



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de fàrmacs antiparasitaris

Anna Martínez Villalba



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- Compartitqual 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - Compartitqual 3.0. España de Creative Commons.**

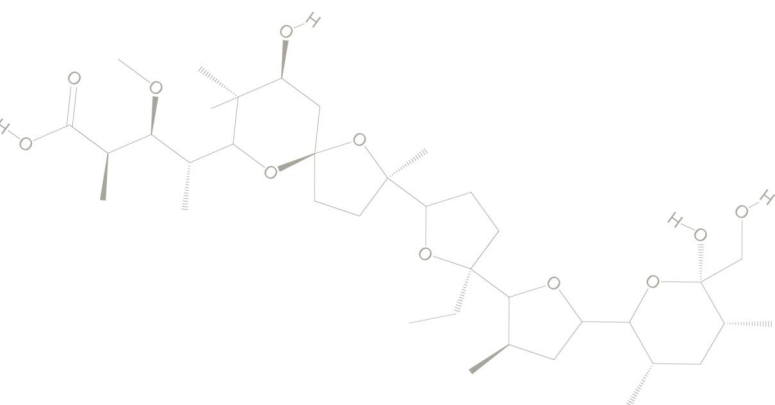
This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-ShareAlike 3.0. Spain License.**

DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER A LA DETERMINACIÓ DE FÀRMACS ANTIPARASITARIS

Anna Martínez Villalba



UNIVERSITAT DE
BARCELONA





UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Programa de Doctorat “Química Analítica i Medi Ambient”

**DESENVOLUPAMENT DE METODOLOGIA ANALÍTICA PER A LA DETERMINACIÓ DE
FÀRMACS ANTIPARASITARIS**

Memòria presentada per tal d’optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona
per na

Anna Martínez Villalba

Directors de la tesi:

Dra. M^a Teresa Galceran i Huguet
Química Analítica
Universitat de Barcelona

Dra. Encarnación Moyano Morcillo
Química Analítica
Universitat de Barcelona

Barcelona, setembre 2016

La **Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet**, professora emèrita de la Universitat de Barcelona, i la **Dra. Encarnación Moyano Morcillo**, professora titular de Química Analítica,

FAN CONSTAR:

que la present memòria titulada “Desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de fàrmacs antiparasitaris” ha estat realitzada sota la nostra direcció per la **Sra. Anna Martínez Villalba** en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades per la citada doctoranda.

I perquè així es faci constar, expedim i firmem el present certificat.

Barcelona, setembre de 2016

Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet

Dra. Encarnación Moyano Morcillo

Al Max i al Pol

AGRAÏMENTS

Ha estat molt llarg el camí recorregut per arribar fins aquí i moltes les persones amb les què he compartit els bons i els mals moments. Infinitat de records que omplen una important etapa de la meua vida i per aquest motiu vull expressar el meu agraïment a totes les persones que en algun moment m'han acompanyat en aquest viatge.

En primer lloc vull agrair a les meves directores de tesi, la Dra. Maria Teresa Galceran i la Dra. Encarnación Moyano, el donar-me la possibilitat de realitzar la tesi al seu grup de recerca, així com els coneixements i consells compartits, però també en especial el fet de no oblidar-se de mi anys després de deixar el grup de recerca i insistir-me i ajudar-me a finalitzar la redacció de la memòria de tesi.

Gràcies també al Dr. Xavier Santos per guiar els meus primers passos pel CECEM i ensenyar-me pràcticament tot el què sé sobre cromatografia de gasos .

Gracias Óscar (lo siento, llamarte Dr. Óscar Núñez en estas líneas me suena demasiado formal) por enseñarme electroforesis capilar, por ser “co-workers” durante unos meses, fue un placer trabajar contigo, y por compartir tantos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A tots els integrants del CECEM al llarg d'aquests anys, els més veterans i els novells, i en especial a vosaltres Xavi i Héctor per treure'm un somriure en els moments difícils i aconsellar-me per tirar endavant sempre que ho vaig necessitar. Y a ti Élide, por entenderme y apoyarme en tantas ocasiones, ayudarme con las catástrofes informáticas y formar el mejor equipo posible de “vet-girls”. Que sepas que echo mucho de menos esas tardes de “buenas migas”.

