debido a su inocuidad. Por otra parte, hay muchos AINEs que están prohibidos en ganadería, generalmente debido a que presentan unos efectos adversos y toxicidad más graves que los AINEs autorizados.

En la Tabla 1.2, se detallan los antiinflamatorios no esteroideos autorizados que tienen LMR establecido en la actualidad, según la especie animal y el tejido que se analice. Aunque estos niveles podrían ser modificados con el tiempo para cambiar o introducir valores de LMR.

Tabla 1.2. Límites máximos de residuos (LMRs) establecidos actualmente para los AINEs autorizados en algunas especies y en diferentes tejidos diana. Se encuentran en el apartado de sustancias autorizadas del Anexo del Reglamento nº 37/2010.

Sustancia farmacológicamente activa	Residuo marcador	Especie animal	LMR (µg/Kg)	Tejido diana
Ácido tolfenámico		Bovino	50	Músculo
			50	Leche
		Porcino	400	Hígado
			100	Riñón
Carprofeno	Suma de carprofeno y glucuronido de carprofeno conjugados.	Bovino y équido	500	Músculo
			1000	Grasa
			1000	Hígado
			1000	Riñón
Diclofenaco		Bovino	5	Músculo
			1	Grasa
			5	Hígado
			10	Riñón
			0.1	Leche
		Porcino	5	Músculo
			1	Piel y grasa
			5	Hígado
			10	Riñón

Firocoxib		Équido	10	Músculo
			15	Grasa
			60	Hígado
			10	Riñón
Flunixin	Flunixin	Bovino	20	Músculo
			30	Grasa
			300	Hígado
			100	Riñón
		Porcino	50	Músculo
			10	Piel y grasa
			200	Hígado
			30	Riñón
		Équido	10	Músculo
			20	Grasa
			100	Hígado
			200	Riñón
	5-hidroxi-flunixin	Bovino	40	Leche
Meloxicam	Meloxicam	Bovino, caprino,	20	Músculo
			65	Hígado
		porcino, conejo, y équido.	65	Riñón
		Bovino y caprino.	15	Leche
Metamizol	4- metilaminoantipirina	Bovino, porcino y équido.	100	Músculo
			100	Grasa
			100	Hígado
			100	Riñón
		Bovino	50	Leche
Vedaprofeno		Équido	50	Músculo
			20	Grasa
			100	Hígado
			1000	Riñón

Hay otros AINEs que están autorizados para su utilización en producción animal y no tienen establecido un LMR debido a su inocuidad, como por ejemplo el ácido acetilsalicílico de uso tópico (excepto en animales productores de leche o huevo) y el ketoprofeno en bovino, porcino y équidos [6].

Los AINEs que se van a determinar en este estudio no están permitidos en animales productores de alimentos y no tienen un LMR establecido. Sin embargo, algunos fármacos que están prohibidos y no tienen LMR, tienen un límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL), este límite es el contenido mínimo recomendado de un analito en una muestra que podría ser detectado y confirmado. El MRPL sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido. Este término se define en la Decisión de la Comisión 657/2002 [10], pero la mayoría de MRPL no están legislados, solo se recomiendan en la guía de los laboratorios comunitarios de referencia que realizan los análisis de los analitos que tengan establecido algún MRPL, excepto para la determinación de algunos residuos de medicamentos, como el cloranfenicol (sustancia farmacológica prohibida en producción animal) que tiene establecido un MRPL legislado y de obligatorio cumplimiento.

Tabla 1.3. Límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL), recomendados por los Laboratorios Comunitarios de Referencia de algunos de los antiinflamatorios no esteroideos investigados en el estudio.

<b>Sustancia farmacológicamente activa</b>	<b>Matrices</b>	<b>MRPL (ppb)</b>
Ácido mefenámico		10
Fenilbutazona	Músculo, leche, riñón, hígado	5
Naproxeno	y plasma	10
Oxifenilbutazona		5

### 3.3. Metodologías para el análisis de antiinflamatorios no esteroideos.

En este apartado se describen algunas de las metodologías analíticas que se han desarrollado en los últimos años para la determinación de AINEs en diversas matrices. Los aspectos más importantes de cada método (AINEs determinados, matrices analizadas, técnica analítica utilizada, condiciones de separación, procedimiento de extracción y rendimiento del método) se muestran en la Tabla del Anexo de este trabajo.

Para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos se han utilizado diversas técnicas analíticas, como la cromatografía líquida, la cromatografía de gases, la espectrometría, la fluorimetría, etc. En general, en casi todos los métodos desarrollados recientemente se utiliza la técnica de cromatografía líquida con detección por espectrometría de masas. No obstante, hay varias excepciones en las que se han utilizado otras técnicas, por ejemplo Gallo et al. [16] utilizó un HPLC con detección por fluorescencia, y Fabbrocino et al. [17] desarrolló un método cuantitativo para determinar AINEs de plasma sanguíneo mediante HPLC asociado a un detector de diodos (DAD), y para confirmar los espectros que obtenían del DAD utilizaron un espectrómetro de masas (MS).

Por otra parte, como ya se ha comentado anteriormente, los métodos desarrollados para la determinación de AINEs deben ser multi-residuos (abarcando la detección de un amplio número de analitos en el mismo método), con el fin de ponerlos en funcionamiento en el trabajo rutinario de un laboratorio, aunque todavía no existe ningún método publicado capaz de analizar simultáneamente todos los AINEs autorizados y no autorizados en la UE. De todos los métodos consultados solo hay un caso en el que se determinó un único medicamento, el firocoxib en leche de bovino [14], en los demás estudios se determinaron desde 4 [18,19] hasta 30 analitos [20] simultáneamente.

A continuación se detalla la metodología analítica descrita para el análisis de estos fármacos en leche.

Dowling et al. [14], analizaron firocoxib en leche de bovino, un AINE incluido hace pocos años en el Anexo del Reglamento nº 37/2010 debido a que se le ha establecido un LMR únicamente para équidos, en cambio está prohibida su utilización en otras especies. Este fármaco es inhibidor de la COX II, por lo tanto, puede dar lugar efectos secundarios cardiovasculares, y tiene una eficacia similar a otros AINEs como el carprofeno, el meloxicam y la fenilbutazona. Se comercializa con el nombre de Equioxx y Previcox. Este fue el primer método en el que se determinó firocoxib en leche, y posteriormente Dowling et al. [18] también determinaron este medicamento, junto con otros AINEs, en plasma de bovino. Recientemente, Jedziniak et al. [21] incluyeron la determinación del firocoxib en un método multi-residuos en leche.

Malone et al. [19], determinaron 4 analitos en leche de bovino, y en los demás procedimientos de leche se determinaron entre 8 [12] a 19 analitos [21]. Dubrei-Cheneau et al. [22], incluyeron los resultados de probar la extracción de 12 AINEs con y sin hidrólisis, obteniendo mejores resultados con la extracción simple líquido-líquido con metanol (sin hidrólisis). En este método casi se consiguió alcanzar el nivel tan bajo

de LMR (0.10 µg/Kg) establecido en el año 2011 para el Diclofenaco (Reglamento nº 37/2010). Recientemente, Jedzaniak et al. [21] fueron los primeros en conseguir detectar el diclofenaco a un nivel igual a su LMR, con un límite de decisión de 0.10 µg/Kg. En este método, Jedzaniak et al. determinaron simultáneamente 14 AINEs “ácidos” y 4 AINEs “básicos” (metabolitos de metamizol), para ello se extraen los AINEs con acetonitrilo y acetato de amonio, y se separa en dos porciones el sobrenadante obtenido tras centrifugar. Malone et al. [19], desarrollaron un método para la determinación de 3 corticoides (dexametasona, betametasona y prednisolona) junto con 4 AINEs (ácido tolfenámico, meloxicam, y los metabolitos 5-hidroxi-flunixin y 4-metilaminoantipirina), siendo este el primer método capaz de confirmar y cuantificar simultáneamente los corticoesteroides y los AINEs autorizados para su administración en bovino de leche destinada a consumo humano.

En cuanto a los estudios desarrollados para el análisis de tejido muscular, a continuación se describen los principales métodos establecidos.

Jedziniak et al. [21] y Hu T et al. [20], determinaron AINEs autorizados con LMR y AINEs no autorizados en tejido muscular. Jedziniak et al. [21], analizaron muestras de músculo de cerdo, caballo y pollo determinando 9 AINEs y un metabolito del Flunixin, el procedimiento para la preparación de las muestras consistió en una hidrólisis enzimática del músculo y una extracción de los analitos con acetonitrilo. Hu T et al. [20], determinaron 30 AINEs en músculo de porcino, para ello realizaron un estudio con el fin de optimizar el procedimiento de extracción de los analitos, probando diferentes condiciones de extracción, las mejores recuperaciones las consiguieron con acetonitrilo.

Por otra parte, hay métodos en los que se determinan AINEs en varias matrices, estableciendo un procedimiento de preparación de muestras diferente para cada matriz y las mismas condiciones para la detección y cuantificación de los analitos en el equipo utilizado. En dos ensayos se analizan plasma sanguíneo y leche mediante LC-MS/MS [24,25] y en otro, analizan leche y músculo [26]. Este último método se analizan las mismas matrices que en el método desarrollado en este estudio por ello se resume a continuación.

En este método, Gentili et al. [26] determinaron 15 AINEs por HPLC-MS/MS en leche y tejido muscular. El procedimiento en leche se basó en extraer los analitos con acetonitrilo y purificar las muestras con cartuchos OASIS HLB, concentrar bajo Nitrógeno a 30°C y redissolver con fase móvil para transferir a los viales. El procedimiento en músculo consistió en extraer con metanol y acetonitrilo, centrifugar y repetir la extracción con acetonitrilo, posteriormente se concentra en un baño de agua a 30°C, se centrifuga y se purifica en cartuchos OASIS HLB, finalmente se concentra bajo Nitrógeno a 30°C y se transfiere a los viales.

Otras matrices analizadas para la determinación de AINEs son riñón [27], y orina de caballos deportivos [28] desarrollado para el control del dopaje, en este caso se determinaron una gran cantidad de medicamentos (40 esteroides anabolizantes y corticoesteroides, y 50 fármacos entre los que se incluyen inhibidores de la COX II, oxicams, anti-diabéticos, sedantes, diuréticos...).

Del conjunto de métodos, los rangos y niveles establecidos de límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y límite de detección ( $CC\beta$ ), para las matrices y los antiinflamatorios no esteroideos investigados en este estudio, se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Rango de límites de decisión ( $CC\alpha$ ) y límites de detección ( $CC\beta$ ) establecidos en la metodología consultada para las matrices analizadas (leche y músculo) y 6 de los 12 AINEs estudiados en este proyecto.

<b>AINE</b>	<b><math>CC\alpha</math> en leche (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	<b><math>CC\beta</math> en leche (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	<b><math>CC\alpha</math> en músculo (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>	<b><math>CC\beta</math> en músculo (<math>\mu\text{g/Kg}</math>)</b>
<b>Indometacina</b>	-	-	2	5
<b>Ácido niflúmico</b>	1.26	2.15	-	-
<b>Suxibuzona</b>	2.86	4.87	-	-
<b>Fenilbutazona</b>	0.55 - 6	0.94 - 8	3.86	5.56
<b>Oxifenilbutazona</b>	2.12 - 6	3.23 - 7	3.13	5.65
<b>Naproxeno</b>	1.29 - 3.43	2.19 - 3.78	6.36	9.3
<b>Ácido mefenámico</b>	0.92 - 4.8	1.56 - 6.3	7.4	9.86

Algunos AINEs investigados en el método desarrollado en este estudio (carboxiibuprofeno, piroxicam, flurbiprofen, ácido flufenámico y ácido meclofenámico) no se determinan ni en leche ni en tejido muscular en ninguno de los artículos consultados, pero la mayoría de estos AINEs sí se determinan en otras matrices como por ejemplo en plasma sanguíneo [18] y en orina [28].

En plasma sanguíneo, Dowling et al. [18], establecieron un límite de decisión ( $CC\alpha$ ) de 1.24  $\mu\text{g/ml}$  y un límite de detección ( $CC\beta$ ) de 2,11  $\mu\text{g/ml}$  para el piroxicam. En orina, Ho et al. [28], establecieron un límite de decisión ( $CC\alpha$ ) de 15  $\mu\text{g/ml}$  para el flurbiprofen, de 0.25  $\mu\text{g/ml}$  para el ácido flufenámico, de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  para el ácido meclofenámico y de 1  $\mu\text{g/ml}$  para el piroxicam.

Por último, hay que indicar que no se han encontrado resultados sobre el carboxiibuprofeno en ninguna de las metodologías que se han consultado.

## 4. Cromatografía líquida rápida de alta eficacia asociada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS).

### 4.1. Técnica de cromatografía líquida (LC).

La cromatografía líquida (LC) es un procedimiento que permite la separación, identificación y cuantificación, en cortos períodos de tiempo, de sustancias o grupos de sustancias, poco volátiles o térmicamente inestables, o que se transforman en sus derivados volátiles. Es importante que la muestra sea soluble en un disolvente, condición que no cumplen las sustancias de alto peso molecular, pero si todas las sustancias orgánicas e inorgánicas iónicas.

Con el LC se pueden obtener tanto resultados cuantitativos como cualitativos. El análisis cuantitativo se basa en la medida de alturas y áreas de los picos cromatográficos que muestran la concentración de la sustancia a estudiar, en cambio el análisis cualitativo se basa en la identificación del analito en los tiempos de retención.

La muestra se desplaza junto con la fase móvil, los componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria de la columna se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, mientras que los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Como consecuencia de la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas.

El equipo de LC lo componen, por orden:

- 1) Depósito de la fase móvil:** es una botella que contiene la fase móvil (si hace falta desgasificarlo se introduce durante un tiempo en ultrasonidos), a parte de la fase móvil se puede también introducir, según el procedimiento, acetonitrilo, metanol o una mezcla de ambos. Las fases móviles se preparan diariamente.
- 2) Bomba:** se encarga de succionar la fase móvil. Tiene una gran capacidad para trabajar a altas presiones, es la que genera el caudal. Para las bombas que realizan la mezcla de las soluciones de los depósitos a baja presión es necesario desgasificar el líquido previamente, en cambio con bombas que realizan la mezcla a alta presión no es necesario.

Si la elución es isocrática (fase móvil constante) es suficiente una sola bomba y un solo canal de disolvente.

Si la elución es en gradiente (cambia la composición de la fase móvil a lo largo del tiempo del análisis) normalmente se necesita una bomba con un sistema de dosificación de cada uno de los eluyentes, la mezcla se realiza a baja presión y antes de ser impulsados. También se puede realizar con dos o más bombas mezclándose tras ser impulsados (a altas presiones).

- 3) **Sistema de inyección:** se encarga de introducir la muestra sin tener que parar el flujo. Son automáticos y de volumen variable, poseen una jeringa capaz de tomar volúmenes exactos.
- 4) **Columna:** existen muchos tipos de columnas según el analito que se quiera determinar, las matrices analizadas, y los distintos tipos y tamaños de partícula que se quiere separar. Además, para un mismo tipo de columna existen distintos tamaños, lo que permite distintos volúmenes de carga.
- 5) **Detector:** el equipo de cromatografía líquida se puede acoplar a diversos tipos de detectores, en el caso de este estudio se utiliza un espectrómetro de masas.

Hay diferentes denominaciones para los equipos de cromatografía líquida según su eficacia, rapidez o resolución. En el caso de este estudio, se ha utilizado un equipo de cromatografía líquida rápida de alta eficacia (UPLC).

## 4.2. Introducción a la espectrometría de masas (MS).

El fenómeno de la espectrometría de masas fue observado por primera vez gracias al físico Thomson J J (1899), cuando descubrió la desviación en la trayectoria que sufre un haz de átomos cargados positivamente al pasar a través de campos eléctricos y magnéticos. En 1918 y 1919, Dempster A J y Aston F W construyeron los primeros instrumentos capaces de actuar como un espectrómetro de masas, y desde entonces han evolucionado mucho tanto los equipos como los conocimientos sobre esta técnica.

Los espectrómetros de masas se han utilizado principalmente para extraer información acerca de la masa molecular y la estructura del compuesto analizado. Estos equipos pueden ser utilizados tanto para análisis cualitativos como cuantitativos de diversas sustancias.

El acoplamiento de la espectrometría de masas a técnicas separativas se llevó a cabo en 1956, cuando se empezó a usar el primer cromatógrafo de gases asociado a un espectrómetro de masas (GC-MS). Pero el acoplamiento de esta técnica a la cromatografía líquida era más complejo, debido a la dificultad de ionizar a vacío una molécula que se encontraba en un disolvente. Fue casi 20 años después, cuando gracias al desarrollo de la ionización química a presión atmosférica (API) junto con el "Electrospray" (desarrollado anteriormente para otros fines), se comenzó a utilizar la cromatografía líquida asociada a la espectrometría de masas (LC-MS).

La espectrometría de masas (MS) utiliza el movimiento de iones en campos eléctricos y magnéticos para clasificarlos de acuerdo a su relación masa/carga ( $m/z$ ). Las sustancias químicas se identifican separando los iones gaseosos por la desviación que sufren. El espectrómetro requiere un trayecto de colisión libre para los iones y, por lo tanto, funciona al vacío o en condiciones casi de vacío.

Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes básicas: un sistema de introducción de la muestra en el equipo, una fuente de ionización, un analizador y un detector. A continuación se explican, por orden, cada una de las partes:

- 1) **Un sistema de introducción de la muestra**, diseñado para una mínima pérdida de vacío. La muestra se puede introducir directamente al espectrómetro de masas con una jeringa o a través de otro equipo cromatográfico acoplado a este, ya sea de gases o de líquidos (GC-MS o LC-MS).
- 2) **Una fuente de ionización**, en la cual se produce un haz de partículas proveniente de la muestra y se crean los fragmentos de iones gaseosos de la muestra. Hay dos clases de fuentes de ionización:
  - **Fuentes en fase gaseosa** (como ionización química, ionización por impacto de electrones e ionización por campo), en las que la muestra se volatiliza fuera de la fuente de energía y antes de ionizar los componentes gaseosos.
  - **Fuentes de desorción** (como desorción por campo, bombardeo de átomos acelerados, Matrix Assisted Laser Desorption y electrospray), en este tipo de fuentes los iones se forman en la fase condensada, y se permite el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente inestables.

La fuente de ionización del equipo utilizado para el método de antiinflamatorios desarrollado en este trabajo, es la fuente de desorción por electrospray. El electrospray permite el análisis de moléculas de naturaleza polar que puedan cargarse positiva o negativamente en disolución, es un tipo de técnica de ionización a presión atmosférica. Las moléculas con carga en su estructura interna son muy adecuadas para ser analizadas mediante ésta técnica, en el caso de que la molécula no posea carga en su estructura se adiciona un ácido o base volátil con el fin de generarla. En este caso la muestra debe ser soluble, no es posible analizar muestras insolubles. Con esta técnica se pueden generar iones múltiplemente cargados, lo que permite abordar el estudio de moléculas con una masa molecular por encima del límite del analizador, siempre y cuando se produzca el proceso de multicarga. La presencia de sales en la muestra puede inhibir la ionización del producto.

El electrospray se puede acoplar a un LC para analizar mezclas de productos polares. Es una técnica de ionización que no produce apenas fragmentación en la molécula, aportando poca información estructural de la misma. Se produce normalmente el ion  $M+H^+$  en modo positivo y el ion  $M-H^-$  en modo negativo. Los iones observados proceden de la muestra en disolución y no existen iones procedentes de la matriz como en el caso de otro tipo de fuentes. En el apartado 4.3 se explica más detalladamente este tipo de fuente de ionización.

- 3) Tras la fuente de ionización, la siguiente parte del espectrómetro de masas es **un analizador**, que se encarga de separar los iones que se producen en la fuente de acuerdo a las relaciones de masa/carga ( $m/z$ ). Hay diferentes tipos de analizadores: de sector magnético, por tiempo de vuelo, por trampa de iones y de cuadrupolo (simple o triple).

En el equipo que se ha utilizado para este estudio, el analizador es de triple cuadrupolo. Este tipo de analizador está formado por cuatro rodillos paralelos a los que se aplica una corriente continua que afecta a la trayectoria de los iones viajando por el trayecto centralizado entre los 4 rodillos. Para las condiciones de voltaje introducidas en el equipo, solamente los iones de una relación masa/carga determinada pueden pasar a través del filtro del triple cuadrupolo, mientras los otros son barridos como moléculas descargadas. En el apartado 4.4 se explica el funcionamiento de este tipo de analizador más detalladamente.

Para la obtención de espectros de masas de forma rutinaria, se trabaja en condiciones de baja resolución obteniendo espectros de masas en los que se representan las relaciones  $m/z$  de los iones obtenidos.

- 4) Por último, se encuentra **el detector**, en el cual los iones separados son recogidos y caracterizados.

### 4.3. Acoplamiento LC-MS.

La asociación entre la cromatografía líquida y la espectrometría de masas se hizo posible gracias al desarrollo de técnicas de ionización a presión atmosférica (API).

Las técnicas de API usadas en LC-MS son electrospray y APCI (ionización química a presión atmosférica). En ambas técnicas se utilizan voltajes altos y nebulización mecánica para producir iones en fase gaseosa. Producen poca fragmentación y son técnicas muy sensibles.

Las diferencias entre ellas se observan en la forma que tiene cada una de generar los iones:

- La **ionización química a presión atmosférica** ioniza en fase gaseosa, por lo que se recomienda para compuestos menos polares y más pequeños con cierta volatilidad, ya que se aplica un flujo de nitrógeno (gas nebulizador) y altas temperaturas (300 - 600 °C), con el fin de evaporar el disolvente procedente del cromatógrafo de líquidos. Tiene la ventaja de que permite trabajar con flujos de trabajo más altos (hasta 2 mL/min).
- El **electrospray** ioniza en disolución, por lo que está muy indicado para compuestos polares y biomoléculas (poco volátiles y termolábiles). El flujo de trabajo no debe superar 1 mL/min.