I would like to thank Professor Jana Hajslova for accepting me in her research group giving me the possibility to work with her team. Thanks also to Lukas and Kamilla for your warm welcome and professional as well as personal help during my stay in Prague.

A totes les persones que un cop incorporada al món laboral, coneixedores de la meua situació, m'han recolzat amb les seves paraules d'ànim per tirar endavant aquest projecte.

Vull donar les gràcies a la meua família per estar sempre al meu costat i creure fermament en les meves capacitats, i especialment als meus pares per tot el recolzament que m'han donat al llarg d'aquests anys, i especialment aquest últims mesos fent-se càrrec del Max.

Finalment et vull donar les gràcies a tu, perquè sense tu jo no estaria aquí ara mateix. Per alegrar-te dels meus èxits i consolar-me en els moments difícils. Per animar-me a continuar endavant i no llençar la tovallola, ajudar-me en tot moment i fer-me la vida més fàcil quan jo no tenia temps ni de saber on era. Gràcies també pel fill que m'has donat, que espero que algun dia valori l'esforç fet per poder posar un punt i final a aquesta etapa tan dura i alhora tan plena de la meua vida.

ÍNDEX

RESUM	iii
OBJECTIUS I ESTRUCTURA.....	vii
1. CAPÍTOL 1. Introducció	1
1.1. Els fàrmacs antiparasitaris.....	5
1.2. Consum de medicaments antiparasitaris	9
1.3. Implicacions dels fàrmacs antiparasitaris en la salut pública. Toxicitat.	11
1.4. Legislació.....	13
1.4.1. Medicina veterinària i seguretat alimentària	13
1.4.2. Additius per a pinsos.....	16
1.5. Metodologia analítica.....	20
1.5.1. Metodologia analítica per a la determinació coccidiostats.....	21
1.5.2. Metodologia analítica per a la determinació benzimidazoles.....	35
1.6. Presència de fàrmacs antiparasitaris en aliments i el medi ambient.....	47
2. CAPÍTOL 2. Anàlisi de fàrmacs antiparasitaris	51
2.1. Introducció.....	53
2.2. Treball experimental	59
2.2.1. Article I. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats.....	63
2.2.2. Article II. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the determination of toltrazuril and its metabolites in food.	75
2.2.3. Article III. Analysis of amprolium by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry.....	87
2.2.4. Article IV. Field amplified sample injection-capillary zone electrophoresis for the analysis of amprolium in eggs.....	95

2.2.5. Article V. Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food.	105
2.2.6. Article VI. Ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples.....	121
3. CAPÍTOL 3. Discussió de resultats	133
3.1. Tractament de mostra	135
3.2. Separació dels anàlits	140
3.3. Espectrometria de masses.....	148
3.4. Paràmetres de qualitat i aplicació	159
CONCLUSIONS	167
BIBLIOGRAFIA.....	177
ABREVIATURES I ACRÒNIMS.....	191

RESUM

Els fàrmacs veterinaris són utilitzats per tractar i prevenir malalties en els animals de producció, ja que és imprescindible disposar d'unes condicions salubres per als animals i així assegurar un subministrament de carn de qualitat amb garanties de seguretat. Ara bé, l'ús, que en alguns casos s'ha convertit en abús d'aquestes substàncies, ha portat a una creixent preocupació per part de la societat deguda a la possible presència d'aquests compostos en els productes d'origen animal destinats al consum humà i els possibles efectes adversos que aquests puguin provocar en la salut dels consumidors. Per aquest motiu i responent a la demanda de la població, tan la Unió Europea (per als països que hi pertanyen) com les autoritats responsables dels diferents països, han establert legislació on es fixen els límits màxims de residu (MRLs) permesos en els diferents teixits animals. Això obliga a disposar de mètodes analítics sensibles i selectius que permetin determinar aquests compostos amb garanties de seguretat. En aquest context, la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses ha esdevingut la tècnica per excel·lència per a l'anàlisi de fàrmacs veterinaris ateses la seva sensibilitat que permet la detecció de baixes concentracions de residus de matrius alimentàries i la seva capacitat de caracteritzar compostos químics i identificar substàncies desconegudes.

La present tesi s'ha centrat en el desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de fàrmacs veterinaris antiparasitaris, concretament els pertanyents a les famílies dels anticoccidials i les benzimidazoles en aliments i aigües. Amb l'objectiu de posar a punt mètodes altament sensibles, selectius i ràpids, els mètodes desenvolupats s'han basat majoritàriament en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) emprant columnes cromatogràfiques de partícules de rebliment de nova tecnologia (partícules sub-2 μm i de nucli sòlid) per tal de millorar l'eficàcia i la resolució; així mateix, els tractaments de mostra aplicats s'han basat principalment en estratègies d'extracció en fase sòlida i QuEChERS per tal de minimitzar la manipulació de la mostra i el temps emprat en aquesta etapa de l'anàlisi. La fase estacionària generalment emprada per a la separació cromatogràfica d'aquests compostos ha estat l'octadecilsilà si bé l'anàlisi d'ampròlium, un anticoccidial catiònic, ha requerit d'una fase estacionària de tipus HILIC per a la seva separació. Alternativament es presenta un mètode basat en l'electroforesi capil·lar de zona i pre-concentració in-line de la mostra mitjançant el mètode FASI per a la determinació d'aquest mateix compost en ous. Finalment, per primer cop s'ha avaluat l'aplicabilitat

d'una tècnica d'anàlisi directa, el Direct analysis in real time (DART), acoblada a l'espectrometria de masses d'alta resolució (Orbitrap) per a la determinació de coccidiostats en pinsos i benzimidazoles en llet posant de manifest que aquesta és una tècnica adequada per a la determinació d'aquests compostos, especialment les benzimidazoles, amb l'avantatge de proporcionar resultats quantitius en qüestió de segons.

Paral·lelament a l'establiment i validació de les condicions òptimes per a cadascun dels mètodes d'anàlisi desenvolupats, aquesta tesi planteja un estudi exhaustiu del comportament dels compostos estudiats en espectrometria de masses, tan des del punt de vista de la ionització, emprant diferents fonts API compatibles amb l'acoblament a la cromatografia de líquids, com pel que fa referència a la fragmentació dels mateixos emprant diversos tipus d'analitzadors de masses. Això ha permès evidenciar que l'electrosprai és la font d'ionització més adequada per a l'anàlisi de coccidiostats, observant-se la formació d'adductes amb sodi de forma predominant en la ionització dels polièters ionòfors. Ara bé, l'anàlisi del toltrazuril i els seus metabòlits ha requerit la utilització de l'APCI ja que l'ió generat en la font d'electrosprai no és suficientment estable com per poder ser sotmès a una etapa d'espectrometria de masses en tàndem. Aquesta mateixa font, l'APCI, es proposa per a l'anàlisi de benzimidazoles per ser la única capaç d'ionitzar tota la família de compostos estudiats. Els efectes matriu han estat avaluats en tot moment i fins i tot se n'ha tret profit de l'efecte d'enhancement observat durant l'anàlisi d'ampròlium, millorant així la sensibilitat del mètode. L'establiment de les rutes de fragmentació ha permès determinar les transicions més sensibles i selectives per tal de poder ser utilitzades com a ions diagnòstic dels mètodes d'anàlisi LC-MS/MS. Així mateix, la utilització de l'espectrometria de masses d'alta resolució i relativa alta resolució mitjançant la utilització d'analitzadors de tipus Orbitrap i de triple quadrupol de quadrupols hiperbòlics respectivament, ha estat també avaluada per a la millora de la selectivitat i sensibilitat dels mètodes desenvolupats i la identificació d'estructures moleculars desconegudes.