En el electrospray el efluente del LC entra en la interfase a través de la sonda capilar. Aplicando un voltaje alto (2 - 4 KV) y con un flujo coaxial de nitrógeno (gas de nebulización), el efluente se convierte en un aerosol cargado positiva o negativamente (en función del potencial aplicado al capilar). Un flujo de nitrógeno calentado (gas de desolvatación) ayuda a la evaporación del disolvente a través de la fuente. Las gotas emitidas por el capilar de electrospray disminuyen su tamaño como consecuencia de la evaporación del disolvente mientras la carga de la gota permanece constante. La

disminución del radio de la gota a carga constante supone un aumento de la repulsión de cargas en la superficie de la gota. Para un radio dado, esta repulsión supera la tensión superficial de la gota, lo que produce la ruptura de ésta. Esta secuencia se repite muchas veces formando gotas muy pequeñas. Una pequeña cantidad del spray es arrastrada a través del orificio del cono, el resto va a parar al deshecho. Diferencias de presión y voltaje dirigen los iones a través del cono de muestra, cono de extracción y las lentes RF (octopolo) hasta el analizador.

Los factores que afectan a la respuesta del analito en electrospray son:

- Concentración del analito: se produce una saturación en la señal debido al "apiñamiento" de moléculas en la gota, no permitiendo a algunas moléculas de analito alcanzar la superficie y siendo imposible, por tanto, la ionización de éstas.
- Contenido de la matriz: en general la respuesta para el analito disminuye con el aumento de la concentración de otros electrolitos. Esto se conoce como "supresión iónica". Se debe a la competencia entre el analito y el electrolito por la carga y la ocupación de la superficie de la gota.
- Actividad superficial del analito: la sensibilidad de un compuesto en la ionización electrospray es determinada por su actividad superficial; los iones que la favorecen son los que formarán iones en fase gaseosa con mayor probabilidad.
- Flujo: la respuesta del analito en electrospray disminuye con el aumento del flujo de fase móvil debido a que el tamaño de las gotas aumenta con éste.

Las partes integrantes de una interfase API son las siguientes:

- 1) **Sonda**: introduce el efluente del LC en la interfase volatilizado (en el APCI) o nebulizado e ionizado (en el electrospray).
- 2) **Electrodo de descarga de corona**: sólo en APCI.
- 3) **Cono de muestra**: dirige los iones a la primera zona de vacío. La expansión de estos provoca un enfriamiento que se puede traducir en la formación de "clusters" de los analitos con moléculas de disolvente, para evitar esto se aplica calor a esta zona. Es el responsable de la ionización de las moléculas y de la fragmentación de las mismas: a mayor peso molecular, mayor voltaje requerido para la ionización, ya que el aumento del voltaje produce la fragmentación.
- 4) **Cono de extracción**: dirige los iones a un segundo estadio de vacío donde se encuentran las lentes de enfoque del octopolo.
- 5) **Lentes RF del octopolo**: dirige los iones hacia el centro del analizador de masas. Posee una combinación de voltajes de DC (corriente continua) y RF (radiofrecuencia, una frecuencia de corriente alterna).
- 6) **Analizador de masas** (tiempo de vuelo, simple o triple cuadrupolo y trampa de iones).

- 7) **Detector dinolito:** consiste en un fotomultiplicador ópticamente alineado con un fósforo emisor de luz y con un dínodo de conversión de alto voltaje para conseguir alta sensibilidad, tanto en modo positivo como en modo negativo.

#### 4.4. Equipos de espectrometría de masas tipo MS<sup>n</sup> o MS/MS.

Si se tiene en cuenta que una vez volatilizada e ionizada la molécula de interés, va a ser filtrada en relación a su m/z, la detección de ésta se llevará a cabo aislada de cualquier otra especie no ionizada o ionizada con m/z diferente. Sumado a este hecho, se tiene en cuenta que podemos fragmentarla obteniendo especies químicas derivadas de la molécula de interés, podremos decir que la espectrometría de masas es una técnica con un alto grado de especificidad.

Pero existen casos en los que se hace necesario un mayor grado de especificidad (análisis en los que la concentración en la que aparece la especie de interés es muy baja y en matrices muy "complejas"). Para ello hay que tratar de "limpiar" la muestra en el analizador antes de que llegue al detector, esto lo hacen los equipos de espectrometría de masas en tándem (MS<sup>n</sup> o MS/MS).

El equipo que he utilizado en las prácticas es un espectrómetro de masas en tándem con analizador de **triple cuadrupolo** y su funcionamiento consiste en tres etapas:

- 1) El efluente previamente volatilizado e ionizado, pasa a través del primer cuadrupolo (Q1) donde se focaliza un ion en relación a su m/z (al igual que ocurría en la MS convencional).
- 2) Este ion (llamado ion precursor) es transferido a un segundo cuadrupolo (Q2) que se comporta como una célula de colisión donde interacciona con un gas de colisión y se fragmenta.
- 3) En un tercer cuadrupolo (Q3) se focaliza uno o varios de los iones producto proveniente de la fragmentación del ion precursor.

Existen diferentes formas de llevar a cabo una medida en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo:

- **Product ion scan:** el ion precursor es fijado en Q1 y transferido a Q2 donde se fragmenta. Los iones producto originados son medidos mediante el barrido en Q3. En este modo, se obtiene el típico espectro MS/MS. Este es el método más empleado para LC-MS y la ionización por electrospray, y es la que se ha utilizado con el equipo UPLC-MS/MS para los métodos de este estudio.
- **Precursor ion scan:** en este caso, en Q3 se fija la medida de un ion producto determinado y se hace el barrido en Q1. El resultado obtenido es el espectro del ion precursor del que proviene el ion producto fijado en Q3. Este método es útil para GC-MS y/o ionización química o por impacto electrónico.

- **Neutra ion scan:** se lleva a cabo un barrido tanto en Q1 como en Q3 con el objetivo de obtener el espectro del ion precursor que sufre la pérdida de una especie neutra. Está indicado para ionización química e impacto electrónico.

# **OBJETIVOS**



Los objetivos principales de la tesis son los siguientes:

- Desarrollar un método analítico para la determinación de diferentes Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) no autorizados en sanidad animal en leche y tejido muscular de origen animal.
- Validar el método desarrollado para demostrar que cumple con los requisitos de la Decisión de la Comisión 657/2002/CE, por la que se aplica la Directiva 93/23/CE del Consejo, en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de resultados.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **1. Procedimiento para la validación de métodos analíticos.**

A continuación, se describe el proceso que se ha utilizado para llevar a cabo la validación del método de análisis puesto a punto en este estudio.

El procedimiento sigue las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE, para el funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados [10].

Este procedimiento se aplica en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia cuando concurre alguna de las circunstancias siguientes:

- Después del desarrollo o adaptación de un método analítico y antes de su aplicación a muestras analíticas reales.
- Cuando, en la revisión de procedimientos ya validados, se produzcan variaciones significativas como:
  - Ampliación de las matrices a las que se aplica.
  - Ampliación del rango de medida.
  - Cambios en las cantidades de muestra empleadas en el análisis.
  - Cambios en el proceso de extracción y/o purificación.
  - Cambios en la formulación de reactivos empleados.
  - Cambios en los equipos de medida empleados.

### **1.1. Introducción.**

La validación de ensayos físico-químicos, en el LSPV, se lleva a cabo mediante la sistemática siguiente:

- a) Validación inicial que se realiza empleando:
  - Material de Referencia Certificado (MRC) o muestras con valores conocidos.
  - Adiciones de cantidades conocidas de analito a una matriz.
  - Mediante la valoración de los ejercicios interlaboratorio y/o controles internos de calidad.
- b) Revalidación que se realiza cuando, en la revisión del procedimiento de ensayo, se producen cambios significativos empleando las siguientes técnicas:
  - MRC o muestras con valores conocidos.
  - Adiciones de cantidades conocidas de analito a una matriz.
  - Mediante la valoración de los ejercicios interlaboratorio y/o controles internos de calidad.
  - Comparación con el procedimiento en revisión anterior.

## 1.2. Definiciones.

- **Método cualitativo:** es aquel método analítico que identifica una sustancia basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas.
- **Método cuantitativo:** es aquel método analítico que determina la cantidad o la fracción de la masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como valor numérico de unidades apropiadas.
- **Coefficiente de Variación (C.V.):** es la magnitud que caracteriza la dispersión de una serie de  $n$  mediciones de un mismo método analítico, expresada como medida relativa a la media aritmética de los  $n$  resultados considerados. Su valor se calcula mediante la ecuación 3.1.

Ecuación 3.1.

$$C.V.(%) = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:  $\sigma$  es la desviación típica de la serie de  $n$  mediciones y  $\bar{X}$  es la media aritmética de los  $n$  resultados considerados. El C.V. se expresa en %.

- **Exactitud de medida:** grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término "exactitud" cuando se aplica a un conjunto de resultados de mediciones implica la combinación de los componentes aleatorios y de un error sistemático común o de un componente del sesgo.
- **Incertidumbre de medida:** estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad dada, el valor verdadero de la magnitud medida. La incertidumbre de medida incluye, en general, varios componentes. Algunos pueden estimarse a partir de la distribución estadística de los resultados de series de medición, y pueden caracterizarse por la desviación típica muestral. Las estimaciones de los otros componentes solamente pueden basarse en la experiencia o en otras informaciones.
- **Interferencia:** modificación de la función de respuesta del método producida por la presencia de otras sustancias distintas al analito problema.
- **Intervalo de trabajo:** el intervalo de trabajo de un método es el intervalo de concentración en el que puede obtenerse una exactitud y precisión adecuadas al objetivo del método.
- **Límite máximo de residuo (LMR):** nivel máximo u otra tolerancia máxima de sustancias establecidos en la legislación.
- **Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL):** contenido mínimo recomendado de un analito que debe ser detectado y confirmado. Sirve para armonizar el funcionamiento analítico de los métodos aplicables a las sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido.

- **Material de Referencia (MR):** material o sustancia en el que uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y se encuentran suficientemente definidos para permitir emplearlo en la calibración de un instrumento, en la evaluación de un método de medida o en la atribución de valores a un material.
- **Material de Referencia Certificado (MRC):** material de referencia, acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la que se expresan los valores de la propiedad, y para la cual, cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con la indicación del nivel de confianza.
- **Método normalizado:** es todo aquel método recogido en una norma, reglamento o publicación de un organismo sectorial.
- **Muestra:** es una cantidad representativa (propiedades de la muestra idénticas a la de la población) y estable (propiedades de la muestra inalterables desde su obtención hasta la realización del ensayo), subconjunto de una población, que se obtiene para determinar en ella los valores de ciertas propiedades, que posteriormente se utilizan para realizar inferencias respecto a las propiedades de la población de la que se obtiene la muestra.
- **Patrón interno (IS o ISTD):** sustancia no contenida en la muestra, de propiedades fisicoquímicas lo más próximas posible a las del analito que ha de identificarse. Esta sustancia se añade a cada muestra.
- **Selectividad/especificidad:** grado por el cual un método puede determinar un analito particular dentro de una mezcla compleja, sin ser interferido por otros componentes de la mezcla.
- **Validación de un método de ensayo:** la validación de un método de ensayo establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos.
- **Error alfa ( $\alpha$ ):** probabilidad de que la muestra analizada sea realmente conforme, aunque se haya obtenido una medición no conforme («decisión de falso no conforme»). Para las sustancias del grupo A del anexo I de la Directiva 96/23/CE el error  $\alpha$  debe ser igual o inferior al 1%, para todas las demás sustancias, el error  $\alpha$  es igual o inferior a 5%.
- **Error beta ( $\beta$ ):** probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme, aunque se haya obtenido una medición conforme («decisión de falso conforme»).
- **Límite de decisión ( $CC\alpha$ ):** límite en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error  $\alpha$  que una muestra no es conforme. El límite de

decisión debe establecerse según requisitos de identificación (método cualitativo) o de identificación más cuantificación (método cuantitativo).

- **Capacidad de detección (CC $\beta$ ):** contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error  $\beta$ . En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración mínima en la que un método puede detectar muestras realmente contaminadas con una certeza estadística de  $1-\beta$ . En el caso de sustancias para las que se ha establecido un límite permitido, la capacidad de detección es la concentración en la que un método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística de  $1-\beta$ .

### 1.3. Determinación y cálculo de los parámetros de validación.

La validación de un método analítico, se reflejará en un informe de validación y en registros que contengan, al menos, los parámetros del método referentes a su selectividad/especificidad, límite de decisión (CC $\alpha$ ), capacidad de detección (CC $\beta$ ), y confirmación tanto en métodos cualitativos como cuantitativos. En el caso de la validación de un método cuantitativo, además de los parámetros citados, se debe incluir la linealidad/función respuesta del método, la veracidad/exactitud/recuperación, la repetibilidad, y la reproducibilidad intralaboratorio.

En este estudio se ha desarrollado un **método cualitativo**, con el que se identifican sustancias que no tienen LMR establecido. A continuación se desarrollan los parámetros necesarios para la validación del método:

#### A) Selectividad/especificidad:

Se debe demostrar que el procedimiento de ensayo está libre de interferencias para el rango de concentraciones y las matrices a las que se aplica. Para ello, hay que analizar un número apropiado de muestras en blanco representativas, al menos 20, y se verifica la existencia o no de interferencias en la región de interés en la que cabe esperar la elución del analito.

Se considera que la muestra está libre de interferencias cuando la señal obtenida, si existe, sea menor o igual al 30 % de la señal obtenida en el CC $\alpha$  del analito. Cuando la señal obtenida sea mayor al 30 % de la del CC $\alpha$  del analito, se evaluará si dicha presencia puede conducir a una falsa identificación o la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de la interferencia.

#### B) Límite de decisión (CC $\alpha$ ):

Se establece según requisitos de identificación, es decir, en el 100% de veces que se adicione una muestra a ese nivel de concentración, se debe poder identificar la presencia de dicho analito, con las tolerancias de las intensidades relativas de los iones característicos del analito (ion ratio).

Se estima analizando al menos 20 materiales blancos por matriz, determinándose cuál es la relación señal-ruido al tiempo de retención del analito. El límite de decisión es el valor de concentración correspondiente a una señal 3 veces superior a la señal-ruido obtenida de los 20 blancos.

También se puede estimar experimentalmente utilizando, en primer lugar, soluciones patrón en concentraciones decrecientes y así, tener una idea aproximada de su valor atendiendo a la respuesta obtenida para, posteriormente, realizar adiciones en concentraciones crecientes y en pequeños incrementos sobre material blanco, hasta llegar a una concentración tal que nos permita identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

En ambos casos se realiza la comprobación experimental mediante la adición del analito en blancos de matriz a dicho nivel al menos 3 veces. Si la identificación del analito se realiza en las 3 repeticiones, se procede a realizar al menos 10 repeticiones en dicho nivel. Se acepta éste como valor de  $CC\alpha$  si en la totalidad de las repeticiones se identifica el analito. Si esto no ocurriera, se repetiría de nuevo el ensayo con un valor ligeramente superior de adición. Así, paulatinamente, hasta estimar experimentalmente un valor de  $CC\alpha$  que permita la identificación en la totalidad de las repeticiones realizadas a un nivel.

### **C) Capacidad de detección ( $CC\beta$ ):**

Se establecerá también según requisitos de identificación. Se estima investigando el material blanco enriquecido en un valor próximo al límite de decisión. En el caso de métodos cualitativos y sin LMR, su valor se considerará igual al  $CC\alpha$  ya que se exigirá que sea una concentración tal que permita identificar el analito en el 100% de las repeticiones.

## **2. Descripción del método analítico desarrollado para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en músculo y leche por UPLC-MS/MS.**

### **2.1. Alcance del método.**

#### **Muestras a las que se puede aplicar:**

El procedimiento puede aplicarse para la determinación de carboxiibuprofeno (CXIBP), piroxicam (PIR), naproxeno (NPX), oxifenilbutazona (OPBZ), ácido niflúmico (NFL), flurbiprofen (FBP), suxibuzona (SBZ), indometacina (IND), fenilbutazona (PBZ), ácido mefenámico (MEF), ácido flufenámico (FFA) y ácido meclofenámico (MCF) en músculo de animales de abasto, aves y conejos, y leche de animales de abasto, por cromatografía líquida rápida de alta eficacia acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (UPLC-MS/MS).

#### **Rango de medida:**

Este procedimiento se aplicará para la determinación de PIR, NFL y PBZ a concentraciones superiores o iguales a 2.5 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), para OPBZ, CXIBP, SBZ, IND, MEF, FFA y MCF a concentraciones iguales o superiores a 5 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), para NPX a concentraciones iguales o superiores a 10 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), y para FBP a concentraciones iguales o superiores a 20 ppb ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

Ya que durante la validación del método, se han establecido los siguientes límites de decisión ( $CC\alpha$ ): 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para PIR, NFL y PBZ, 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para OPBZ, CXIBP, SBZ, IND, MEF, FFA y MCF, 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para NPX y 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para FBP.

La guía de los laboratorios comunitarios de referencia, del 7 de Diciembre de 2007, recomienda para algunos de estos analitos unos límites de funcionamiento exigido (MRPLs) a los laboratorios que realicen estos análisis, aunque estos límites no son de obligatorio cumplimiento. Los MRPLs que se recomiendan de los 12 AINEs determinados son: 5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para PBZ y OPBZ, y 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para NPX y MEF (Tabla 1.3 del apartado 3.2 de la introducción del trabajo). Como se puede observar en los niveles de  $CC\alpha$  que se han establecido para los analitos del método desarrollado, los MRPLs recomendados para 4 de los analitos determinados se cumplen.

### **2.2. Materiales, reactivos y equipos.**

#### **Material**

- Centrífugas (11.000 r.p.m.) Jouan.
- Ultracentrífuga (13.000 r.p.m.) Eppendorf.
- Sistema de evaporación con corriente de nitrógeno Turbo-Vap.

- Agitatuos y agitadores basculantes.
- Balanza analítica con resolución de 0.1 mg.
- Tubos de centrífuga de polisulfona de 50 ml con tapón enroscable.
- Tubos falcon de 50 ml.
- Tubos de polipropileno de 15 ml.
- Columna Cromatográfica Acquity UPLC® BEH C18 1.7  $\mu\text{m}$  (50 x 2.1 mm d.i.).
- Columnas de extracción en fase sólida C8, 500mg/6cce Applied separations.
- Tubos eppendorf con filtro (0.22  $\mu\text{m}$ ) para volúmenes inferiores a 500  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 100-1000  $\mu\text{l}$ , resolución 1  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 100-1000  $\mu\text{l}$ , resolución 5  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 10-100 $\mu\text{l}$ , resolución 1  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 1000-5000  $\mu\text{l}$ , resolución 5  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta automática 1-10 ml, resolución 10  $\mu\text{l}$ .
- Pipeta Pasteur de vidrio desechable.
- Probeta 250 ml. graduada clase A.
- Probeta 500 ml graduada clase A.
- Matraz aforado 1 ml. clase A.
- Matraz aforado 10 ml. clase A.
- Matraz aforado 50 ml. clase A.
- Matraz aforado 250 ml. clase A.
- Matraz aforado 500 ml. clase A.
- Matraz aforado 1000 ml. clase A.
- Dosificador 0.5-5 ml.

### **Reactivos:**

- Agua desmineralizada por sistema Milli-Q (Millipore).
- Agua para HPLC.
- Ácido ascórbico para análisis.
- Ácido clorhídrico al 37%, calidad de análisis (p.a).
- Solución HCl 0.24 M y Ácido ascórbico 0.02M: llevar 10 mL de HCl al 37% a 500 ml con agua milli Q en un matraz aforado de 500 ml clase A y añadir 1.8 g de ácido ascórbico.
- Ácido fórmico suprapur 100%.
- Ácido fórmico 0,1 %: llevar 500  $\mu\text{l}$  (pipeta automática 100-1000  $\mu\text{l}$ ) de ácido fórmico suprapur a 500 ml con agua para HPLC.
- Ácido acético glacial (p.a).
- Acetonitrilo hypergrade para HPLC.
- Acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%: mezclar 500  $\mu\text{l}$  (pipeta automática 100-1000  $\mu\text{l}$ ) de ácido fórmico suprapur con acetonitrilo hypergrade.
- Acetato de etilo, calidad HPLC.
- Metanol calidad para HPLC.
- Solución de metanol/agua (30:70): mezclar 60 ml de metanol y 140 ml de agua desmineralizada.
- Solución de resuspensión del extracto final: mezclar 50 ml de ácido fórmico 0,1% con 50 ml de acetonitrilo hypergrade para HPLC.
- Fenilbutazona (Sigma).

- Oxifenilbutazona 1-hidrato, (LGC standars (Chemos)).
- Fenilbutazona-D10 (LGC standars (CIL)).
- Naproxeno (Sigma).
- Ácido mefenámico (Sigma).
- Carboxiibuprofeno (Witega).
- Piroxicam (Sigma).
- Ácido niflúmico (Sigma).
- Flurbiprofen (Sigma).
- Suxibuzona (Sigma).
- Indometacina (Sigma).
- Ácido flufenámico (Sigma).
- Ácido meclofenámico (Sigma).
- Naproxeno-D3 (Witega).
- Gas nitrógeno "U" (99.99%).

#### **Equipo:**

- Equipo de cromatografía líquida rápida de alta eficacia con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo y sistema informático de tratamiento de datos cromatográficos y espectrales (Waters®).

## **2.3. Preparación de los patrones, la muestra y el cromatógrafo.**

### **2.3.1. Preparación de patrones.**

- a) **Solución madre de PBZ, 1000 µg/ml:** pesar 50 mg de PBZ, disolver con metanol y llevar a 50 ml con metanol en matraz aforado. Conservación en congelación a temperatura inferior a -10 °C.
- b) **Soluciones madre de OPBZ, NPX, MEF, PIR, NFL, FBP, SBZ, IND, FFA y MCF de 1000 µg/ml:** pesar 25 mg de cada una de las sustancias, disolver y llevar a 25 ml cada una con metanol en matraz aforado. Conservación en congelación a temperatura inferior a -10°C.
- c) **Solución madre de CXIBF, 500 µg/ml:** pesar 12.5 mg de CXIBF, disolver con metanol y llevar a 25 ml con metanol en matraz aforado. Conservación en congelación a temperatura inferior a -10°C.
- d) **Solución mezcla intermedia, 10 µg/ml:** pipetear el volumen necesario (con una pipeta automática 100-1000 µl, resolución 1 µl) de la solución madre de PBZ, OPBZ, NPX, MEF, PIR, NFL, FBP, SBZ, IND, FFA, MCF y CXIBF, y llevar a un matraz aforado de 50 ml enrasado con metanol, para obtener una solución de concentración de 5.0 µg/ml para PBZ, PIR y NFL, de 10.0 µg/ml para OPBZ,

MEF, SBZ, IND, FFA, MCF y CXIBF, de 20.0 µg/ml para NPX y de 40 µg/ml para FBP. Conservación en refrigeración a temperatura inferior a 8°C.

- e) **Solución mezcla de trabajo 0,50 µg/ml:** pipetear 0.5 ml de la solución mezcla intermedia en un matraz aforado de 10 ml clase A y enrasar con metanol. Preparación diaria.
- f) **Solución madre de PBZ-D10, 500 µg/ml:** pesar 12.5 mg de PBZ-D10, disolver con metanol y llevar a 25 ml con metanol en matraz aforado. Conservación en congelación a temperatura inferior a -10°C.
- g) **Solución madre de NPX-D3, 500 µg/ml:** pesar entre 12.5 mg de NPX-D3, disolver con metanol y llevar a 25 ml con metanol en matraz aforado. Conservación en congelación a temperatura inferior a -10°C.
- h) **Solución de patrón interno (PBZ-D10 y NPX-D3) de trabajo de 1 y 2 µg/ml:** pipetear el volumen necesario de la solución madre de PBZ-D10 y de NPX-D3, y llevar a un matraz aforado de 50 ml enrasado con metanol, para obtener una solución de concentración de 1.0 µg/ml de PBZ-D10 y 2.0 µg/ml de NPX-D3. Conservación en refrigeración a temperatura inferior a 8°C.
- i) **Solución mezcla de todos los AINES para el control del factor respuesta:** pipetear 100 µl. de la solución mezcla de trabajo de 0.50 µg/ml y 250 µl de la solución de patrón interno (PBZ-D10 y NPX-D3) de trabajo y llevar a un matraz aforado de 1 ml con solución de resuspensión del extracto final.

### 2.3.2. Preparación de la muestra.

- En muestras de músculo: Se homogeniza perfectamente la muestra después de haber eliminado la parte visible de grasa, mediante el corte en pequeñas porciones con tijeras de disección. Posteriormente se tomará la porción para el análisis.
- En muestras de leche: Se homogeniza perfectamente la muestra agitando el envase, posteriormente se tomará la alícuota para el análisis.

### 2.3.3. Preparación del cromatógrafo.

- Se deja estabilizar el cromatógrafo durante al menos 10 minutos antes de la primera inyección. Se estabiliza en las condiciones indicadas en el punto 2.4.4 (Detección).

## 2.4. Realización del método.

La determinación de AINEs de este método es **cualitativa** en todas las secuencias de rutina.

**2.4.1.** Paralelamente a la muestra se realizan un blanco de reactivos, un blanco de muestra y una muestra enriquecida, se les añade a todos ellos 100 µl de la solución de patrones internos (PBZ-D10 y NPX-D3) de trabajo y se preparan de la siguiente forma:

- a) Blanco de reactivos: sustituir los 2.5 g de muestra por 2 ml de agua.
- b) Blanco de muestra: pesar aproximadamente 2.5 g de una muestra en la que previamente no se han detectado los analitos de interés.
- c) Muestras enriquecidas en el CCα: a cada alícuota de 2.5 g de muestra en la que previamente no se han detectado los analitos de interés, se añaden 25 µl de la solución mezcla de trabajo de 0.5 µg/ml.
- d) Muestras: pesar aproximadamente 2.5 g de músculo en tubos de centrifuga de polisulfona de 50 ml y los 2.5 g de leche en tubos falcon de polipropileno 50 ml.

**2.4.2.** En muestras de músculo se realiza una **hidrólisis química** que consiste en los siguientes pasos:

- 1) Añadir 10 mL de ácido clorhídrico 0.24 M y ácido ascórbico 0.02 M a la muestra.
- 2) Agitar durante 1 minuto con el vortex.
- 3) Centrifugar a aproximadamente 11.000 rpm durante 10 min.

En muestras de leche se realiza una **extracción orgánica con metanol**, siguiendo los pasos indicados a continuación:

- 1) Añadir 6 ml de metanol a la muestra.
- 2) Agitar en los agitadores basculantes durante 10 minutos.
- 3) Centrifugar a 11.000 rpm durante 5 minutos.
- 4) Llevar a evaporar el sobrenadante metanólico hasta 1 o 2 ml a aproximadamente 50 °C en corriente de nitrógeno en el Turbo Vap.
- 5) Añadir 4 ml de la solución de ácido clorhídrico 0.24 M y ácido ascórbico 0.02 M al extracto.

### 2.4.3. Fase de extracción y purificación de los analitos:

- 1) Preparar la columna de extracción en fase solida C<sub>8</sub> 500 mg/6cc de Applied separations, pasando sucesivamente 4 ml de metanol y 4 ml de ácido clorhídrico 0,24 M y ácido ascórbico 0.02 M.
- 2) Pasar por la columna, el sobrenadante obtenido después de centrifugar el músculo, o bien en el caso de las muestras de leche pasar el extracto evaporado y reconstituido.
- 3) Lavar la columna con 4 ml de una solución metanol:agua (30:70).
- 4) Secar la columna durante 15 minutos con nitrógeno.
- 5) Eluir los AINEs de la columna con 4 ml de acetato de etilo.
- 6) Los extractos se evaporan a sequedad a aproximadamente 50 °C en corriente de nitrógeno en el Turbo Vap.
- 7) Disolver el extracto con 250 µl de una mezcla de ácido fórmico 0.1 % y acetonitrilo 50:50 (solución de resuspensión), agitar en el vortex, y finalmente transferir a un tubo eppendorf con filtro.
- 8) Centrifugar durante 10 min a 8°C a 13.000 rpm en la ultracentrifuga.
- 9) Transferir el sobrenadante a un vial de 250 µl de polipropileno con un tapón con pre-apertura.

### 2.4.4. Detección:

El cromatógrafo se estabiliza y se prepara para su funcionamiento con las siguientes condiciones:

- 1) **Inyección de la muestra:** se inyectan en el sistema cromatográfico 10 µl de los extractos purificados.
- 2) **Condiciones cromatográficas:**
  - a) **Flujo:** 0.600 ml/min.
  - b) **Columna Cromatográfica** Acquity UPLC<sup>®</sup> HSS T3 1.8 µm (50 x 2.1 mm d.i.)
  - c) **Gradiente cromatográfico:** según se indica en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Gradiente cromatográfico para el análisis de AINEs.

Tiempo (minutos)	Ácido fórmico 0,1 (%)	Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (%)
0.00	100	0
0.50	100	0
4.50	50	50
5.50	40	60
6.00	5	95
7.00	5	95
7.10	100	0
8.50	100	0

3) **Condiciones del espectrómetro de masas:**

Parámetros de la página tune:

- a) **Capillary (Kv):** 4.0
- b) **Extractor (V):** 5.
- c) **RF Lens (V):** 0.5.
- d) **Source temperature:** 150 °C.
- e) **Desolvation temperature:** 460 °C.
- f) **Cone gas flow (L/Hr):** 50.
- g) **Desolvation gas flow (L/Hr):** 1100.
- h) **Collision gas flow (mL/Min):** 0.35.

4) **Método MS:** según se muestra en la Tabla 3.2.

5) La **secuencia de trabajo** en el cromatógrafo constará de:

Determinación cualitativa: inyección de solución de resuspensión, blanco de reactivos, blanco de muestra, muestra adicionada en el CC $\alpha$ , inyección de solución de resuspensión y el resto de muestras que podrán ser desde una hasta aproximadamente treinta, intercalando una inyección de solución de resuspensión cada 6 muestras que garantice la inexistencia de efecto memoria del sistema.

Tabla 3.2. Condiciones espectrométricas para el análisis de AINEs.

<b>Analito / ESI<sup>1</sup></b>	<b>Cone voltaje (V)</b>	<b>Ion precursor</b>	<b>C.E.<sup>2</sup> (eV)</b>	<b>Iones producto<sup>3</sup></b>
<b>CXIBP (-)</b>	15	235.4	10	191.2
			15	73.0
<b>OPBZ (+)</b>	30	325.2	20	204.2
			20	120.0
<b>NPX (+)</b>	20	231.2	20	185.2
			30	170.0
<b>PIR (+)</b>	20	332.2	20	95.3
			20	121.2
<b>PBZ (-)</b>	30	307.0	20	279.3
			20	131.0
<b>MEF (+)</b>	20	242.2	10	224.2
			30	209.4
<b>FBP (+)</b>	70	245.7	30	197.2
			30	217.5
<b>FFA (+)</b>	20	282.5	20	264.3
			30	244.5
<b>NFL (+)</b>	30	283.0	20	264.3
			40	145.1
<b>MCF (+)</b>	20	296.1	30	243.4
			35	180.1
<b>SBZ (+)</b>	20	439.6	20	309.4
			20	160.1
<b>IND (-)</b>	20	356.1	10	312.0
			20	297.1
<b>PBZ-D10 (ISTD) (-)</b>	30	317.3	40	289.1
<b>NPX-D3 (ISTD) (+)</b>	20	234.2	10	188.2

<sup>1</sup> Modo ionización electrospray (negativo o positivo).

<sup>2</sup> Energía de colisión.

<sup>3</sup> Los iones productos colocados en la primera fila de cada AINE son los mayoritarios.

## 2.5. Tratamiento y expresión de los resultados.

### 2.5.1. Tratamiento de los resultados por determinación cualitativa.

El resultado cualitativo se obtiene del valor del ratio de área del AINE/área del patrón interno (ISTD) obtenido en la muestra adicionada en el CC $\alpha$ . A este valor se le restará el CV (%) obtenido en la validación para este ratio.

El resultado de las muestras analizadas cuyo ratio de área de cualquier AINE/área de ISTD sea mayor o igual al ratio área del AINE/área ISTD menos el CV (%) será mayor o igual al CC $\alpha$  de ese AINE. El resultado de las muestras cuyo ratio de área de AINE/área de ISTD sea menor al ratio área AINE/área ISTD menos el CV (%) será menor al CC $\alpha$  de ese AINE.

En la Tabla 3.3 se muestran los 2 patrones internos (ISTD) que se utilizan en el método, la fenilbutazona-d10 (PBZ-D10) y el naproxeno-d3 (NPX-D3).

Tabla 3.3. Patrones internos (ISTD) para cada uno de los AINEs investigados.

Patrón interno (ISTD)	Analitos
PBZ-D10	CXIBP, FBZ, IND.
NPX-D3	OPBZ, NPX, MEF, PIR, NFL, FBP, SBZ, FFA y MCF.

### 2.5.2. Confirmación de los antiinflamatorios no esteroideos..

La confirmación se basa en una comparación del tiempo de retención de cada uno de los AINEs en las muestras enriquecidas en el nivel del CC $\alpha$ , con el tiempo de retención del pico de interés de la muestra problema y sus respectivos espectros de masas.

Una muestra se considerará no conforme cuando aparezca un pico en el cromatograma del ion producto de algún AINE, cuyo tiempo de retención relativo no difiera más del 2.5 % respecto al tiempo de retención relativo de la señal obtenida para dicho ion en la muestra enriquecida. Además, el ratio área AINE/área ISTD de la muestra deberá cumplir lo descrito en el apartado 2.5.1, y la intensidad relativa obtenida entre los iones producto (área ion producto 1 mayoritario/área ion producto 2) debe ser similar a aquella obtenida para la muestra adicionada, teniendo en cuenta las tolerancias recogidas en la Decisión 657/2002/CE que se muestran en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tolerancias permitidas por la Decisión 657/2002/CEE para las intensidades relativas de los iones producto.

<b>Intensidad relativa (% del ion más abundante)</b>	<b>Tolerancia permitida</b>
> 50 %	± 20 %
> 20-50 %	± 25 %
> 10-20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 50 %

En el caso de obtener una muestra no conforme, se repetirá de nuevo el análisis por duplicado.

La interpretación del resultado se realizará en base a que, de los tres resultados obtenidos, para considerar la muestra como no conforme al menos dos deben dar un resultado superior o igual al límite de decisión ( $CC\alpha$ ), confirmándose la identidad de los analitos,.

En el caso de que las dos muestras repetidas por duplicado fueran conformes, la muestra se informará como conforme o menor del  $CC\alpha$ .

### **2.5.3. Expresión de los resultados para la determinación cualitativa:**

Se informará como  $< CC\alpha$  (muestra conforme) o  $\geq CC\alpha$  (muestra no conforme). Indicando el valor del  $CC\alpha$  de cada AINE de la matriz y especie analizadas.

## 2.6. Control de calidad.

### 2.6.1. Control interno del laboratorio:

Como anteriormente se ha citado, la determinación de los analitos en este método es cualitativa, por lo tanto se deben controlar los siguientes criterios en cada secuencia de muestras analizadas:

- 1) Control previo al inicio del trabajo mediante una **solución para el control del factor respuesta**. Se controlará el factor respuesta de la PBZ, dividiendo el área obtenida por la concentración del patrón. Criterio de aceptación: se aceptarán valores comprendidos en el intervalo obtenido en la validación.
- 2) Control del **blanco de reactivos** y del **blanco de muestra**: en primer lugar se verificará que el área del ISTD esté por encima del valor mínimo obtenido en la validación para este área, y posteriormente, que no hay ningún pico interferente (señal inferior al 30% del área del analito en el CC $\alpha$ ) en el tiempo de retención de cada AINE.
- 3) Control en las **muestras adicionadas en el CC $\alpha$** : primero se verificará que el área del ISTD esté por encima del valor mínimo obtenido en la validación para esta área. Posteriormente, se verificará que el ratio área AINE/área ISTD esta comprendido en el intervalo de la validación. Finalmente se verificará que las intensidades relativas de los iones producto están comprendidas en el intervalo obtenido en la validación.
- 4) **Criterio de aceptación para las muestras**: se aceptará como correcta una muestra, cuando el valor de área del ISTD obtenido en ella sea mayor al área del ISTD en la muestra adicionada al CC $\alpha$  al que se le habrá restado el % correspondiente al C.V obtenido en la validación para tener en cuenta la variabilidad de esta área.

Acciones correctoras: ante el incumplimiento de alguno de los criterios de aceptación de los controles de calidad, se realizará un estudio de las causas y se repetirán los análisis anotándolo en el formato adecuado para que quede registrado.

### 2.6.2 Control externo:

Participación en ejercicios interlaboratorio cuando existan.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. Desarrollo de un método analítico para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) no autorizados en sanidad animal en leche.

Con el objetivo de desarrollar un nuevo método multi-residuos para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en leche, se probaron diferentes procedimientos para la preparación de las muestras.

Las diferencias en la preparación de las muestras de cada método propuesto (A, B, C, B1, C1, B2, D, F y H) se basan principalmente en la forma de **extraer los analitos** de la matriz. A continuación, se detallan los procedimientos de extracción de los diferentes métodos:

- **Método A:**

Se extraen los AINEs con metanol, ya que son solubles en este solvente. Posteriormente se centrifuga, y se evapora el sobrenadante a 50 °C en corriente de Nitrógeno (hasta obtener 1 - 2 ml).

- **Métodos B y C:**

Se adicionan 5 ml de una solución Tampón de Acetato Sódico 2 M a pH 4.8 y 10 ml de acetonitrilo, la solución tampón a pH 4.8 hace que los analitos se extraigan con la fase orgánica (el acetonitrilo). Se añade un paquete de sales de extracción EN 15662 (4 g MgSO<sub>4</sub>; 1 g NaCitrato; 0.5 g citrato disodio 6-H<sub>2</sub>O), estas sales ayudan a separar, de la matriz, las impurezas de los analitos, y estos pasan a la fase orgánica (el acetonitrilo). Posteriormente, se centrifuga y se recoge todo el sobrenadante.

Tras observar las ínfimas recuperaciones de las muestras analizadas con estos dos métodos, se decidió pipetear solamente 5 ml del sobrenadante obtenido tras centrifugar, dando lugar a unos mejores resultados debido a la disminución de las sustancias (sales) que suprimían la ionización de los analitos en el equipo UPLC-MS/MS. Con esta modificación, estos métodos son el **B1** y el **C1**.

- **Método B2:**

Es igual que el método B1 pero se añaden 100 µl de una solución antioxidante (ácido ascórbico y EDTA). Esta solución antioxidante, se añade con la finalidad de prevenir o disminuir la oxidación de tres AINEs, la fenilbutazona, la oxifenilbutazona y la suxibuzona (precursora de la fenilbutazona). Si se observa la Gráfica 4.1 (en el final de este apartado), con el método B1 hay bajas recuperaciones de estos tres analitos, mientras que en el método B2 (con solución antioxidante) la recuperación de estos tres analitos mejora.

- **Método D:**

Se extrae con metanol y se centrifuga, igual que en el método A.

- **Método F y H:**

Se adicionan 5 ml de un tampón de HCl 0.24 M y ácido ascórbico 0.02 M para producir la hidrólisis química de la muestra y, posteriormente, se centrifuga.

Las fases de **purificación** difieren según el modo de extraer los analitos:

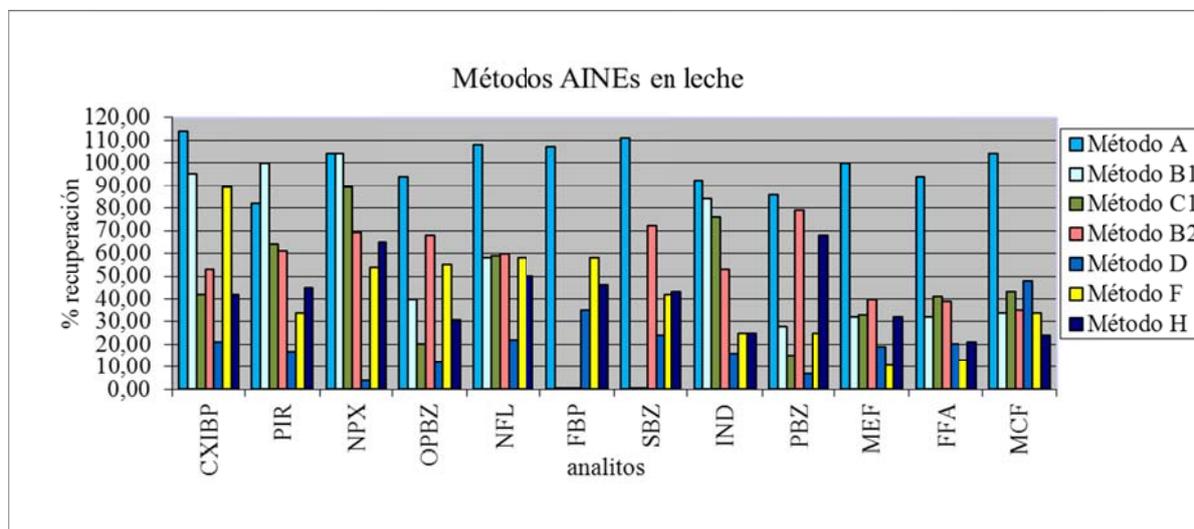
- **Método A:**  
Tras la evaporación en el Turbo Vap hasta 1-2 ml, se añaden 4 ml de HCl 0.24 M y ácido ascórbico 0.02 M y se continúa con la fase de purificación mediante la Extracción en Fase Sólida con los cartuchos C<sub>8</sub> 500 mg/6cc de Applied. Estos cartuchos contienen un gel de sílice al que, tras su activación con metanol, y con el tampón de HCl y ácido ascórbico, se adhieren los analitos y posteriormente se eluyen con acetato de etilo.
  
- **Método B, B1 y B2:**  
Los paquetes añadidos de sales de extracción EN 15662 (4 g MgSO<sub>4</sub>; 1 g NaCitrato; 0.5 g citrato disodio 6-H<sub>2</sub>O) tienen también cierto efecto purificante. Tras la centrifugación, el sobrenadante se evapora y finalmente se redisuelven los extractos.
  
- **Método C y C1:**  
Se traspasa el sobrenadante a un tubo de centrifugar 15 ml, que contiene diversas sales (150 mg PSA, 150 mg C18 y 900 mg de sulfato de Magnesio) que tienen la función de purificar las muestras (separando las impurezas de los analitos que se quieren extraer). Posteriormente, se vuelve a centrifugar, se recoge el sobrenadante, y se continúa con la evaporación a 50 °C con corriente de Nitrógeno en el Turbo Vap. Tras la evaporación, se redisuelven los extractos para su inyección en el equipo UPLC-MS/MS.
  
- **Método D:**  
Tras centrifugar, se evaporan las muestras a 50 °C en corriente de Nitrógeno en el Turbo Vap y se redisuelve, pero el extracto final en este caso se redisuelve en 2.5 ml de la solución de resuspensión (en todos los demás métodos se redisuelve en 250 µl) y se utilizan viales mini-uniprep con filtros de 0.2 nm.
  
- **Método F:**  
Tras centrifugar, se utiliza el sobrenadante para realizar la Extracción en Fase Sólida. Posteriormente, se evaporan las muestras y se redisuelven (este es el mismo método que se aplica para la preparación de las muestras de tejido muscular en este estudio).
  
- **Método H:**  
Se adicionan las sales de extracción EN 15662 (4 g MgSO<sub>4</sub>; 1 g NaCitrato; 0.5 g citrato disodio 6-H<sub>2</sub>O), también utilizadas en el método B. Se vuelve a centrifugar y se continúa con la evaporación en el Turbo Vap. Finalmente, se redisuelven los extractos.

En cuanto a la **detección** de los analitos en el equipo UPLC-MS/MS, se realizó de la misma manera para todos los métodos (apartado 2.4.4 de materiales y métodos).

En la Gráfica 4.1, se observan los porcentajes de recuperación de los 12 AINEs determinados con cada uno de los métodos probados.

Con en el método A se obtuvieron recuperaciones cercanas al 100 % de 11 de los 12 analitos determinados. La única excepción se observa en el piroxicam (PIR), que se recupera en torno al 80 %, observándose una mejor recuperación con otro método, el B1, en el que se recupera el 100 % de este analito, sin embargo con este método la recuperación de los demás analitos es menor. Por lo tanto, seleccionamos el método A como el más adecuado para determinar AINEs en muestras de leche.