OBJECTIUS I ESTRUCTURA

El control de la presència de residus de fàrmacs veterinaris en aliments d'origen animal i en el medi ambient ha esdevingut de cabdal importància en les darreres dècades atesos els efectes adversos que aquests poden provocar en els éssers humans i en els organismes que hi puguin estar exposats. D'entre els fàrmacs veterinaris, els antiparasitaris s'empren de forma generalitzada i en grans quantitats com a tractament preventiu per evitar malalties parasitàries, les quals, en tenir una gran incidència, causen importants pèrdues econòmiques a la indústria ramadera. Actualment la presència de residus d'antiparasitaris en productes d'origen animal està estrictament legislada i l'ús d'alguns dels compostos no està autoritzat. Per aquests motius, cal disposar de metodologia analítica eficient, ràpida i senzilla capaç de determinar aquests compostos a molt baixes concentracions. En aquesta tesi s'estudien dues famílies de fàrmacs veterinaris d'ampli ús, els coccidiostats i les benzimidazoles, per a les quals l'establiment de metodologia analítica presenta dificultats degut a les diferents propietats fisico-químiques dels compostos que les componen.

En aquest context l'objectiu general de la tesi ha estat el desenvolupament de nous mètodes analítics basats en tècniques de separació i en espectrometria de masses suficientment sensibles i selectius per a la determinació dels fàrmacs veterinaris seleccionats. Per altra banda, amb l'objectiu de desenvolupar mètodes ràpids que permetin analitzar simultàniament un nombre elevat de compostos, es pensa fer especial incidència en procediments que requereixin un mínim de manipulació de la mostra i un temps d'anàlisi relativament curt.

Aquests objectius generals es poden desglossar en els següents objectius concrets:

- Emprar columnes amb rebliments de petit diàmetre de partícula (sub-2 μ m) i de nucli sòlid per tal de desenvolupar mètodes ràpids de cromatografia de líquids d'ultra-alta eficàcia (UHPLC) adequats per l'anàlisi dels fàrmacs antiparasitaris objecte d'estudi d'aquesta tesi.
- Avaluar l'aplicabilitat de l'electroforesi capil·lar per a l'anàlisi dels fàrmacs veterinaris iònics de les famílies estudiades.
- Estudiar el comportament dels coccidiostats i les benzimidazoles en espectrometria de masses. S'avaluaran diferents fonts d'ionització a pressió

atmosfèrica (ESI, APCI, APPI i tècniques d'ionització *ambient*) així com diferents analitzadors tant de baixa resolució (trampa d'ions i quadrupols) com d'alta resolució (Orbitrap).

- Establir les rutes de fragmentació dels compostos estudiats en aquesta tesi, identificar els ions producte i proposar les transicions més sensibles i selectives per a la seva posterior identificació i quantificació en mostres de productes alimentaris.
- Estudiar l'aplicabilitat de les tècniques *ambient* de recent implantació per a l'anàlisi directa de mostres sense emprar cap separació cromatogràfica per tal de determinar els fàrmacs antiparasitaris estudiats en aquesta tesi.

Aquesta memòria de tesi s'ha estructurat en els següents apartats:

- Una introducció on es comenta la importància de desenvolupar mètodes analítics per al control de la presència de residus de fàrmacs antiparasitaris en aliments que inclou informació sobre la naturalesa de les famílies de compostos estudiades, els coccidiostats i les benzimidazoles, així com la legislació vigent que fa referència a aquests compostos i la metodologia analítica emprada habitualment per a la seva l'anàlisi.
- El segon capítol recull el treball experimental realitzat el qual s'inclouen els sis articles científics publicats en el transcurs de la present tesi precedits per una breu introducció a les tècniques analítiques, tecnologia i instrumentació utilitzades en el desenvolupament dels mètodes analítics que es presenten a cadascuna de les publicacions. Les publicacions han estat agrupades essencialment per les famílies de compostos analitzades, així el primer bloc agrupa les publicacions referents a l'anàlisi de coccidiostats, les tres primeres basades en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses i una quarta on es presenta un mètode basat en l'electroforesi capil·lar per a l'anàlisi d'ampròlium. A continuació s'inclou un mètode de determinació de benzimidazoles en llet novament mitjançant cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses i finalment s'adjunta la publicació del treball

desenvolupat en col·laboració amb l'Institut de Tecnologia Química de Praga en el qual es presenten dos mètodes d'anàlisi de coccidiostats i benzimidazoles en pinsos i llet respectivament mitjançant una tècnica d'ionització *ambient* com és el *Direct Analysis in Real Time* (DART) acoblat a l'espectrometria de masses d'alta resolució, tècnica adequada per a l'anàlisi directa d'aquests compostos sense separació cromatogràfica prèvia.

- El tercer capítol està dedicat a la discussió dels resultats obtinguts. Aquest capítol es subdivideix en quatre apartats temàtics segons l'etapa del procediment analític que es comenta. Així, en el primer subapartat es discuteixen els resultats obtinguts en el tractament de mostra aplicat en cada cas, els dos següents es focalitzen en la separació dels anàlits d'estudi i el seu comportament des del punt de vista de l'espectrometria de masses on per tant, es comenten aspectes relacionats amb la seva ionització i fragmentació en les diferents fonts d'ionització i analitzadors de masses emprats. En darrer lloc s'avaluen els paràmetres de qualitat de cadascun dels mètodes desenvolupats i es posen en context els resultats obtinguts en l'anàlisi de mostres d'aliments.
- Finalment s'inclouen les conclusions obtingudes en el treball realitzat en aquesta tesi, així com la bibliografia corresponent.

CAPÍTOL 1

Introducció

Avui dia, i amb l'objectiu d'incrementar la productivitat ramadera i així poder abastir una població mundial en constant creixement, s'utilitzen sistemes de ramaderia intensiva els quals mantenen normalment els animals en condicions de superpoblació a temperatura i humitat elevades. Ara bé, aquestes condicions afavoreixen l'aparició de processos infecciosos i parasitaris que poden comprometre tan la qualitat com la salubritat del producte. Per tal d'evitar les pèrdues econòmiques que a una explotació ramadera li pot suposar la irrupció d'un procés d'aquest tipus, es requereix la utilització de fàrmacs amb finalitats profilàctiques i/o terapèutiques. De fet, els fàrmacs veterinaris comercials s'han distribuït i aplicat amb garanties de seguretat en la producció animal des de fa més de 50 anys (Jones i cols., 2003; Castanon, 2007) atès que el seu ús reporta importants beneficis com són la capacitat de millorar la salut dels animals a més d'una disminució dels costos de producció ja que es redueix l'impacte de les malalties que podrien disminuir la taxa de creixement (Visek i cols., 1978). Tanmateix, cal esmentar que certs productes veterinaris, alguns d'ells amb efecte hormonal, han estat administrats de manera fraudulenta a animals destinats al consum humà amb la finalitat de promoure de forma accelerada el creixement de l'animal, reduir l'estrès i evitar la mort durant el transport dels animals a l'escorxador i/o millorar la qualitat del producte final (Courtheyn i cols., 2002).

De forma general i amb l'excepció de l'ús il·legal fins ara esmentat, es pot dir que avui dia tot tractament consisteix bàsicament en l'administració d'un medicament a un animal en una dosi concreta i durant un temps determinat amb la finalitat de restablir la seva salut o prevenir malalties. En medicina animal, com passa en medicina humana, existeix un nombre molt elevat de fàrmacs, la classificació dels quals es pot realitzar en funció de diversos criteris. Una de les formes més habituals i senzilles de classificar els fàrmacs es basa en la patologia o malaltia a tractar/prevenir. A la taula 1.1 es recullen les principals categories o grups terapèutics més comunament emprats en veterinària. En primer lloc cal esmentar els antibiòtics o agents antimicrobians, compostos d'origen natural o sintètic emprats contra les infeccions de tipus bacterià. Són els medicaments més emprats i per aquest motiu, són probablement els compostos estudiats més sovint tan des del punt de vista terapèutic com el de la posterior presència de residus ja sigui en productes destinats al consum o bé en el medi ambient.