Gráfica 4.1. Porcentajes de recuperación de los 12 analitos (carboxiibuprofeno, piroxicam, naproxeno, oxifenilbutazona, ácido niflúmico, flurbiprofen, suxibuzona, indometacina, fenilbutazona, ácido mefenámico, ácido flufenámico, ácido meclofenámico) determinados mediante UPLC-MS/MS, según los diferentes métodos probados de extracción y purificación, en muestras de leche.



## **2. Determinación de carboxiibuprofeno, piroxicam, naproxeno, oxifenilbutazona, ácido niflúmico, flurbiprofen, suxibuzona, indometacina, fenilbutazona, ácido mefenámico, ácido flufenámico y ácido meclofenámico, en leche y tejido muscular por UPLC-MS/MS.**

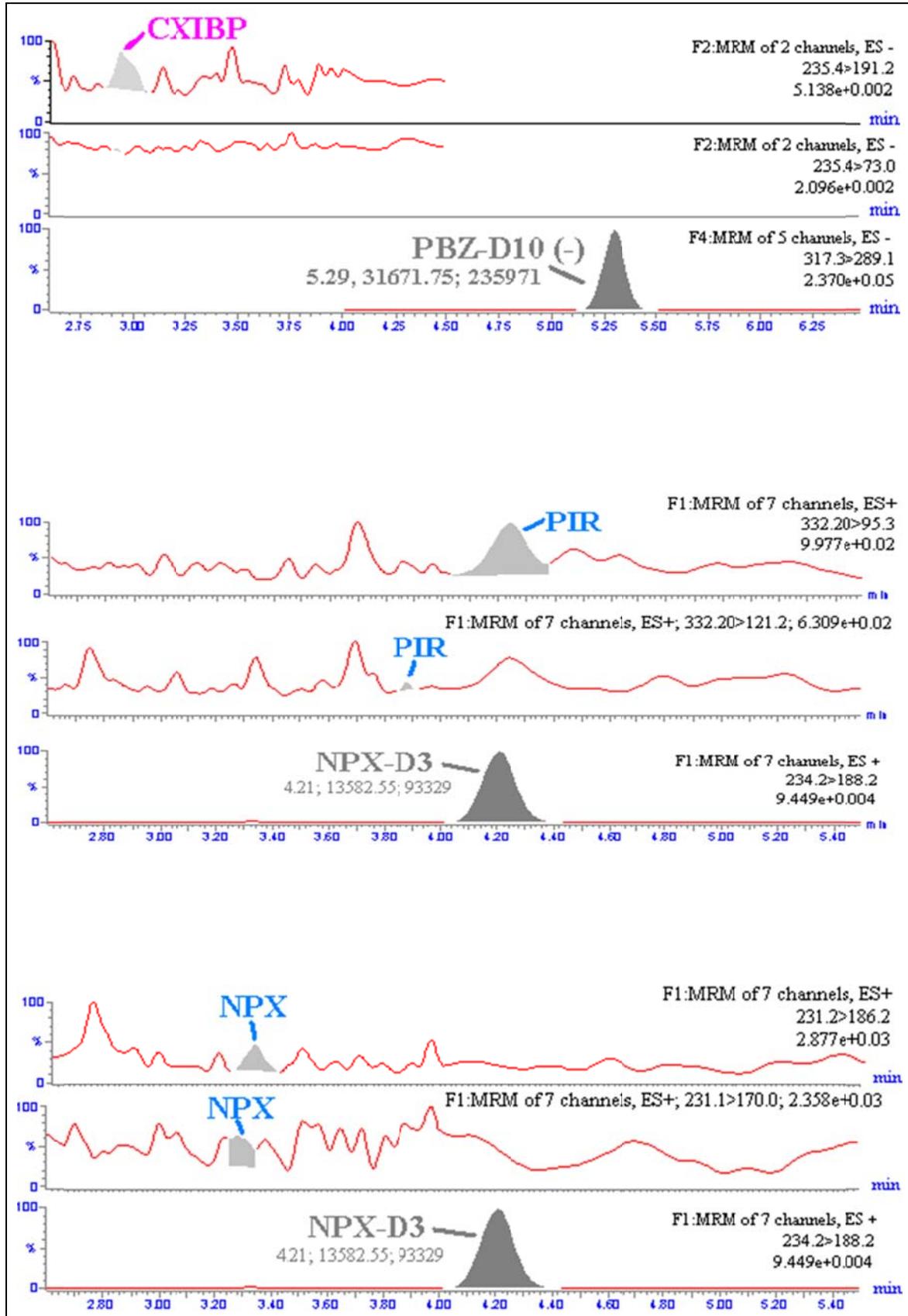
En la determinación de antiinflamatorios no esteroideos se debe tener en cuenta que estos fármacos se eliminan del organismo en forma libre o unidos al ácido glucurónico formando glucuroconjugados, y tienen una gran capacidad de unión a las proteínas [26]. La unión de los AINEs a las proteínas y la presencia de grasa en algunas matrices biológicas son dos inconvenientes para la extracción de estos fármacos y sus metabolitos durante el desarrollo del método. El tratamiento químico para provocar la hidrólisis de la muestra de tejido muscular, en este estudio, mejora la extracción de este grupo de medicamentos. Por otra parte, para eliminar la grasa de las matrices biológicas se utiliza n-hexano

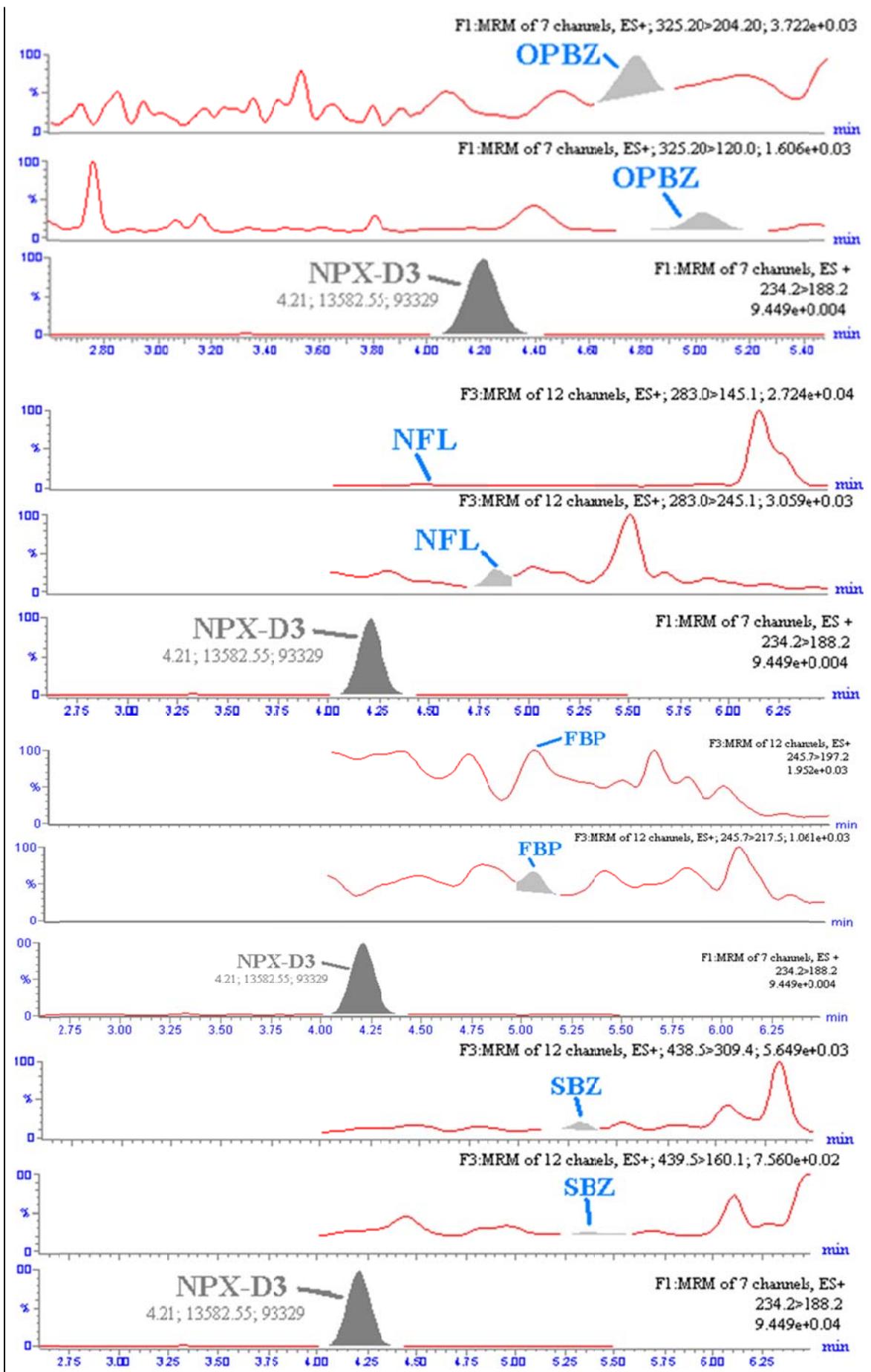
Otra condición importante para el desarrollo de cualquier método analítico, es el tiempo que se tarda en extraer y purificar las muestras. En el caso del método utilizado en tejido muscular, se tarda aproximadamente una hora en analizar entre 1 a 12 muestras, mientras que con el método desarrollado para leche se tarda más tiempo debido a la lenta evaporación del metanol bajo corriente de Nitrógeno en el Turbo Vap, por lo que se puede tardar entre 3 a 4 horas en analizar de 1 a 12 muestras aproximadamente. También hay que destacar la rapidez del equipo para analizar una muestra, ya que con este método se tardan entre 6 y 7 minutos aproximadamente en obtener los resultados de la presencia o no de los analitos en una muestra.

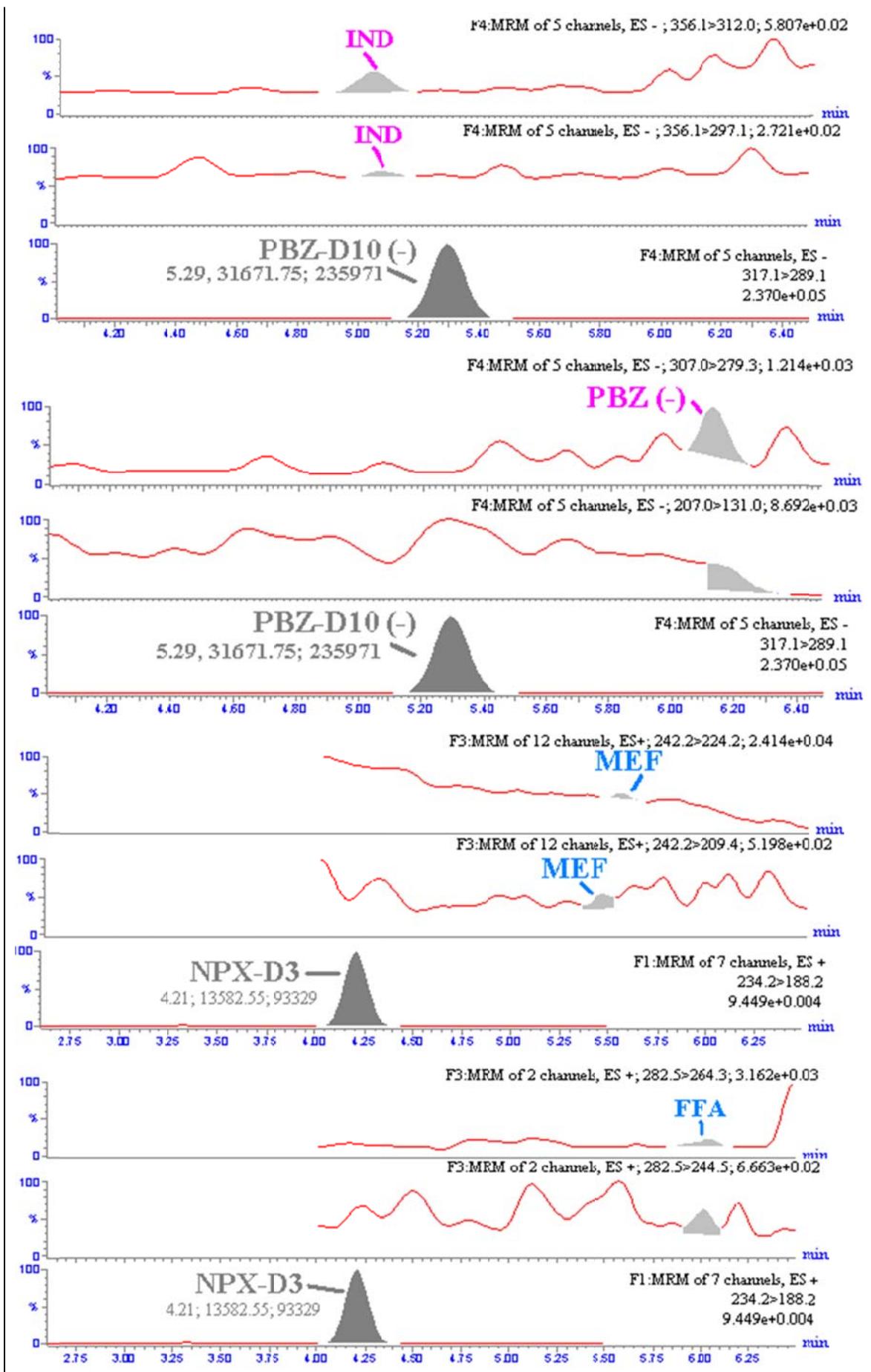
Como fase móvil o solución de resuspensión se utiliza ácido fórmico 10 mM (solución A) y acetonitrilo (solución B), ya que era la fase móvil que se utilizaba en el método acreditado de rutina anteriormente en tejido muscular. Con esta fase móvil se conseguía una buena separación cromatográfica y una óptima ionización, por lo que se sigue utilizando en el nuevo método propuesto.

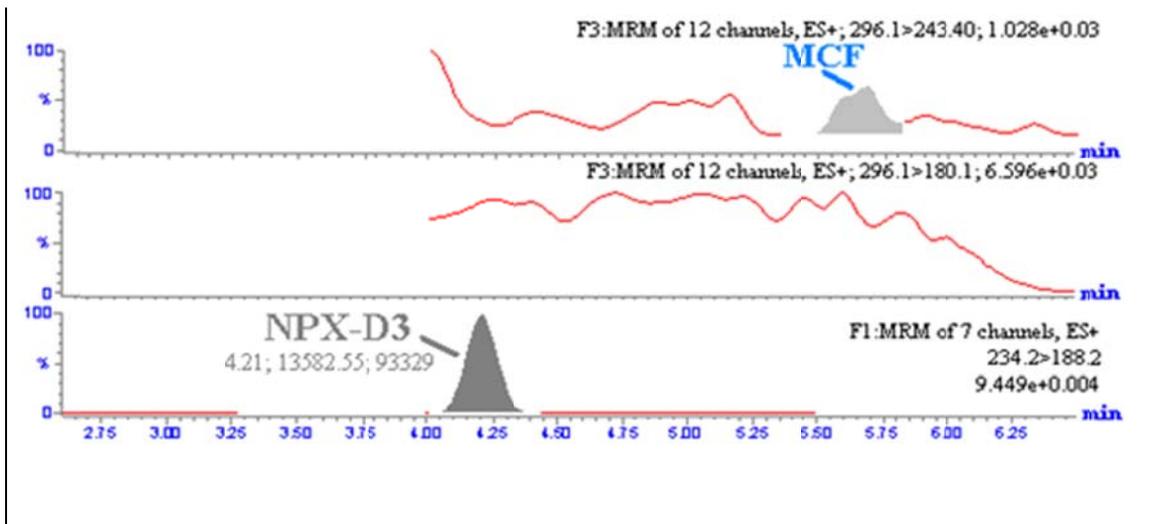
En la Figura 4.1, se observa un cromatograma de un blanco de muestra de tejido muscular. Se puede observar, en todos los cromatogramas de los dos iones producto de cada analito, la ausencia de señal o pico interferente en la matriz durante los tiempos de retención correspondientes de cada analito, demostrándose la selectividad/especificidad del método. En cada cromatograma se observa que el patrón interno correspondiente al analito determinado se extrae correctamente. Se han señalado los tiempos de retención aproximados donde aparecerían los picos de los iones producto de cada analito en caso de una muestra enriquecida o no conforme.

Figura 4.1. Cromatogramas de un blanco de tejido muscular con los patrones internos adicionados, fenilbutazona-D10 (FBZ-D10) y naproxeno-D3 (NPX-D3).



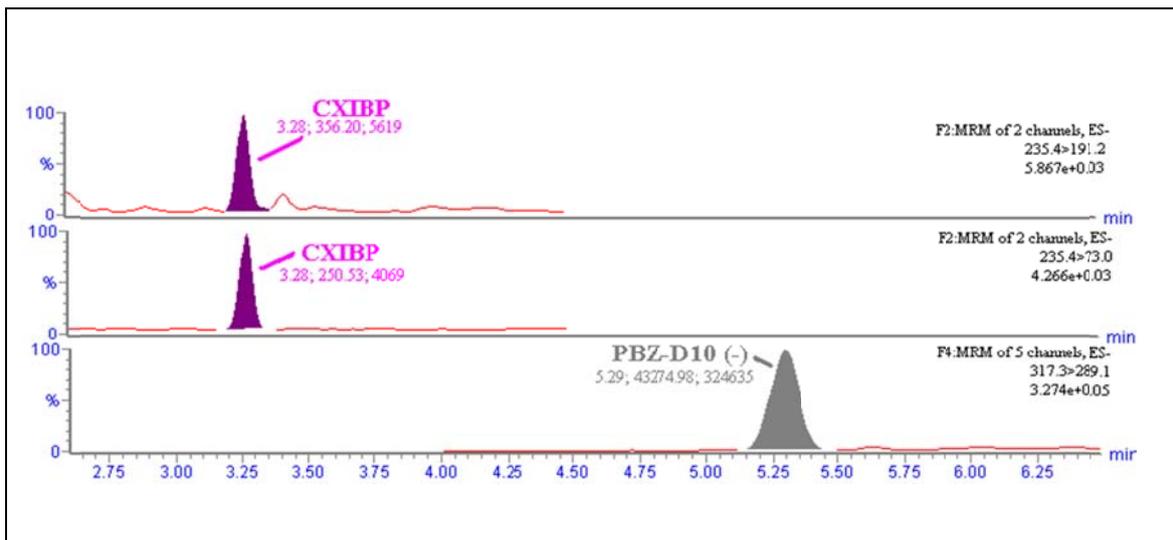


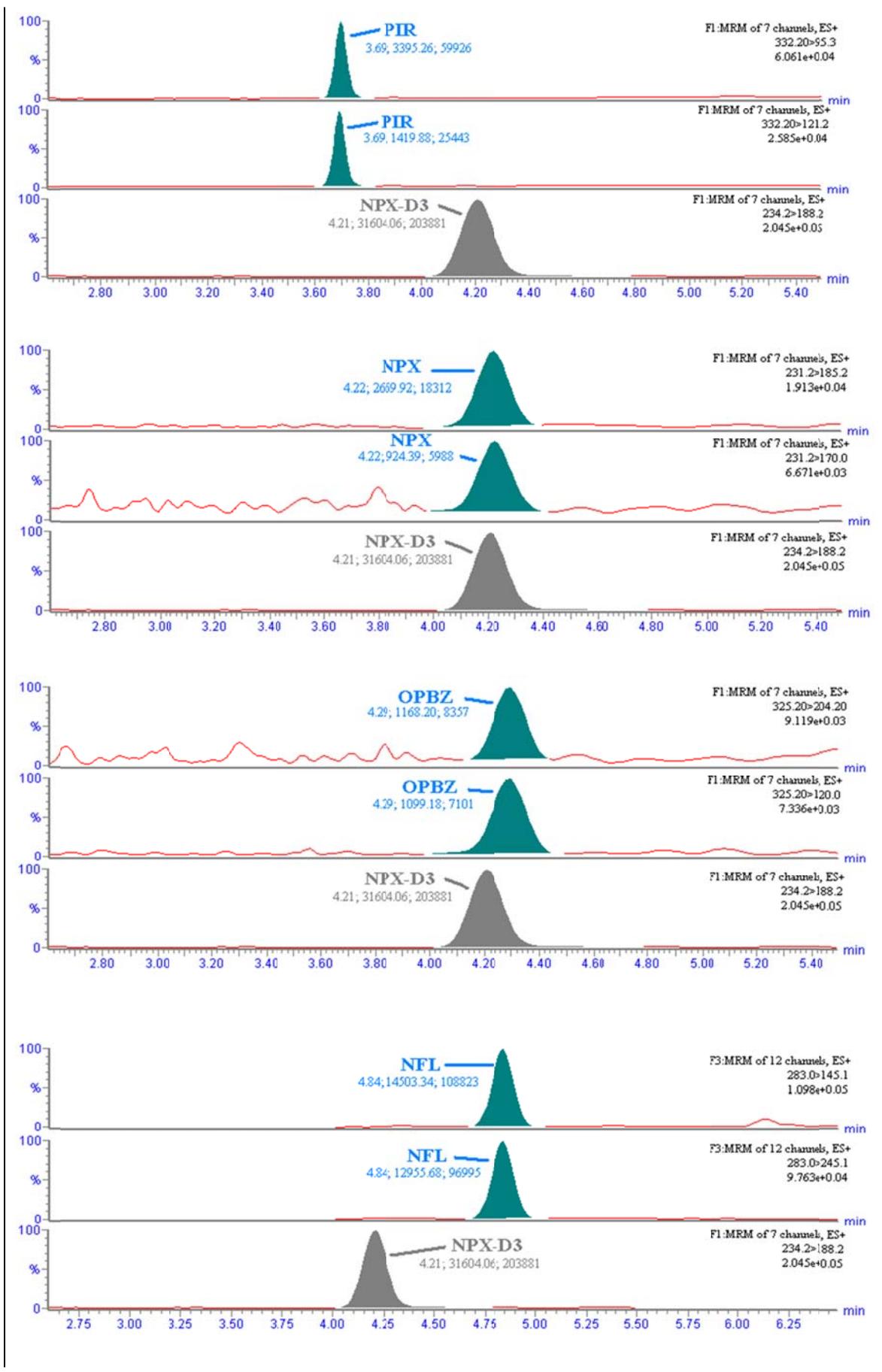


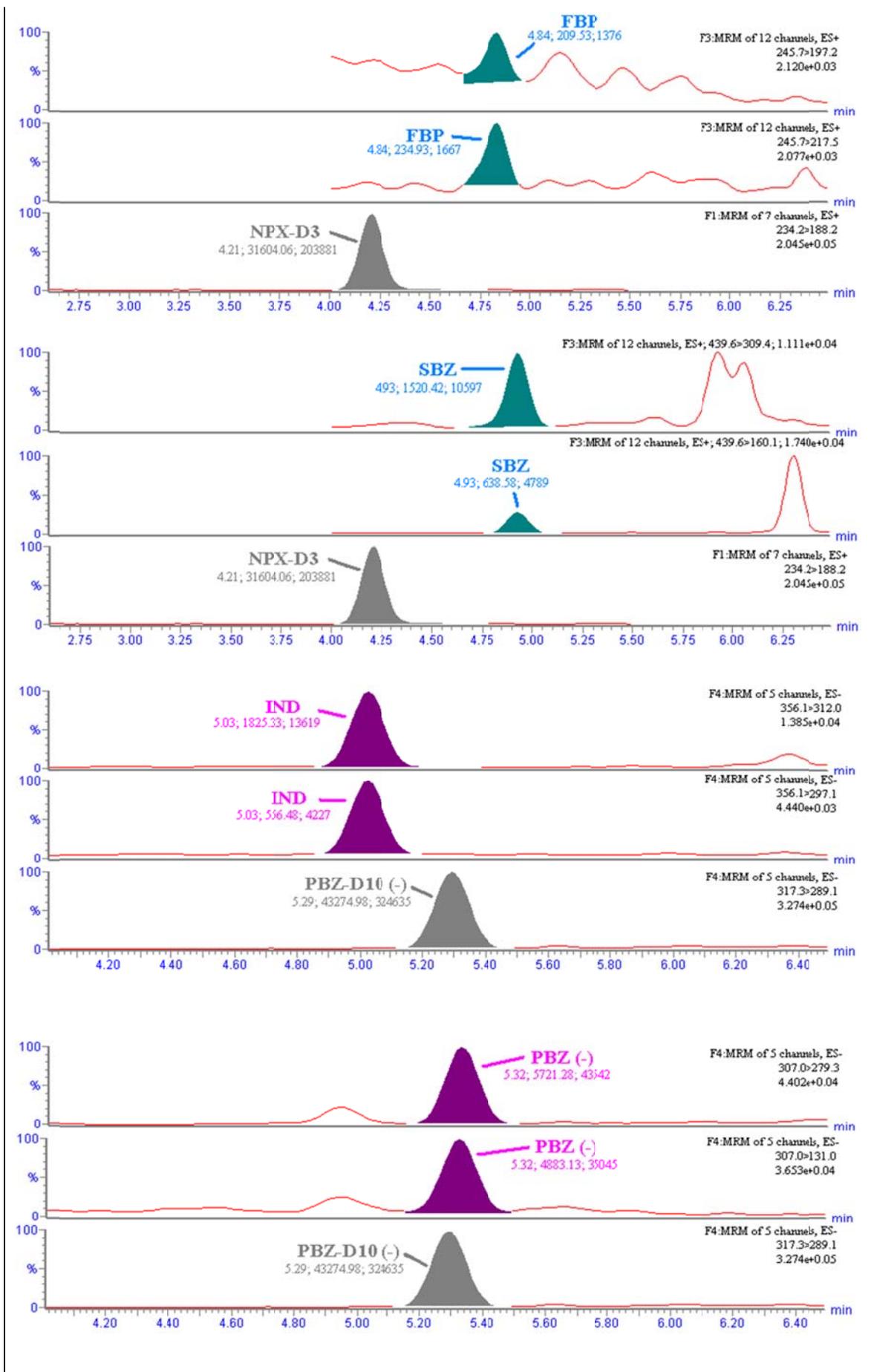


En las Figuras 4.2 y 4.3 se observan los cromatogramas de dos muestras, de leche y tejido muscular respectivamente, enriquecidas con los 12 AINEs en el nivel del CC $\alpha$ . Se observa una buena separación cromatográfica y una buena respuesta del equipo frente a las moléculas. En cada cromatograma se observan los dos iones producto de cada analito (fragmentados a partir de su ion precursor) y el ión del patron interno.

Figura 4.2. Cromatogramas de una muestra de leche de bovino enriquecida con carboxiibuprofeno (CXIBP), piroxicam (PIR), naproxeno (NPX), oxifenilbutazona (OPBZ), ácido niflúmico (NFL), flurbiprofen (FBP), suxibuzona (SBZ), indometacina (IND), fenilbutazona (PBZ), ácido mefenámico (MEF), ácido flufenámico (FFA) y ácido meclofenámico (MCF) a las concentraciones del CC $\alpha$  y con los patrones internos (NPX-D3 y PBZ-D10).







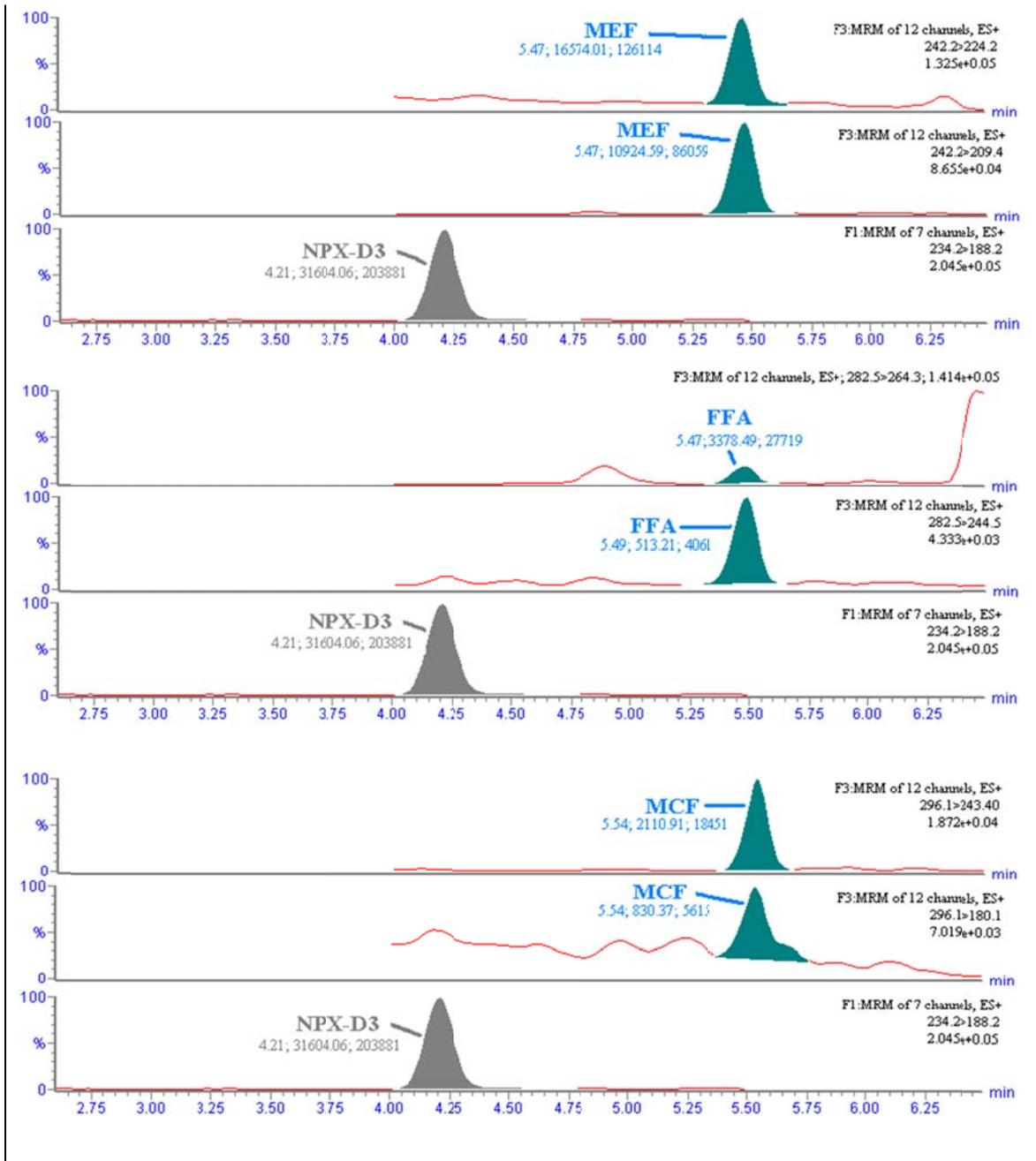
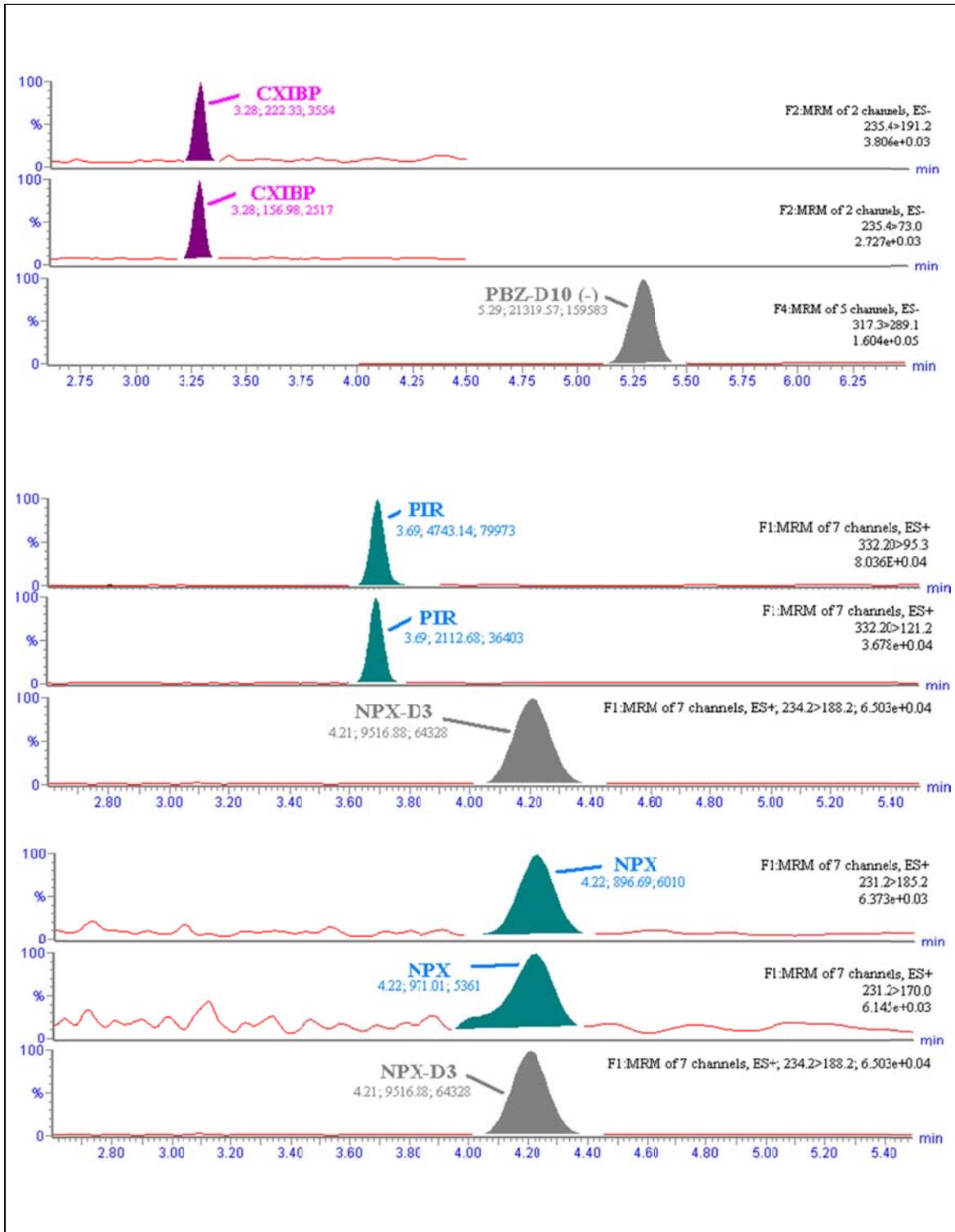
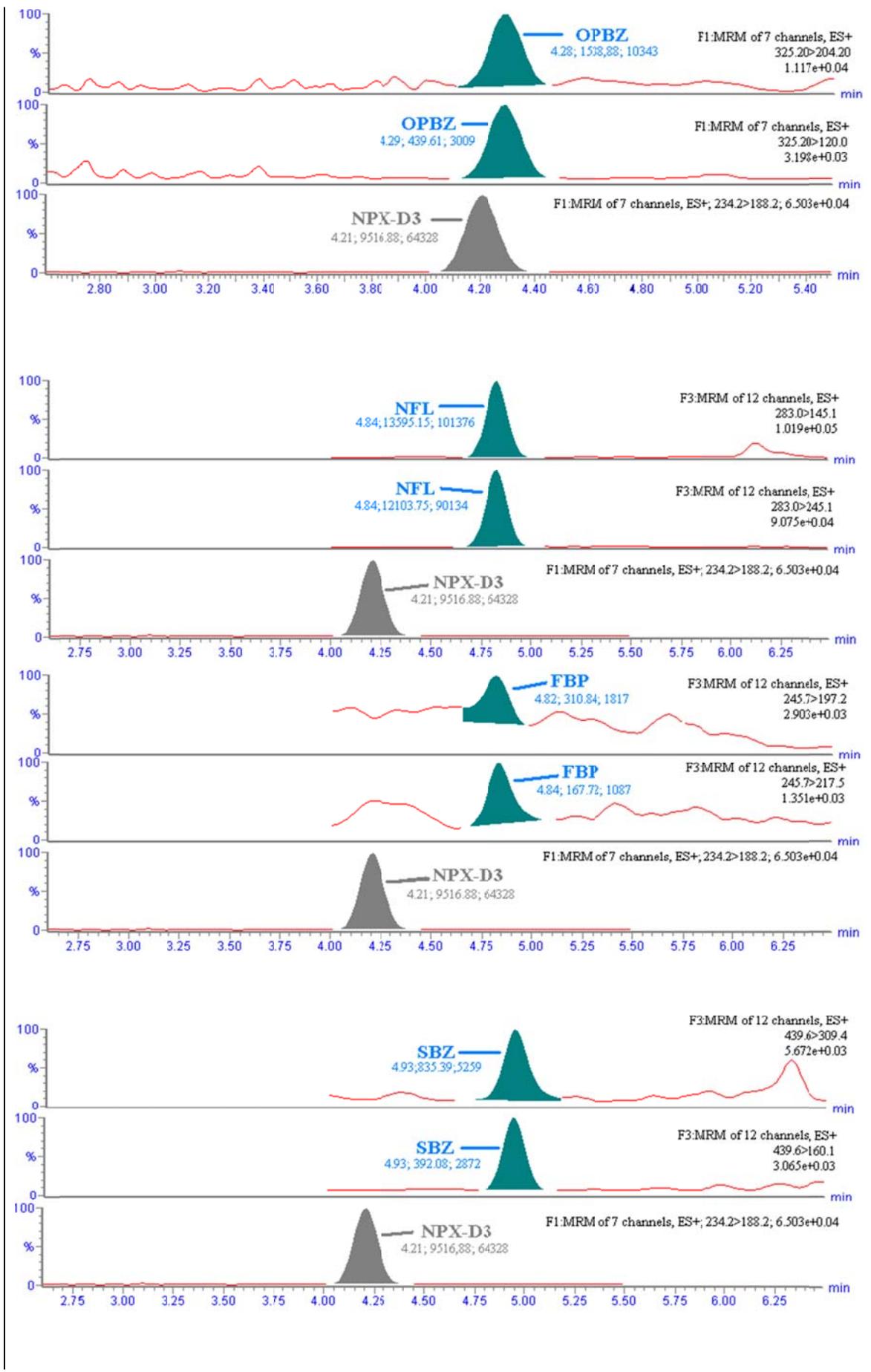
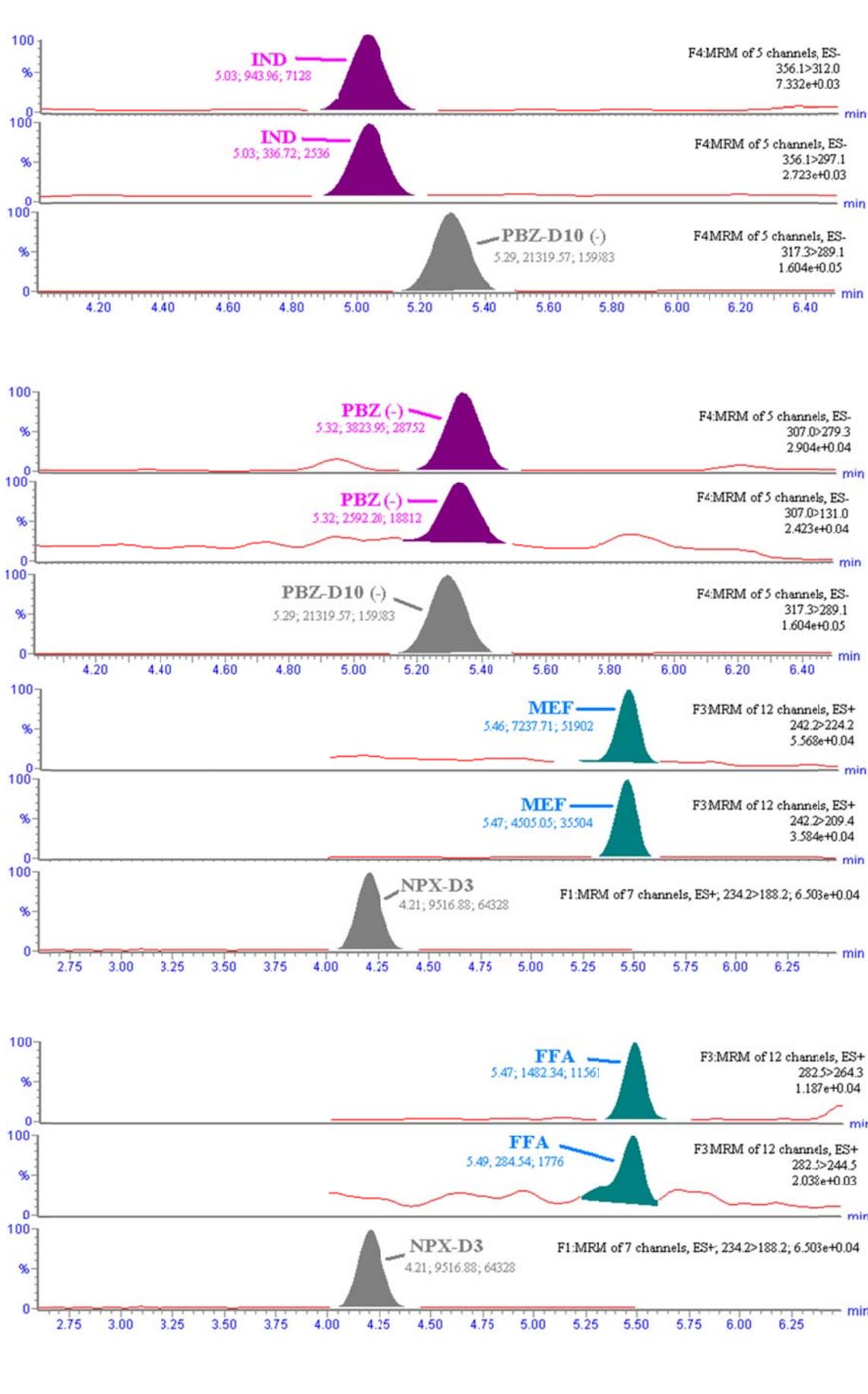
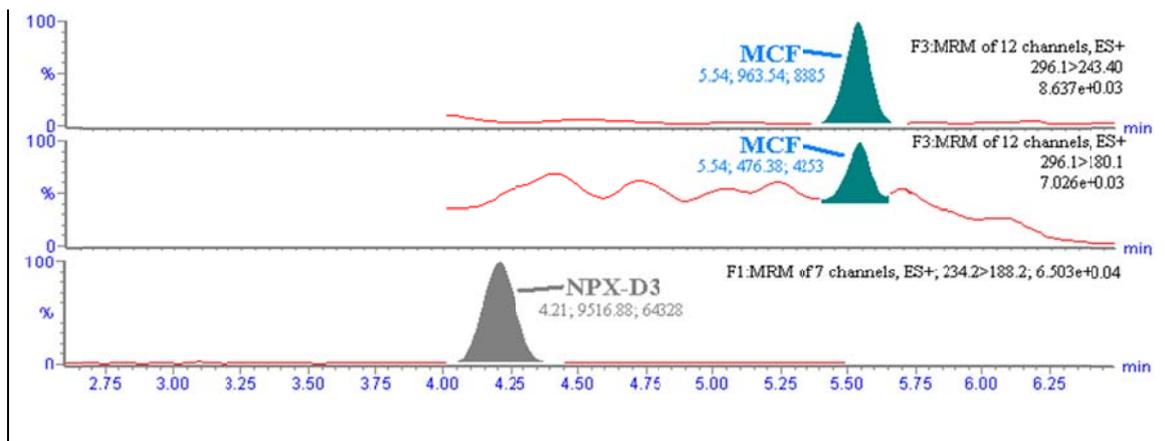


Figura 4.3. Cromatogramas de una muestra de músculo de ave enriquecida con carboxiibuprofeno (CXIBP), piroxicam (PIR), naproxeno (NPX), oxifenilbutazona (OPBZ), ácido niflúmico (NFL), flurbiprofen (FBP), suxibuzona (SBZ), indometacina (IND), fenilbutazona (PBZ), ácido mefenámico (MEF), ácido flufenámico (FFA) y ácido meclofenámico (MCF) a las concentraciones del CC $\alpha$  y con los patrones internos (NPX-D3 y PBZ-D10).