Taula 1.1. Classificació dels medicaments veterinaris en funció del seu ús

Tipus de medicament	Usos
Antibiòtics o antimicrobians	Infeccions bacterianes
Antiinflamatoris/antipirètics/analgèsics	Processos inflamatoris, febre, dolor
Antiparasitaris	Prevenció o tractament de parasitosis externes i internes
Hormones	Control de la reproducció
Vacunes	Profilaxis de malalties infecto-contagioses

Els fàrmacs antiinflamatoris (esteroïdals o no esteroïdals), analgèsics i antipirètics restableixen els trastorns de la circulació de la sang que amb freqüència van acompanyats d'un augment de la temperatura, envermelliment, inflor, dolor i febre. Els antiparasitaris són emprats en la prevenció i tractament de les parasitosis tan externes com internes mentre que les hormones i vacunes responen a usos més restringits com poden ser aspectes relacionats amb la reproducció dels animals, com per exemple la sincronització de zels, i la prevenció de malalties infeccioses respectivament.

L'estudi dut a terme en aquesta tesi s'ha centrat en els medicaments antiparasitaris atès que es tracta d'un dels grups de fàrmacs més emprats en medicina veterinària del sector de la producció ramadera. S'utilitzen amb finalitats terapèutiques, però si se n'ha de destacar un ús, aquest és el profilàctic ja que s'administren de forma rutinària als animals de producció per tal de prevenir les malalties causades per paràsits les quals són molt comunes entre el bestiar. A més, cal tenir en compte que alguns d'aquests fàrmacs han estat utilitzats també en el passat com a promotors del creixement, ús que en els nostres dies ha quedat prohibit, per tant s'ha de garantir que aquest ús fraudulent ja no es produeix.

1.1 Els fàrmacs antiparasitaris

Les malalties parasitàries són aquelles en què s'estableix una relació biològica entre un organisme paràsit que viu i prolifera gràcies a un altre denominat hoste i tenen una gran incidència a nivell global i en especial, en els països de climes temperats i càlids. Són de ràpida propagació i difícil control i per aquest motiu, poden produir pèrdues econòmiques molt significatives en la indústria ramadera (McKellar i cols., 2004). Les malalties més importants o amb pitjor pronòstic són les què afecten al tracte gastrointestinal de l'animal ja que sovint acaben causant-li la mort. És per tant més freqüent emprar els fàrmacs antiparasitaris com a tractament preventiu que no pas com a tractament terapèutic.

Entre les malalties parasitàries més habituals cal esmentar la coccidiosi i les malalties parasitàries provocades per helmints és a dir l'helmintiasi.

La coccidiosi és una malaltia intestinal provocada per protozous del gènere *Eimeria* o *Isospora*. Pot afectar tots els animals de producció i es transmet per contacte directe amb la femta o per ingestió de teixits infectats (Matabudul i cols., 2001). El principal símptoma és la diarrea i pot arribar a provocar fortes hemorràgies i fins i tot la mort. Els fàrmacs emprats en la prevenció i tractament d'aquesta malaltia són els coneguts com a coccidiostats i se'n diferencien dos famílies en funció del seu origen natural o sintètic;

- els polièters ionòfors i
- els coccidiostats químics.

Els primers són compostos d'origen natural produïts per diverses espècies de *Streptomyces* sp. Atès que s'obtenen de forma natural, sovint se'ls anomena antibiòtics, tot i que no són agents antibacterians. A la figura 1.1 es mostren les estructures moleculars dels coccidiostats estudiats a la present tesi.