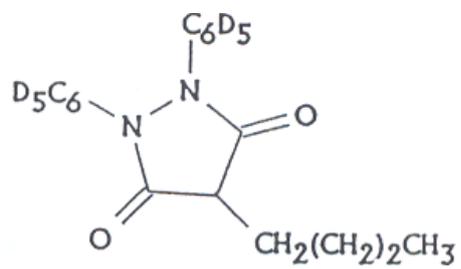


La Decisión 657/2002/CEE [10] establece que para sustancias del grupo B, como los AINEs, los métodos analíticos deben aportar como mínimo 3 puntos de identificación (IPs), que en el caso de la espectrometría de masas de baja resolución (como el triple cuadrupolo utilizado en este estudio) corresponden a un punto de identificación para cada ion precursor y 1,5 puntos de identificación para cada ion de transición o hijo. En el caso de los AINEs determinados en este método, ya que no tienen LMR y que están prohibidos por la UE, sería necesario tener al menos 4 IPs a pesar de pertenecer al grupo B. Con el equipo UPLC-MS/MS utilizado en este proyecto, se han obtenido 2 iones producto de cada analito (Tabla 3.2 del apartado 2 de materiales y métodos) que junto con el ion precursor suman 4 IPs.

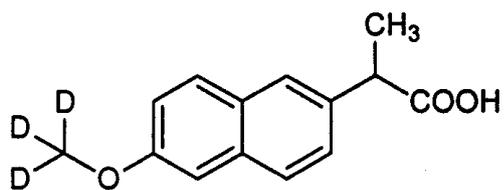
Los patrones internos utilizados son la fenilbutazona-D10 (PBZ-D10) y el naproxeno-D3 (NPX-D3), en la Figura 4.4 se muestran sus estructuras químicas. Los patrones internos se añaden en todas las muestras, incluyendo los blancos de muestra, a partir de una solución que contiene una concentración de 1,0 µg/ml de PBZ-D10 y 2,0 µg/ml de NPX-D3 (como se indica en el apartado 2 de materiales y métodos), y se utilizan para observar la corrección de la recuperación de cada analito en todo el proceso de extracción al relativizar su señal con la del analito a identificar.

En todos los cromatogramas de este apartado se puede observar un pico que corresponde a los iones producto de PBZ-D10 (289.1) o NPX-D3 (188.2), según el analito determinado, estos dos iones se corresponden con el ion mayoritario de la fragmentación del ion padre 317.3 y 234.2, respectivamente (como se indica en la Tabla 3.2 del apartado 2 de materiales y métodos). La fenilbutazona-d10 es el patrón interno de los iones determinados por ESI (-) (carboxiibuprofeno, indometacina, y fenilbutazona), mientras que el naproxeno-d3 es el patrón interno de los iones determinados por ESI (+) (piroxicam, naproxeno, oxifenilbutazona, ácido niflúmico, flurbiprofen, suxibuzona, ácido mefenámico, ácido flufenámico y ácido meclofenámico).

Figura 4.4. Estructura química de los patrones internos utilizados en el método.



Fenilbutazona-D10



Naproxeno- D3

## **2.1. Validación del método.**

La validación se ha realizado atendiendo a las recomendaciones de la Decisión 657/2002 de la Comisión Europea por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados, tal y como se describe en el apartado 1 de materiales y métodos, donde se explica el procedimiento para la validación de métodos analíticos cualitativos.

El método desarrollado es cualitativo, ya que determina sustancias no autorizadas que no tienen LMR. Las matrices utilizadas durante el desarrollo del método y la validación han sido leche y tejido muscular de diferentes especies. Se han analizado 22 muestras de tejido muscular de bovino, porcino, ave y ovino, y 37 muestras de leche de bovino, ovino y caprino. Las muestras de músculo procedían de diversos mataderos de la Comunidad Valenciana, y las de leche de la Universidad Politécnica de Valencia (muestras de caprino) y de diferentes lecherías de la Comunidad Valenciana. La identificación de las muestras de leche y tejido muscular, con su especie correspondiente, se muestran en las Tablas 4.1 y 4.2, respectivamente.

Los parámetros que se han estudiado y establecido para la validación del método son los siguientes:

- 1. Selectividad /Especificidad.**
- 2. Limite de Decisión ( $CC\alpha$ ).**
- 3. Capacidad de Detección ( $CC\beta$ ).**

Tabla 4.1. Muestras de leche de bovino, ovino y caprino analizadas con el método desarrollado.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Especie</b>
08-10-05969	Bovino
08-10-05849	Bovino
08-10-06154	Caprino
08-10-05847	Bovino
08-10-05853	Bovino
08-10-05901	Caprino
08-10-05848	Bovino
08-10-05850	Bovino
08-10-05886	Caprino
08-10-05970	Ovino
08-10-05851	Bovino
08-10-05852	Bovino
08-10-05971	Bovino
08-11-04760	Caprino
08-11-07707	Caprino
08-11-07708	Caprino
08-11-07882	Caprino
08-11-07879	Caprino
08-11-07883	Bovino
08-11-07880	Caprino
08-11-07734	Bovino
08-11-07881	Caprino
20/01/2011	Bovino
24/01/2011	Bovino
27/01/2011	Bovino
31/01/2011	Bovino
03/02/2011	Bovino
08-12-03582	Ovino
08-12-03439	Caprino
08-12-03570	Bovino
4769	Caprino
5605	Ovino
5574	Caprino
08-07-07800	Bovino
08-08-12172	Bovino
08-10-05985	Bovino
08-08-13810	Bovino

Tabla 4.2. Muestras de tejido muscular de diferentes especies analizadas con el método desarrollado.

<b>Identificación muestra</b>	<b>Especie</b>
08-12-05360	Porcino
08-12-04063	Ave
08-12-04288	Porcino
08-12-05253	Porcino
08-12-04802	Porcino
08-12-04054	Ave
08-12-04423	Porcino
08-12-04287	Porcino
08-12-03648	Bovino
08-12-04106	Ovino
08-12-05251	Ovino
08-12-05346	Ovino
08-12-05354	Ovino
08-12-05258	Ave
08-12-04062	Ave
08-12-06497	Bovino
08-12-07556	Bovino
08-12-07649	Bovino
08-12-07650	Bovino
08-12-04170	Ovino
08-12-04885	Porcino
08-12-07576	Ave

## 1. Selectividad /Especificidad

Con este parámetro se demuestra que el procedimiento esta libre de interferencias para el rango de concentraciones y las matrices a las que se aplica. Para poder validar un método, al menos se deben analizar **20 muestras en blanco** y **verificar que no existen interferencias** en el tiempo de retención del cromatograma en el que cabe esperar la elución del analito. Se considera que la muestra esta libre de interferencias cuando la señal obtenida, si existe, es  $\leq$  al 30% de la señal obtenida del analito en la muestra adicionada en el límite de decisión ( $CC\alpha$ ).

Si la señal observada es  $>$  al 30% de la que se obtiene en el nivel del  $CC\alpha$  del analito correspondiente, se debe evaluar si dicha presencia puede conducir a una falsa identificación o la identificación del analito se ve dificultada por la presencia de la interferencia. En caso de observar alguna interferencia que pueda afectar a la identificación del analito, se debería de aumentar el nivel del  $CC\alpha$  hasta que la señal fuera  $\leq$  al 30% de la señal en el límite de decisión.

Durante la validación de este método, no se observó ninguna señal interferente, en el tiempo de retención de ninguno de los analitos, que superase el 30% del área del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y/o pudiese afectar en la identificación del analito. Con ello se demuestra la especificidad del método desarrollado, tanto para ambas matrices como para las especies analizadas.

Tabla 4.3. Tiempo de retención esperado para la elución de cada AINE y los patrones internos en los cromatogramas.

<b>Analito</b>	<b>Tiempo de retención (minutos)</b>
<b>Carboxiibuprofeno</b>	<b>3.28</b>
<b>Piroxicam</b>	<b>3.69</b>
Naproxeno-D3	4.21
<b>Naproxeno</b>	<b>4.22</b>
<b>Oxifenilbutazona</b>	<b>4.29</b>
Fenilbutazona-D10	5.29
<b>Ácido niflúmico</b>	<b>4.84</b>
<b>Flurbiprofen</b>	<b>4.84</b>
<b>Suxibuzona</b>	<b>4.93</b>
<b>Indometacina</b>	<b>5.03</b>
<b>Fenilbutazona</b>	<b>5.32</b>
<b>Ácido mefenámico</b>	<b>5.47</b>
<b>Ácido flufenámico</b>	<b>5.47</b>
<b>Ácido meclofenámico</b>	<b>5.54</b>

En las figuras que se muestran a continuación, se observa un cromatograma de una muestra sin adicionar con una señal cercana al tiempo de retención del ion producto mayoritario del naproxeno (pico señalado en rojo del cromatograma de la Figura 4.5), y otro cromatograma de la misma muestra adicionada en el nivel del CC $\alpha$  (Figura 4.6).

En el cromatograma de la figura 4.6, el naproxeno se puede identificar correctamente en el nivel del CC $\alpha$  adicionado. Además, la señal identificada en el blanco de la Figura 4.5 es < al 30% del área del analito en la muestra adicionada en el CC $\alpha$  de la secuencia, ya que:

$$\begin{aligned} \text{Área en el CC}\alpha &= 2724.57 \\ 30\% \text{ de } 2724.57 &\rightarrow 817.37 \\ \text{Área señal (pico rojo de la Figura 4.5)} &= 752.03 \end{aligned}$$

Para considerarse una interferencia el pico que aparece en el tiempo de retención del naproxeno (NPX) de la Figura 4.5, se tendría que observar un área > de 817.37, y en este caso se observa un área de 752.03 (< de 817.37). Por lo tanto, la señal observada no perjudica la identificación del analito en la muestra adicionada y no se considera una interferencia.

Figura 4.5. Cromatograma de una muestra de leche de caprino con señal para naproxeno (NPX).

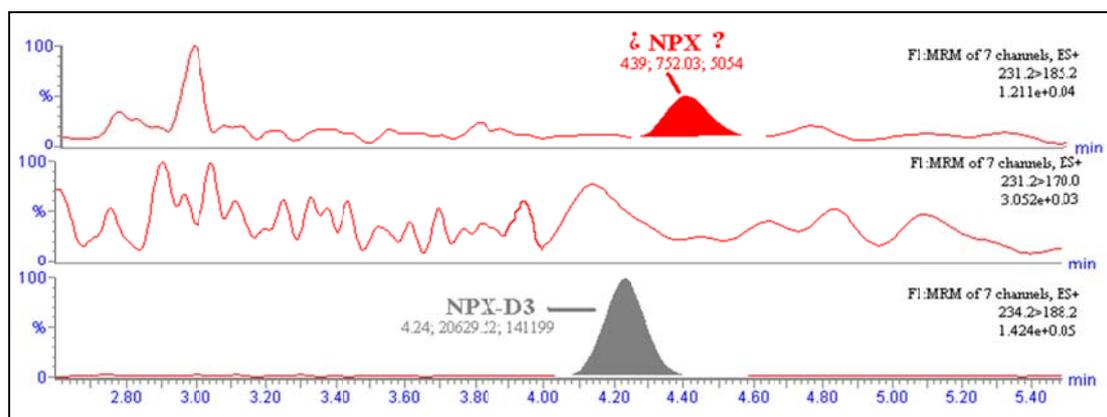
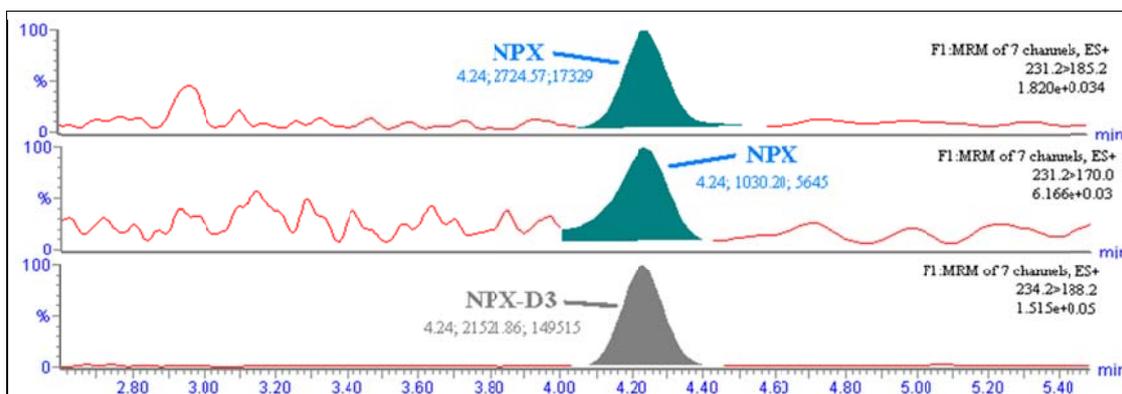


Figura 4.6. Cromatograma de la misma muestra del blanco de la figura anterior adicionado al nivel del CC $\alpha$ .



## **2. Limite de Decisión (CC $\alpha$ )**

La determinación del CC $\alpha$  de cada analito en ambas matrices se ha realizado de forma experimental.

Se inyectaron soluciones patrón de cada analito en concentraciones decrecientes en el equipo UPLC-MS/MS para así tener una idea aproximada de su valor atendiendo a la respuesta obtenida.

Posteriormente, se realizaron adiciones sobre diferentes muestras blanco a diferentes niveles de concentración (2.5, 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  o ppb) durante varias secuencias a partir de la solución mezcla intermedia de AINEs preparada. Se comprobó la señal de los distintos analitos en las diferentes concentraciones, matrices y especies, y se determinó, de este modo, la concentración más baja que permitía identificar a cada uno de los analitos.

Finalmente, se seleccionaron los niveles de concentración más bajos en los que cada analito se confirmaba en el 100% de los casos. Para aceptar esos valores como límites de decisión (CC $\alpha$ ) de cada analito por lo menos se debe repetir el análisis 10 veces, confirmándolo en 10 muestras diferentes. Durante la validación del método desarrollado, se repitió más veces la adición sobre otros blancos de matriz a ese nivel de concentración, hasta analizar un número de 57 muestras de músculo (en 8 secuencias procesadas) y 45 muestras de leche (en 7 secuencias procesadas), con la finalidad de demostrar que esos niveles son el límite de decisión o CC $\alpha$ . Tras el análisis de las muestras se identificó en el 100% la presencia de los 12 analitos, por lo tanto, esos valores de concentración (Tabla 4.4) correspondieron al CC $\alpha$  establecido para cada analito en músculo y leche.

## **3. Capacidad de Detección (CC $\beta$ )**

Se establece según requisitos de identificación. Su valor se considera en el caso de métodos cualitativos igual al CC $\alpha$  (Tabla 4.4) ya que se exige que sea una concentración tal que permita identificar el analito en el 100 % de las repeticiones (0% de falsos conformes).

Tabla 4.4. Niveles seleccionados y, posteriormente, confirmados para cada analito como límites de decisión ( $CC\alpha$ ) y capacidad de detección ( $CC\beta$ ).

<b>AINE</b>	<b><math>CC\alpha</math> y <math>CC\beta</math> (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>) para leche y músculo</b>
<b>Ácido flufenámico</b>	<b>5</b>
<b>Ácido meclofenámico</b>	<b>5</b>
<b>Ácido mefenámico</b>	<b>5</b>
<b>Ácido niflúmico</b>	<b>2.5</b>
<b>Carboxiübuprofeno</b>	<b>5</b>
<b>Fenilbutazona</b>	<b>2.5</b>
<b>Flurbiprofen</b>	<b>20</b>
<b>Indometacina</b>	<b>5</b>
<b>Naproxeno</b>	<b>10</b>
<b>Oxifenilbutazona</b>	<b>5</b>
<b>Piroxicam</b>	<b>2.5</b>
<b>Suxibuzona</b>	<b>5</b>

## 2.2. Comparación de los límites establecidos con los de otras metodologías analíticas.

A continuación, se realiza una comparación de los límites de decisión ( $CC\alpha$ ) establecidos para el método propuesto con los  $CC\alpha$  establecidos en la metodología analítica para el análisis de leche, tejido muscular y otras matrices (plasma sanguíneo, riñón y orina).

En la Tabla 4.5, se observa que con los límites establecidos en el presente estudio se detectan unas concentraciones un poco más elevadas que en los métodos consultados. Esto se debe a que al método propuesto es cualitativo y, por lo tanto, se han establecido unos límites en los que se detecte el analito en el 100 % de los casos (ya que el límite de decisión es igual que la capacidad de detección). Sin embargo, en el caso de métodos cuantitativos (mayoría de los métodos consultados) se establecen los límites de decisión con una probabilidad de error de un 5 % (como se propone en la legislación), detectando de este modo el 95 % de los casos no conformes. Por otra parte, se piensa que cuando se establecen niveles tan bajos de algunos analitos, como por ejemplo el nivel de 0.40  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para naproxeno [17] y de 0.25 a 2  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  para flurbiprofen [13], puede ser debido a que realmente no se ha comprobado de forma experimental la detección de esas concentraciones en matrices.

Tabla 4.5. Límites de decisión ( $CC\alpha$ ) establecidos en el método desarrollado (última columna, señalada en negrita), comparados con los rangos de límites de decisión ( $CC\alpha$ ) recopilados a partir de la metodología analítica empleada para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (apartado 3.3 de la introducción de este trabajo).

AINE	$CC\alpha$ en leche ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	$CC\alpha$ en músculo ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	$CC\alpha$ en plasma sanguíneo ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	$CC\alpha$ en riñón ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	$CC\alpha$ en orina ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	<b><math>CC\alpha</math> en leche y músculo (<math>\mu\text{g}/\text{Kg}</math>)</b>
<b>Ácido flufenámico</b>	-	-	-	-	0.25	<b>5</b>
<b>Ácido meclofenámico</b>	1.46 - 10	1.92	1.27	-	0.5	<b>5</b>
<b>Ácido mefenámico</b>	0.92 - 10	7.4	0.36 - 0.70	-	0.5	<b>5</b>
<b>Ácido niflúmico</b>	1.26 - 20	-	0.23	1.2	2.5	<b>2.5</b>
<b>Carboxiibuprofeno</b>	-	-	-	-	-	<b>5</b>
<b>Fenilbutazona</b>	0.55 - 6	0.92 - 3.86	1.19 - 25	0.58	5	<b>2.5</b>
<b>Flurbiprofen</b>	0.25 - 2	-	4.06 - 26	-	15	<b>20</b>
<b>Indometacina</b>	-	2.0	-	-	-	<b>5</b>
<b>Naproxeno</b>	0.50 - 5.9	0.4 - 6.36	1.74	2	1.5	<b>10</b>
<b>Oxifenilbutazona</b>	2.12 - 6	3.13	0.18	-	-	<b>5</b>
<b>Piroxicam</b>	-	0.4	1.24	-	1	<b>2.5</b>
<b>Suxibuzona</b>	2.86	-	0.20	-	-	<b>5</b>

### 2.3. Control del factor respuesta.

Durante los análisis realizados para la validación del método se han tomado también los datos de la **respuesta para la fenilbutazona (PBZ)**, obtenida de la solución para el control del factor respuesta de las distintas secuencias de la validación. La concentración de este AINE en el factor respuesta es de 25 ng/ml.

Con los datos del área de la PBZ en el factor respuesta, se ha calculado el factor respuesta de este AINE en cada una de las secuencias procesadas para la validación, dividiendo el área obtenida de este analito por la concentración teórica del analito en el extracto, **área PBZ en factor respuesta/25 ng/ml**. En la tabla 4.6, se muestran los valores obtenidos de media de los factores respuesta para PBZ de los controles que se han realizado durante la validación, la desviación estándar de todos los valores registrados y el valor mínimo de aceptación del factor respuesta, calculado como la **media menos 2 veces la desviación estándar**.

Para verificar el correcto funcionamiento del equipo, se controlará el factor respuesta de la PBZ antes de todas las secuencias de rutina que se procesen, dividiendo el área obtenida de este AINE por la concentración del patrón (25 ng/ml). Como criterio de aceptación, se aceptarán valores mayores al mínimo de aceptación (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Media, desviación estándar y valor mínimo de aceptación obtenidos a partir de la fórmula  $\text{área de la fenilbutazona (PBZ)}/25 \text{ ng/ml}$ , dato calculado en todas las secuencias de la validación.

	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Valor mínimo de aceptación</b>
<b>Factor respuesta PBZ</b>	643	125	393

### 2.4. Control de los patrones internos de las muestras.

Para la validación del método, se han tomado los datos de las áreas de ISTD (PBZ-D10 y NPX-D3) de las muestras adicionadas en el nivel del  $CC\alpha$  de todas las secuencias procesadas, de esos valores se ha calculado la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para músculo y para leche (Tabla 4.7). Para evaluar y controlar la respuesta (ratio  $\text{área analito}/\text{área ISTD}$ ), se han calculado los valores mínimos de aceptación de este dato a partir del coeficiente de variación (C.V.) obtenido en la validación (Tabla 4.8). Por último, también se han obtenido datos de las intensidades relativas de los iones producto de cada AINE en el nivel de adición del límite de decisión ( $CC\alpha$ ), este dato se denomina ion ratio, y se ha calculado un criterio de aceptación que es igual al valor medio de ion ratio  $\pm 3$  desviación estándar (Tabla 4.9). Estos intervalos servirán para aceptar como correcta la confirmación de la muestra enriquecida en el  $CC\alpha$  en cada secuencia de trabajo, y hacer trazables las intensidades

relativas de los iones producto del analito a las obtenidas en la validación. El valor de intensidad relativa se obtiene a través del área del ion producto cualificador relativa al área del ion producto mayoritario.

En todas las secuencias procesadas se debe realizar el control de la extracción de los patrones internos tanto en el blanco de reactivos, el blanco de muestra, en las muestras adicionadas en el nivel del CC $\alpha$  y en las muestras reales.

- En primer lugar, se verificará que en la muestra adicionada al nivel del CC $\alpha$ , el **valor de área del ISTD** obtenido sea mayor al área media del ISTD de las muestra adicionada al CC $\alpha$  en la validación al que se le habrá restado el % correspondiente al C.V obtenido en la validación (Criterio de aceptación de la Tabla 4.7).
- Además, por otra parte, hay que verificar que ni en el blanco de reactivos ni en el de muestra se observe **ningún pico interferente** en el tiempo de retención de cada AINE (señal  $\leq$  al 30 % del área del analito en la muestra adicionada en el CC $\alpha$  de la secuencia procesada).
- En cada secuencia procesada, se debe verificar que en la muestra adicionada al nivel del CC $\alpha$  el **ratio área AINE/área ISTD** está por encima del valor mínimo de aceptación obtenido en la validación (Tabla 4.8). Por otra parte, hay que observar que las **intensidades relativas de los iones producto**, de la muestra adicionada en el nivel del CC $\alpha$ , se encuentran comprendidas en el intervalo obtenido en la validación (Tabla 4.9).

Tabla 4.7. Valores de los patrones internos obtenidos de las muestras de músculo y leche analizadas durante la validación.

<b>Patrón interno</b>	<b>Media Área</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>C.V. (%)</b>	<b>Criterio de aceptación (Media Área - C.V)</b>
<b>Muestras de músculo</b>				
<b>Naproxeno-D3</b>	12599	6207	49	<b>6425</b>
<b>Fenilbutazona-D10</b>	20855	8179	39	<b>12721</b>
<b>Muestras de leche</b>				
<b>Naproxeno-D3</b>	31327	8488	27	<b>22869</b>
<b>Fenilbutazona-D10</b>	36024	10423	29	<b>25867</b>

Tabla 4.8. Valores calculados a partir de los datos de la respuesta (ratio área AINE/área ISTD) de las muestras de músculo y leche adicionadas en el CC $\alpha$  durante la validación.

<b>Analito (AINE)</b>	<b>Media Response</b>	<b>Desviación estándar</b>	<b>Valor mínimo de aceptación</b>	<b>C.V. (%)</b>
<b>Muestras de músculo adicionadas al CC<math>\alpha</math></b>				
<b>Carboxiibuprofeno</b>	0,0162	0,0066	<b>0,0030</b>	41
<b>Piroxicam</b>	0,4803	0,1973	<b>0,0858</b>	41
<b>Naproxeno</b>	0,1066	0,0288	<b>0,0490</b>	27
<b>Oxifenilbutazona</b>	0,0829	0,0313	<b>0,0202</b>	38
<b>Ácido niflúmico</b>	1,0583	0,3749	<b>0,3085</b>	35
<b>Flurbiprofen</b>	0,0323	0,0101	<b>0,0121</b>	31
<b>Suxibuzona</b>	0,0628	0,0201	<b>0,0226</b>	32
<b>Indometacina</b>	0,0361	0,0133	<b>0,0095</b>	37
<b>Fenilbutazona</b>	0,1757	0,0572	<b>0,0613</b>	33
<b>Ácido mefenámico</b>	0,6143	0,2296	<b>0,1552</b>	37
<b>Ácido flufenámico</b>	0,1164	0,0408	<b>0,0349</b>	35
<b>Ácido meclofenámico</b>	0,0711	0,0231	<b>0,0249</b>	32
<b>Muestras de leche adicionadas al CC<math>\alpha</math></b>				
<b>Carboxiibuprofeno</b>	0,0126	0,0047	<b>0,0031</b>	38
<b>Piroxicam</b>	0,1611	0,0479	<b>0,0652</b>	30
<b>Naproxeno</b>	0,0989	0,0126	<b>0,0737</b>	13
<b>Oxifenilbutazona</b>	0,0462	0,0148	<b>0,0166</b>	32
<b>Ácido niflúmico</b>	0,5332	0,0749	<b>0,3835</b>	14
<b>Flurbiprofen</b>	0,0115	0,0048	<b>0,0019</b>	42
<b>Suxibuzona</b>	0,0571	0,0190	<b>0,0192</b>	33
<b>Indometacina</b>	0,0437	0,0122	<b>0,0194</b>	28
<b>Fenilbutazona</b>	0,1658	0,0368	<b>0,0921</b>	22
<b>Ácido mefenámico</b>	0,5795	0,1293	<b>0,3209</b>	22
<b>Ácido flufenámico</b>	0,1181	0,0217	<b>0,0747</b>	18
<b>Ácido meclofenámico</b>	0,0627	0,0149	<b>0,0328</b>	24

Tabla 4.9. Intervalos de Ion Ratio de las muestras de leche adicionadas en el CC $\alpha$  durante la validación.

<b>Analito (AINE)</b>	<b>Intervalos del Ion Ratio</b>	
	<b>Muestras de músculo adicionadas al CC<math>\alpha</math></b>	<b>Muestras de leche adicionadas al CC<math>\alpha</math></b>
<b>Carboxiibuprofeno</b>	0.76 - 2.15	0.85 - 1.94
<b>Piroxicam</b>	1.99 - 2.65	1.78 - 2.73
<b>Naproxeno</b>	0.21 - 4.73	1.06 - 4.56
<b>Oxifenilbutazona</b>	0.60 - 2.95	0.34 - 2.81
<b>Ácido niflúmico</b>	0.95 - 1.32	0.93 - 1.39
<b>Flurbiprofen</b>	0.15 - 3.17	0.05 - 3.07
<b>Suxibuzona</b>	0.88 - 2.92	1.11 - 2.72
<b>Indometacina</b>	0.19 - 5.85	1.52 - 4.86
<b>Fenilbutazona</b>	0.54 - 2.05	0.79 - 1.90
<b>Ácido mefenámico</b>	0.95 - 2.57	0.92 - 2.55
<b>Ácido flufenámico</b>	2.27 - 9.64	3.19 - 10.53
<b>Ácido meclofenámico</b>	0.36 - 4.62	1.19 - 3.43

- Finalmente, como criterio de aceptación para las muestras reales, el blanco de reactivos y el blanco de muestra, se aceptará como correcta una muestra, cuando el valor de área del ISTD obtenido en ella sea mayor al área del ISTD en la muestra adicionada al CC $\alpha$  de esa secuencia, al que se le habrá restado el % correspondiente al C.V obtenido en la validación para tener en cuenta la variabilidad de esta área (este valor, por lo tanto, se debe calcular en los controles de cada secuencia rutinaria).

Tras observar que todos los criterios para el control de la correcta extracción del patrón interno se cumplen, se continúa con la comprobación de otros parámetros antes de concluir el análisis de las muestras.

## 2.5. Confirmación.

Para los métodos cualitativos, durante la validación, se estudia la confirmación de los analitos a nivel del CC $\alpha$  y por encima de él. La confirmación de las muestras se ha realizado aplicando los criterios de identificación de la Decisión 657/2002/CE a los controles de calidad, teniendo en cuenta los cuatro puntos que se explican a continuación:

- Como se ha indicado anteriormente, con este método se obtienen **4 puntos de identificación** (IPs) en el cromatograma de cada analito (1 IP del ion precursor y 1.5 IPs por cada ion producto). Para que una muestra se pueda considerar no conforme se deberían observar los 4 puntos de identificación correspondientes a los iones del analito a confirmar.
- Una muestra se considerará que podría ser no conforme cuando aparezca un pico en el cromatograma del ion producto de algún AINE, cuyo **tiempo de retención** relativo no difiera más del 2.5 % respecto al tiempo de retención relativo de la señal obtenida para dicho ion en la muestra enriquecida en el CC $\alpha$ .
- El resultado cualitativo (de identificación) se calcula a partir del valor del **ratio de área del AINE/área del patrón interno (ISTD)**, denominado respuesta. Al valor obtenido en la muestra adicionada en el CC $\alpha$  de la secuencia procesada junto con las muestras a analizar, se le restará el correspondiente C.V. (%), del analito correspondiente, obtenido en la validación (Tabla 4.8). El resultado de las muestras cuyo ratio de área del AINE/área de ISTD sea mayor o igual al ratio área del AINE/área ISTD de la muestra adicionada en el CC $\alpha$ , menos el CV (%), será mayor o igual al CC $\alpha$  de ese AINE (no conforme). El resultado de las muestras cuyo ratio de área de AINE/área de ISTD sea menor al ratio área AINE/área ISTD de la muestra adicionada en el CC $\alpha$ , menos el CV (%), será menor al CC $\alpha$  de ese AINE (conforme).
- Por último, para que la muestra sea considerada no conforme, la **intensidad relativa obtenida entre los iones producto (ion ratio)** debe ser semejante a aquella obtenida para la muestra adicionada en el CC $\alpha$ , teniendo en cuenta las tolerancias recogidas en la Decisión 657/2002/CE que se muestran en la tabla 3.4 del apartado materiales y métodos.

Tras observar todos estos criterios en los 12 cromatogramas correspondientes a los 12 analitos a determinar en la muestra procesada, se indicará si ésta es < CC $\alpha$  (conforme) para todos los analitos o  $\geq$  CC $\alpha$  (no conforme) para alguno de los analitos determinados.

Como ejemplo, en la Figura 4.7, se muestra un cromatograma de leche sin adicionar. Se pueden observar dos picos que se podrían corresponder con los dos iones hijo del ácido flufenámico, ya que se encuentran en el tiempo de retención propio de los iones producto de este analito y la señal es > del 30 % de la señal obtenida de la muestra enriquecida al nivel del CC $\alpha$  en esa secuencia.

Teniendo en cuenta los siguientes datos:

Respuesta en el CC $\alpha$  (secuencia) = 0.15  
Ion ratio muestra en el CC $\alpha$  (secuencia) = 4  
CV (%) de la respuesta para FFA (validación) = 18%

A continuación, se muestran los cálculos realizados:

$$18\% \text{ de } 0.15 = 0.027$$

$$0.15 - 0.027 = \mathbf{0.123}$$

**Respuesta (Figura 4.7) = ratio área AINE/ISTD = 11280.70 / 32318.14 = 0.349**  
**0.349 > Respuesta del CC $\alpha$  de la secuencia - % C.V. (0.123)**

Por lo tanto, podría ser sospechosa para la presencia de ácido flufenámico (FFA), pero:

**Ion Ratio (Figura 4.7) = 11280.70 / 97.73 = 115.43**  
Intensidad relativa en el CC $\alpha$  (secuencia)  $\rightarrow$  100/4 = 25%

Según las tolerancias Decisión 657/2002/CE (tabla 3.4 de materiales y métodos):

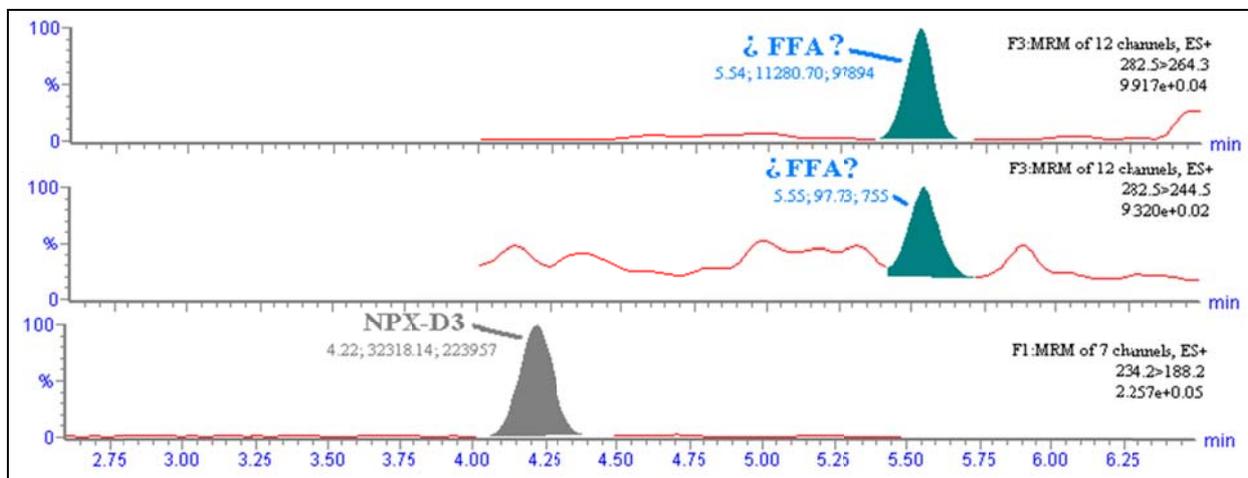
Para 25% de intensidad relativa (> 20-50 %) se permite una tolerancia de  $\pm 25\%$  de la intensidad relativa  $\rightarrow$  25% de 25 = 6.25

25%  $\pm$  6.25  $\rightarrow$  para que la muestra fuese no conforme debería tener una intensidad relativa de 18.75 a 31.25%

**Intensidad relativa muestra Figura 4.7  $\rightarrow$  100/115.43 = 0.86%**

Como se puede observar tras realizar los cálculos, el ion ratio de la muestra no es similar al ion ratio obtenido en la muestra adicionada en el CC $\alpha$  para FFA y, por ello, tampoco entra en las tolerancias de intensidad relativa de los iones producto recogidas en la Decisión 657/2002/CE. Por lo tanto, esta muestra es conforme para FFA pero no podría utilizarse como blanco para la detección de este AINE, ya que los picos detectados tienen un área > al 30% del área en el CC $\alpha$  y podrían ser debidos a la presencia de una sustancia que desconocemos.

Figura 4.7. Cromatograma del Ácido flufenámico (FFA) de una muestra de leche de caprino sospechosa para este analito.



# **CONCLUSIONES**



A partir de los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Con la finalidad de determinar antiinflamatorios no esteroideos, en leche y tejido muscular, no autorizados en sanidad animal, se ha puesto a punto un método sensible y sencillo para la realización de los programas de control oficial de residuos de medicamentos veterinarios en el Laboratorio de Salud Pública de Valencia.
2. El método desarrollado es cualitativo (identificación), y se ha validado según las recomendaciones de la Decisión 657/2002/CEE, requiriéndose para ello un equipo UPLC con espectrometría de masas.
3. Como resultado de la validación se han obtenido los parámetros selectividad/especificidad, límite de decisión y capacidad de detección que demuestran que el método cumple los requisitos técnicos establecidos en la legislación mediante la Decisión 657/2002/CEE.
4. Estos parámetros han servido para establecer unos criterios de aceptación para los controles de calidad internos. Estos controles son requisito de los ensayos químicos que se incluyen en el sistema de calidad establecido en el LSPV, acorde a la Norma UNE EN-ISO/IEC 17025.
5. El uso de un equipo UPLC-MS/MS ha permitido alcanzar una buena sensibilidad para todos los analitos, facilitando su identificación y aportando 4 puntos de identificación (IPs).



# **BIBLIOGRAFÍA**



- [1] Comunidad Valenciana (2005). Ley 4/2005, de 17 de junio, de Salud Pública de la Comunidad Valenciana. DOGV nº 5029/16.06.2005.
- [2] Comunidad Valenciana (2008). Decreto del Consejo 120/2008, del 5 de septiembre. DOCV nº 5945/09.09.2008.
- [3] Unión Europea (2004). Reglamento (CE) nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. DOUE L 2004 81110.
- [4] Botsoglou N A, Fletouris D J (2001). Drugs residues in foods, pharmacology, food safety and analysis. Edición nº 1. New York (Basel), USA. Editorial Marcel Dekker.
- [5] Constitución Española (2006). Ley 29/2006, de 26 de julio, de garantías y uso racional de los medicamentos y productos sanitarios. BOE nº 178/27.06.2006.
- [6] Unión Europea (2010). Reglamento (UE) nº 37/2010, de 22 de Diciembre, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. DOUE L 2010-80044.
- [7] Unión Europea (1996). Directiva 96/23/CE del Consejo, de 29 de abril, relativa a las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. DO L 125/23.05.1996.
- [8] Constitución española (1998). Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos. BOE nº188/7.08.1998.
- [9] Constitución española (1983). Real Decreto 1945/1983 de 22 de junio, por el que se regulan las infracciones y sanciones en materia de defensa del consumidor y de la producción agroalimentaria. BOE nº 168/15.07.1983.
- [10] Unión Europea (2002). Decisión de la Comisión 657/2002/CE, de 12 de agosto, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. OJ L 221/17.08.2002.
- [11] Laboratorio de Salud Pública de Valencia (2012). Anexo Técnico Rev. 15 del LSPV, para ensayos en productos agroalimentarios. 22.06.2012.
- [12] Dowling G, Gallo P, Malone E, Regan L A (2009). Rapid confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A 1216; 8117-8131.

- [13] Thompson L (2005). Anti-inflammatory Agents. Chapter: Pharmacology. The Merck Veterinary Manual. Edición nº 9. Whitehouse Station. Editorial Merck & Co. (<http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=0htm/bc/191605.htm>)
- [14] Dowling G, Gallo P, Regan L (2009). Confirmatory analysis of firocoxib in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 877; 541-546.
- [15] Lüllmann H, Mohr K, Ziegler A (2005). Atlas de farmacología. Barcelona. Masson, S.A.
- [16] Gallo P, Fabbrocino S, Dowling G, Salini M, Fiori M, Perretta G, Serpe L (2010). Confirmatory analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1217; 2832-2839.
- [17] Fabbrocino S, Danese V, Salini M, Dowling G, Guadagnuolo G, Serpe L, Gallo P (2010). Validation of multi-residue methods for determination of NSAIDs in plasma by HPLC-DAD and confirmation by ion trap LC/ESI-MS/MS. The State Laboratory, Co.Kildare, Ireland. Comunicación tipo poster de VDRA 2010 en Gante (Bélgica).
- [18] Dowling G, Malone E, Regan L (2010). Analytical strategy for the confirmatory analysis of basic non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The State Laboratory, Co. Kildare, Ireland. Comunicación tipo poster de VDRA 2010 en Gante (Bélgica).
- [19] Malone E M, Dowling G, Elliott C T, Kennedy D G, Regan L (2009). Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216; 8132-8140.
- [20] Hu T, Peng T, Li X-J, Chen D-D, Dai H-H, Deng X-J, Yue Z-F, Wang G-M, Shen J-Z, Xia X, Ding S-Y, Zhou Y-N, Zhu A-L, Jiang H-Y (2012). Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1219; 104-113.
- [21] Jedziniak P, Szprengier-Jusziewicz T, Pietruk K, Sledzinska E, Zmudzki J (2012). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 403: 2955-2963.
- [22] Dubrell-Chéneau E, Pirotais Y, Bessiral M, Roudaut B, Verdon E (2011). Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non steroidal anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218; 6292-6301.
- [23] Jedziniak P, Szprengier-Jusziewicz T, Olejnik M, Zmudzki J (2010). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal

muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 672; 85-92 (doi: 10.1016/j.aca.2010.04.031).

- [24] Antonic J, Cerkvenik-Flajs V (2010). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in blood plasma and milk by LC-MS/MS. Unizerza Ljubljani. Comunicación tipo poster de VDRA 2010 en Gante (Bélgica).
- [25] Dowling G, Malone E, Harbison T, Martin S (2012). Analytical strategy for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma and improved analytical strategy for the determination of authorised and non-authorised non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk by LC-MS/MS. *Food additives and Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* 27, nº 7; 962 - 982
- [26] Gentili A, Caretti F, Bellante S, Mainero Rocca L, Curini R (2012). Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Anal Bionanal Chem* 404; 1375 - 1388 (doi: 10.1007/s00216-012-6231-0).
- [27] Points J, Ganeshasunderam R, Castiglione N, Gormley L, Patterson I (2010). Multiresidue analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in kidney using LCMSMS. *Settin standards in analytical science*. Comunicación tipo poster de VDRA 2010 en Gante (Bélgica).
- [28] Emmie N M Ho, David K K Leung, Terence S M Wan, Nola H Yu (2006). Comprehensive screening of anabolic steroids, corticosteroids, and acidic drugs in horse urine by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1120; 38-53.
- [29] Linden G (1996). *Analytical Techniques for Foods and Agricultural Products*. New York. Editorial VCH.
- [30] Matissek R, Schnepel F M, Steiner, G (1998). *Análisis de los alimentos: fundamentos, métodos, aplicaciones*. Zaragoza. Editorial Acribia.