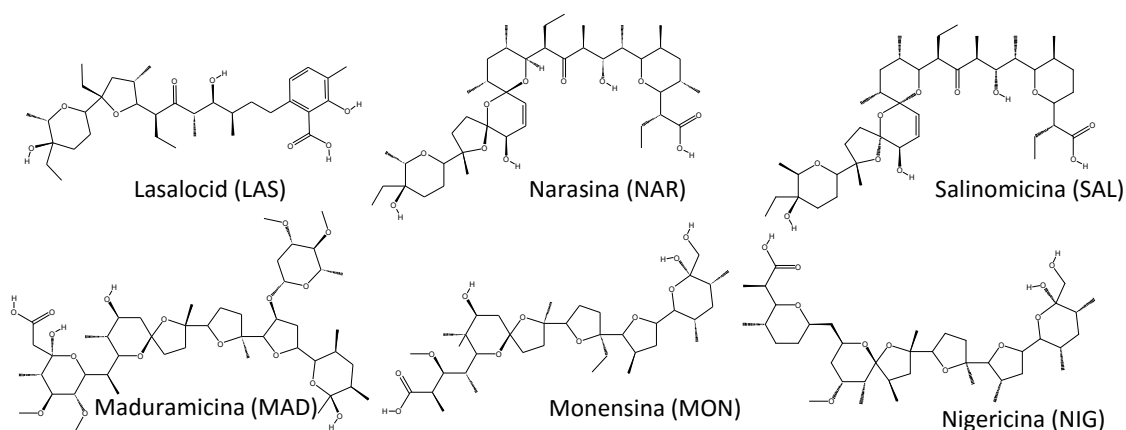


Figura 1.1. Coccidiostats polièters ionòfors

Químicament els polièters ionòfors són compostos formats per un esquelet d'èters cíclics que contenen un àcid carboxílic en un dels extrems de la molècula i un grup hidroxil a l'extrem oposat. Aquesta estructura molecular permet formar un pseudomacrocycle (Figura 1.2) mitjançant l'establiment de ponts d'hidrogen entre el grup carboxílic desprotonat i el grup hidroxil terminal de la molècula. Els àtoms d'oxigen dels grups èter queden així encarats cap al centre del macrocicle de manera que l'interior de la molècula, de caràcter polar, permet complexar ions monovalents (Na^+ i K^+) i divalents (Ca^{2+} i Mg^{2+}) (depenent del compost) a l'interior de l'estructura mentre que la part exterior és essencialment hidrofòbica.

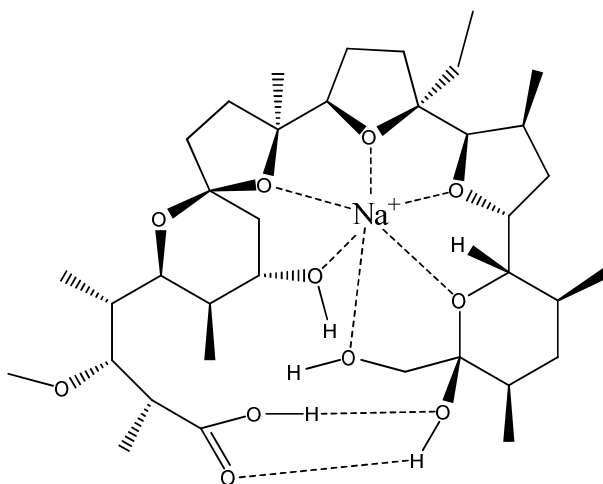


Figura 1.2. Estructura pseudo-macroclíca dels polièters ionòfors

El mecanisme d'acció d'aquests fàrmacs es basa principalment en aquesta característica, ja que proporciona la capacitat de travessar la membrana cel·lular i així alterar l'equilibri iònic de la cèl·lula porozoaria causant-li com a conseqüència la mort (Matabudul i cols., 2002).

Pel que fa referència als coccidiostats químics, aquests agrupen una família molt diversa de compostos tots ells obtinguts per síntesi química, el mecanisme d'acció dels quals no es coneix amb detall. A la figura 1.3 es mostren les estructures dels coccidiostats químics estudiats en la present tesi.