# **ANEXO**



**Tabla 1.** Métodos analíticos para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en diferentes matrices.

<b>AINEs</b>	<b>Matriz</b>	<b>Técnica analítica</b>	<b>Condiciones de separación</b>	<b>Procedimiento de extracción</b>	<b>Patrones internos (ISTD)</b>	<b>Rendimiento del método (%Rec<sup>1</sup>)</b>	<b>Autores, año [Referencia]</b>
<b>Ácido mefenámico</b> <b>Ácido niflúmico</b> <b>Carprofeno</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Fenilbutazona</b> <b>Naproxeno</b> <b>Oxifenilbutazona</b> <b>Suxibuzona</b>	<b>Leche de bovino</b>	<b>RRLC-ESI (-)-MS/MS</b>  Modo MRM, con 2 transiciones de cada analito.	Columna Agilent Eclipse Plus C <sub>18</sub> (2.1 x 50 mm, 1.8 µm de tamaño de partícula).  Fase móvil: -Solución A: Agua y acetonitrilo (90:10) y ácido acético 0.001 M. -Solución B: Acetonitrilo.	Extraer los analitos con acetonitrilo (ACN), adicionándolo dos veces. Añadir ácido ascórbico 10 mM y ácido clorhídrico 1 M, y comprobar el pH 3. Purificar las muestras con cartuchos de Extracción en Fase Solida (SEP) Evolute™ ABM. Activar los cartuchos con metanol y ácido ascórbico, pasar las muestras, lavar con metanol:agua, secar a vacío y eluir con n-hexano:éter dietílico (50:50). Evaporar con N <sub>2</sub> y redissolver.	Fenilbutazona-D10 Carprofeno-D3 Diclofenaco-D4 Ácido tolfenámico-D3	82 - 108	Dowlin G et al, 2009 [12]
<b>Firocoxib</b>	<b>Leche bovino</b>	<b>RRLC<sup>2</sup>-ESI<sup>3</sup> (+)-MS/MS</b>  Modo MRM <sup>4</sup> , 2 transiciones de cada analito.	Columna Agilent Eclipse Plus C <sub>18</sub> (2.1 x 50 mm, 1.8 µm de tamaño de partícula).  Fase móvil:	Realizar dos extracciones con acetonitrilo (ACN). Añadir al sobrenadante ácido ascórbico 10 mM y ácido clorhídrico 1 M, y comprobar que el pH se encuentre en 3. Purificación con cartuchos SEP Evolute ABM™. Activar los cartuchos con metanol y ácido	No indicado.	96.3 - 105.2	Dowling G et al, 2009 [14]

			-Solución A: Agua y acetonitrilo (90:10). -Solución B: Acetonitrilo.	ascórbico, pasar las muestras, lavar con metanol:agua (10:90). Secar a vacío y eluir con n- hexano:éter dietílico (50:50). Evaporar los extractos bajo N <sub>2</sub> y redisolver.			
<b>Ácido meclofenámico</b> <b>Ácido mefenámico</b> <b>Ácido niflúmico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Carprofeno</b> <b>5-Hidroxi flunixin</b> <b>Flurbiprofen</b> <b>Naproxeno</b> <b>Vedaprofeno</b>	<b>Leche bovino</b>	<b>HPLC con detección por fluorescencia</b>	Columna 80 A Max-RP Synergi sta inless steel (250 x 4.6 mm, 4 µm).  Fase móvil: -Solución A: o-Ácido fosfórico 0.010 mol/L a pH 2.1 -Solución B: Acetonitrilo.	Adicionar acetonitrilo y metanol (90:10) a 5 g de leche, agitar y centrifugar. Añadir al sobrenadante un tampón de ácido ascórbico 0.010 mol/l a pH 3.0 y ácido clorhídrico 1.0 mol/L. Pasar por cartuchos de SPE C18 1g previamente activados con hexano:éter dietílico (1:1), metanol y el tampón utilizado anteriormente, de ácido ascórbico y HCL. Lavar los cartuchos con el mismo tampón, y con agua miliQ:metanol (90:10), secarlos al vacío durante 30 minutos, y eluir con n-hexano:éter dietílico (1:1). Finalmente, las muestras se evaporan a sequedad bajo Nitrógeno y se redisuelven.	No indicado.	64 - 116.6	Gallo P et al, 2010 [16]
<b>Ácido meclofenámico</b> <b>Ácido mefenámico</b> <b>Ácido niflúmico</b> <b>Ácido salicílico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Carprofeno</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Fenilbutazona</b>	<b>Plasma</b>	Cualitativo: <b>IT LC<sup>5</sup>-ESI</b> <b>(+)-MS/MS</b> y <b>IT LC-ESI (-)-</b> <b>MS/MS</b>	Columna Synergi MAX RP (250 x 3,0 mm).  Fase móvil: -Solución A: 0.1 % Ácido acético en agua.	Centrifugar 5 mL de la muestra, hidrolizar adicionando HCl 1 M. Adicionar un tampón de ácido ascórbico 10 mM a pH 3.0, pasar por cartuchos C18 1g. Lavar los cartuchos con 3 mL del tampón de ácido ascórbico y con 3 mL de agua MiliQ. Secar a vacío durante	No indicado.	72 - 95.19	Fabbrocino S et al, 2010 [17]

<b>Flunixin</b> <b>5-Hidroxi flunixin</b> <b>Flurbiprofen</b> <b>Ibuprofeno</b> <b>Ketoprofeno</b> <b>Naproxeno</b> <b>Oxifenilbutazona</b> <b>Suxibutazona</b>		Cuantitativo: <b>HPLC-DAD</b> <sup>6</sup>	-Solución B: 0.1 % Ácido acético en ACN.  Columna Synergi MAX RP (250 x 4.6 mm).  Fase móvil: -Solución A: $\alpha$ -Ácido fosfórico 0.010 M a pH 2.8. -Solución B: Acetonitrilo.	10 minutos y eluir con n-hexano:dietileno (1:1). Evaporar y redisolver con 0.5 mL de metanol.			
<b>Firocoxib</b> <b>Piroxicam</b> <b>Propifenazona</b> <b>Ramifenazona</b>	<b>Plasma de          bovino</b>	<b>LC-MS/MS</b> (QqQ)	Columna CL Zorbax Eclipse Plus C <sub>18</sub> (3 x 50 mm, 1.8 $\mu$ m de tamaño de partícula).	Extracción con ácido clorhídrico 1M y acetonitrilo (con cloruro de sodio). Purificar las muestras con 5 ml de hexano. Centrifugar y evaporar el sobrenadante con nitrógeno a 60 °C. Redisolver con fase móvil.	No indicado.	91 - 104	Dowling G et al, 2010 [18]
<b>Ácido tolfenámico</b> <b>5-Hidroxi flunixin</b> <b>Meloxicam</b> <b>4-Metil</b> <b>aminoantipirina</b>	<b>Leche de          bovino.</b>	<b>LC-MS/MS</b>  <b>ESI (+) y (-)</b>  Modo MRM, con 2 transiciones por analito.	Columna Waters C <sub>8</sub> (150 mm x 3.9 mm, 5 $\mu$ m).  Fase móvil: -Solución A: Tampón de acetato de amonio 1.5 mM con ácido acético (pH 4.75).	Tras enriquecer las muestras con las soluciones correspondientes, se dejan 10 minutos en oscuridad. Se extrae con 10 ml de acetonitrilo y 2 gr de cloruro sódico. Mezclar y centrifugar. Recoger el sobrenadante y añadir 4 ml de n- hexano para purificar. Centrifugar y evaporar a sequedad en Nitrógeno a 55 °C. Redisolver las muestras en acetonitrilo:agua	Ácido tolfenámico-D3 Aminoantipirina-D3 Meloxicam-D3 Dexametasona-D4	99.4 - 102.1	Malone E M et al, 2009 [19]

			-Solución B: Acetonitrilo.	(28:72) y transferir a un vial.			
<b>Acemetacina</b>	<b>Músculo de cerdo</b>	<b>UPLC-MS/MS</b> QqQ	Columna Acquity™ UPLC BEH C <sub>18</sub> (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm de tamaño de partícula).	Pesar 5 g de muestra. Extraer con acetonitrilo y ácido fosfórico. Añadir sulfato de sodio anhidrido, agitar, dejar en ultrasonidos y centrifugar. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y repetir el procedimiento anterior. Mezclar los sobrenadantes obtenidos y añadir n-hexano con acetonitrilo. Agitar y centrifugar. Descartar el sobrenadante y pasar la capa inferior obtenida por cartuchos HLB previamente activados. Enjuagar con agua los cartuchos y eluir con una mezcla de hidróxido de amonio:acetonitrilo:tert- methyl:eter butyl. Evaporar a sequedad bajo Nitrógeno a 40 °C y redissolver con fase móvil. Mezclar en vortex, filtrar y transferir al un vial.	No lo indica.	61.7 - 125.7	Hu T et al, 2012 [20]
<b>Acetaminofeno</b>							
<b>Acetofenetidina</b>							
<b>Ácido salicílico</b>							
<b>Aminoantipirina</b>							
<b>Benzidamina</b>							
<b>Etodolac</b>							
<b>Etoricoxib</b>							
<b>Fencufen</b>							
<b>Firocoxib</b>							
<b>Flunixin</b>							
<b>Formilaminoantipirina</b>							
<b>Indometacina</b>							
<b>Indoprofen</b>							
<b>Ketorolac</b>							
<b>Ketoprofeno</b>							
<b>Loxoprofeno</b>							
<b>Meloxicam</b>							
<b>Mepirizole</b>							
<b>Nabumetone</b>							
<b>Naproxeno</b>							
<b>Nimesulide</b>							
<b>Oxaprozin</b>							
<b>Piroxicam</b>							
<b>Rofecoxib</b>							
<b>Sasapirina</b>							
<b>Sulindac</b>							
<b>Tenoxicam</b>							
<b>Tolmetin</b>							
<b>Zomepirac</b>							

<p> <b>Ácido tolfenámico</b>  <b>Ácido meclufenámico</b>  <b>Carprofeno</b>  <b>Celecoxib</b>  <b>Diclofenaco</b>  <b>Fenilbutazona</b>  <b>Firocoxib</b>  <b>Flunixin</b>  <b>5-Hidroxi-flunixin</b>  <b>Ibuprofeno</b>  <b>Ketoprofen</b>  <b>Meloxicam</b>  <b>Naproxeno</b>  <b>Oxifenilbutazona</b>  <b>Rofecoxib</b> </p> <p>           AINEs con pH básico:  <b>4-Acetilaminofenazona</b>  <b>4-Aminofenazona</b>  <b>4-Formilaminofenazona</b>  <b>4-Metilaminofenazona</b> </p>	<p><b>Leche</b></p>	<p> <b>LC-MS/MS</b>            QTrap 5500         </p> <p> <b>ESI (-)</b> para AINEs ácidos.         </p> <p> <b>ESI (+)</b> para AINEs con pH básico.         </p> <p>           Modo MRM, con 2 transiciones por analito.         </p>	<p>           Precolumna Phenomenex Luna C<sub>8</sub> (2.0 x 4 mm).         </p> <p>           Columna Phenomenex Luna C<sub>8</sub> (2.1 x 150 mm, 3 µm de tamaño de partícula).         </p> <p>           Fase móvil:            -Solución A: Metanol:acetonitrilo (8:2)            -Solución B: Formato amonio 0.01 mol/l a pH 5.         </p>	<p>           Tras adicionar las concentraciones adecuadas de los patrones internos y las correspondientes concentraciones de AINEs, mezclar y esperar 10 minutos.         </p> <p>           Extraer con acetonitrilo y acetato amonio, agitar y centrifugar.         </p> <p>           El sobrenadante se separa en dos porciones para analizar por una parte los AINEs ácidos y por otra los básicos.         </p> <p>           AINEs con pH ácido:            Purificación de 5 ml del sobrenadante en cartuchos Sep-Pak NH<sub>2</sub> (con una capa adicional de sulfato de sodio), activar los cartuchos, pasar las muestras y eluir con ácido fórmico al 5% en acetonitrilo. Añadir DMSO (dimetilsulfóxido) a la elución y evaporar bajo Nitrógeno a 40 °C (hasta aproximadamente 0.25 ml). Finalmente, transferir al vial.         </p> <p>           AINEs con pH básico (metabolitos de metanizole):            Evaporar 2.5 ml del sobrenadante a sequedad bajo corriente de Nitrógeno, redissolver en fase móvil y transferir al vial.         </p>	<p> <b>Ácido Tolfenámico-D4</b>  <b>Carprofeno-D3</b>  <b>Diclofenaco-D4</b>  <b>Fenilbutazona-D10</b>  <b>Firocoxib-D6</b>  <b>Flunixin-D3</b>  <b>Meloxicam-D3</b>  <b>4-Metilaminofenazona-D4</b> </p> <p>71 - 116</p>	<p>Jedziniak P et al, 2012 [21]</p>
--	---------------------	--	---	--	---	-------------------------------------

<b>Ácido mefenámico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Carprofeno</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Fenilbutazona</b> <b>Flunixin</b> <b>5-Hidroxi flunixin</b> <b>Ketoprofeno</b> <b>Meloxicam</b> <b>Naproxeno</b> <b>Oxifenilbutazona</b> <b>Vedaprofeno</b>	<b>Leche bovino</b>	<b>LC-ESI (-)-MS/MS</b> Quantum Ultra tandem quatrupolo.  2 transiciones MRM de cada analito.  *ESI (+) para confirmar ketoprofeno.	Columna C <sub>18</sub> Uptisphere Strategy (150 x 2 mm, 5 µm).  Fase móvil: -Solución A: Ácido acético 1 mM:acetonitrilo (90:10). -Solución B: Acetonitrilo.	Extracción con metanol. Dejar en un agitador rotatorio a 100 rpm durante 10 min y centrifugar. Transferir 5 ml del sobrenadante a un nuevo tubo y evaporar a sequedad bajo Nitrógeno. Redisolver y filtrar el extracto con jeringa.	Flunixin-D3 Fenilbutazona-D10 Meloxicam-D3 Diclofenaco-D4 Carprofeno-D3	94.7 - 110	Dubreil-Chéneau E et al, 2011 [22]
<b>Ácido mefenámico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Carprofeno</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Fenilbutazona</b> <b>Flunixin</b> <b>Ketoprofeno</b> <b>Meloxicam</b> <b>Naproxeno</b> <b>Oxifenilbutazona</b>	<b>Músculo de cerdo, caballo y pollo</b>	<b>LC-ESI (-)-MS/MS</b> QqQ  Modo MRM, con 2 transiciones por analito.	Precolumna Luna C <sub>18</sub> (2.0 x 4mm).  Columna Inertsil ODS-3 (2.1 x 150 mm, 3 µm de tamaño de partícula).  Fase móvil: -Solución A: Acetonitrilo. -Solución B: Ácido fórmico al 0.1%.	A 2 g. de muestra añadir 4 ml de un tampón de acetato de sodio con ácido ascórbico (ajustado a pH 4.5 con ácido acético) y 50 µl de β-glucuronidasa dando lugar a una hidrólisis enzimática de la muestra. Mezclar e incubar. Enfriar la muestra, extraer con acetonitrilo, agitar y centrifugar. Recoger el sobrenadante, repetir la extracción con acetonitrilo y centrifugar. Pasar el sobrenadante a través de cartuchos Sep Pak Alumina N activados, y evaporar la elución en el evaporador rotatorio a 50 °C. Posteriormente, el extracto se pasa por cartuchos C <sub>18</sub> previamente activados, se lavan con ácido ascórbico y agua, y se secan al vacío. Los analitos se eluyen con n-hexano:acetato de	Flunixin-D3 Meloxicam-D3 Diclofenaco-D4 Carprofeno-D3 Fenilbutazona-D10 Ácido tolfenámico-D4	80 - 131	Jedziniak P et al, 2010 [23]



			Acetonitrilo	lavar con metanol:agua (10:90), secar en vacío y eluir con n- hexano:éter dietílico:acetonitrilo:metanol. Homogeneizar y transferir a los viales.			
	<b>Leche</b>			Tras enriquecer las muestras correspondientes y añadir los patrones internos, esperar 15 minutos. Añadir acetonitrilo, agitar y centrifugar. Guardar el sobrenadante y volver a extraer con acetonitrilo. Mezclar los dos sobrenadantes y añadir ácido ascórbico y ácido clorhídrico. Comprobar el pH 3. Purificar con los cartuchos de SPE Evolute ABM™. Pasar las muestras por los cartuchos previamente activados, lavar con metanol:agua (10:90), secar bajo vacío y eluir con n- hexano:éterdietílico:acetonitrilo: metanol. Homogeneizar y transferir a los viales.		74 - 109	
<b>Acetaminofén</b> <b>Ácido meclufenámico</b> <b>Ácido salicílico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Carprofeno</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Etodolac</b> <b>Fenilbutazona</b> <b>Flunixin</b>	<b>Leche</b> <b>bovino</b>	<b>HPLC-MS/MS</b> QqQ  <b>ESI (-)</b>  2 reacciones de monitorización seleccionadas por analito.	Precolumna Waters (20 x 3.9 mm I.D., 5 µm de tamaño de partícula).  Columna XTerra-MS C <sub>18</sub> (150 x 4.6 mm	A 5 ml de leche adicionar acetonitrilo, mezclar en el vortex y dejar en un baño de ultrasonidos. Centrifugar. Dejar el sobrenadante bajo Nitrógeno a 30 °C para eliminar el disolvente orgánico, hasta obtener un volumen de 5 ml. Centrifugar los extractos. Pasar por cartuchos OASIS HLB	Acetaminofén-D3 Ácido meclufenámico- D4 Ácido tolfenámico-D4 Ácido salicílico-D6 Carprofeno-D3 Diclofenaco-C6 Etodolac-D3 Fenilbutazona-C12	97 - 101	Gentili A et al, 2012 [26]

<b>5-Hidroxi-Flunixin</b> <b>Ibuprofeno</b> <b>Ketoprofeno</b> <b>Naproxeno</b> <b>Nimesulide</b> <b>Meloxicam</b>	<b>Tejido muscular</b>	I.D., 5 µm de tamaño de partícula).	previamente activados, secarlos al vacío y lavarlos con hexano. Eluir con metanol y acetonitrilo. La elución obtenida se concentra en 500 µl bajo Nitrógeno a 30 °C y se ajusta el volumen final a 1 ml con metanol. Los extractos se filtran y se inyectan 20 µl en el equipo HPLC-MS/MS.	Flunixin-D3 Ibuprofeno-D3 Ketoprofeno-D3 Meloxicam-D3 Naproxeno-D3 Nimesulide-D5			
Fase móvil: -Solución A: Acetonitrilo:metanol (50:50) con DBA 0.2 mmol/L. -Solución B: Agua con DBA 0.2 mmol/L.		A 5 g. de muestra añadir metanol y homogeneizar. Añadir acetonitrilo, agitar en vortex, dejar en ultrasonidos y centrifugar. Repetir el proceso de extracción con acetonitrilo. Mezclar los dos extractos obtenidos, concentrarlos en un baño de agua a 30 °C hasta 5 ml y centrifugar. Pasar por cartuchos OASIS HLB previamente activados, secarlos al vacío y lavarlos con hexano. Eluir con metanol y acetonitrilo. La elución obtenida se concentra en 500 µl bajo Nitrógeno a 30 °C y se ajusta el volumen final a 1 ml con metanol. Los extractos obtenidos se filtran y se inyectan 20 µl en el equipo HPLC-MS/MS.					
<b>Ácido niflúmico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Carprofeno</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Fenilbutazona</b>	<b>Riñón de caballo, bovino y cerdo</b>	<b>HPLC-ESI (-)-MS/MS</b>  Quatro Platinum detector.	Columna Waters XBridge Phenyl (100 x 2.1 mm, 3.5 µm de tamaño de	A 2g de muestra añadir 4 ml de agua Elga, 0.5 ml de hidróxido de potasio 10 M., y homogeneizar. Añadir un tampón de hidróxido de potasio 10 mM, y agitar. Hidrólisis	No lo indica	No lo indica	Points J et al. 2010, [27]

<b>Flunixin</b> <b>Ibuprofeno</b> <b>Meloxicam</b> <b>Naproxeno</b> <b>Vedaprofeno</b>		Modo MRM, con 3 transiciones por analito.	partícula).  Fase móvil: -Solución A: 90 % Ácido acético 0.001 M, formato amonio 50 mM (99.8:0.2), y 10% acetonitrilo. -Solución B: Acetonitrilo.	de la muestra en un baño de agua a 60 °C 15 min. Agitar y enfriar. Ajustar el pH a 2.0 con ácido fosfórico. Añadir 4 ml de agua, agitar y centrifugar. Purificar con cartuchos de SPE activados con TBME ( tert butyl metyl ether), MeOH y H <sub>2</sub> O. Pasar por los cartuchos las muestras y lavarlos con un tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 7.0 y MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40), secar a vacío y eluir con ácido fórmico:TBME:MeOH (5:75:20).Añadir formiat amónico 50 mM con H <sub>2</sub> O:TBME:MeOH (5:20:75) y 500 µl de fase móvil. Secar bajo N <sub>2</sub> , ajustar el volumen a 1 ml y filtrar a un vial.			
<b>Ácido flufenámico</b> <b>Ácido mefenámico</b> <b>Ácido niflúmico</b> <b>Ácido tolfenámico</b> <b>Alclofenaco</b> <b>Celecoxib</b> <b>Deracoxib</b> <b>Diclofenaco</b> <b>Eltenac</b> <b>Etodolac</b> <b>Fenilbutazona</b> <b>Fenoprofen</b> <b>Flunixin</b> <b>Flurbiprofen</b> <b>Indoprofen</b> <b>Isoxicam</b>	<b>Orina de          caballo</b>	<b>LC-ESI (-)-          MS/MS</b> QqQ  Modo MRM, con una transición por analito.	Columna fase inversa LC-8-DB (3.3 cm L x 2.1 mm I.D., 3 µm de tamaño de partícula).  Fase móvil: -Solución A: Ácido acético 5mM. -Solución B: Acetato de amonio 10 mM. -Solución C: Metanol.	Diluir con un tampón de fosfato potásico (ph 6.0, 0.1 M) y ajustar el pH a 6.0 usando hidroxido de potasio (KOH) 0.1M y ácido clorhídrico (HCl) 0.1M. Añadir una solución de proteasa y b-glucuronidasa. Incubar a 65 °C durante 3.5 horas. Diluir con un tampón de fosfato potásico y purificar con cartuchos Bond Elut Cristify. Activar los cartuchos con metanol, agua desionizada y el tampón de fosfato potásico, pasar las muestras, lavar los cartuchos con un tampón de fosfato potásico y con ácido acético, y eluir con	Hidroxicortisona-D4 Ácido meclofenámico	<b>FBP<sup>7</sup>: 80</b> <b>FFA<sup>7</sup>: 51</b> <b>MCF<sup>7</sup>: 55</b> <b>NPX<sup>7</sup>: 97</b> <b>NFL<sup>7</sup>: 54</b> <b>PBZ<sup>7</sup>: 12</b>	Ho E N M et al, 2006 [29]

---

**Lornoxicam**  
**Meloxicam**  
**Naproxeno**  
**Nimesulide**  
**Oxaprozín**  
**Piroxicam**  
**Sulindac**  
**Tenoxicam**  
**Valdecoxib**  
**Vedaprofeno**  
**Zomepirac**

---

diclorometanol:acetato de etilo  
(4:1). Añadir hidróxido de sodio y  
cloruro de sodio a la elución.  
Filtrar el extracto y evaporar a  
sequedad bajo Nitrógeno a 60 °C.  
Redisolver y transferir a un vial  
cónico.

<sup>1</sup> Recuperación de los analitos (%).

<sup>2</sup> Cromatografía líquida de rápida resolución (RRLC).

<sup>3</sup> Modo ionización electrospray (negativo o positivo).

<sup>4</sup> Múltiple reacción de monitorización.

<sup>5</sup> Trampa iónica (IT) asociada a cromatografía líquida (LC).

<sup>6</sup> Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector Diodo Array (DAD).

<sup>7</sup> Flurbiprofen (FBP), ácido flufenámico (FFA), ácido meclufenámico (MCF), naproxeno (NPX), ácido niflúmico (NFL), fenilbutazona (PBZ).