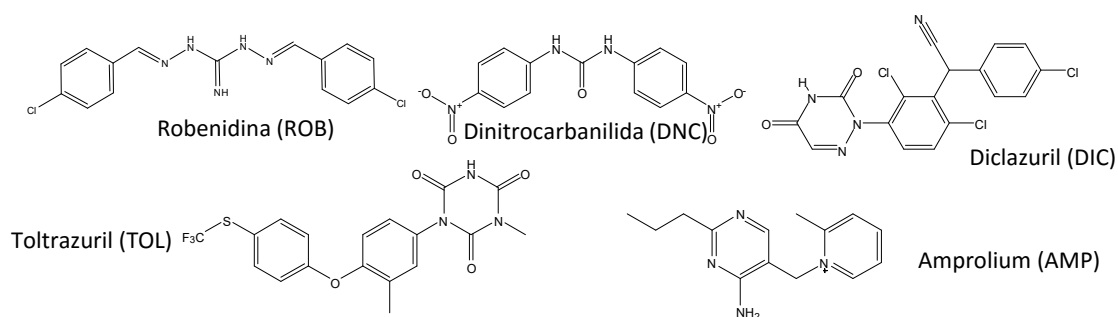


Figura 1.3. Coccidiostats químics estudiats

La nicarbazina és el nom genèric que rep el complex equimolar de 4,4'-dinitrocarbanilida i 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina. Atès que el residu de dinitrocarbanilida és molt més persistent que el de hidroxidimetilpirimidina, la molècula que acostuma a ser emprada com a marcador del fàrmac nicarbazina és la dinitrocarbanilida. El diclazuril és un anticoccidial d'ampli espectre del grup dels benzo-acetonitrils, la robenidina pertany al grup de les guanidines, el toltrazuril és un derivat triazinònic, i l'amprolium és un anàleg de la tiamina.

Les helmintiasis, l'altre tipus de malalties parasitàries habituals, són provocades per helmints de diversos tipus (nematodes i trematodes principalment). Són malalties parasitàries en les quals una part del cos de l'hoste està infestada de cucs intestinals. Si els paràsits afecten els òrgans interns on troben els nutrients necessaris per sobreviure i reproduir-se s'anomenen endoparàsits en contraposició amb aquells que parasiten l'exterior del cos (ectoparàsits). Per tant, poden afectar els òrgans interns o simplement

competir pels nutrients a la sang o a l'intestí de l'hoste debilitant l'animal malalt. Els fàrmacs emprats per al control d'aquestes malalties són els coneguts com a antihelmíntics i concretament pel tractament de les endoparasitosis en destaquen quatre famílies de compostos:

- Salicilanilides
- Derivats de les piperazines
- Avermectines i
- Benzimidazoles i derivats

Els dos primers grups estan formats per un petit nombre de compostos. Les avermectines en canvi, en contenen un major nombre de principis actius i són macromolècules emprades tan en el tractament de les endo com de les ectoparasitosis.

Finalment, les benzimidazoles, grup de compostos estudiats també en aquesta tesi, són compostos formats per un anell benzimidazol funcionalitzat. El seu mecanisme d'acció es basa en l'acoblament a la tubulina, una proteïna estructural dels microtúbuls cel·lulars, responsables de la secreció d'enzims digestius, fent que aquests no puguin actuar i provocant que per tant, s'alteri el procés digestiu desencadenat la mort del paràsit per manca de nutrients (Lacey, 1990). En el transcurs de la seva acció, aquestes molècules pateixen transformacions metabòliques donant lloc a nombrosos compostos derivats que poden ser excretats juntament amb els compostos parentals no metabolitzats ja sigui per via urinària, fecal o a través de la llet en el cas dels ruminants (Gottschall i cols., 1990). La figura 1.4 mostra les benzimidazoles estudiades en la present tesi així com alguns del metabòlits més importants d'algunes d'elles.

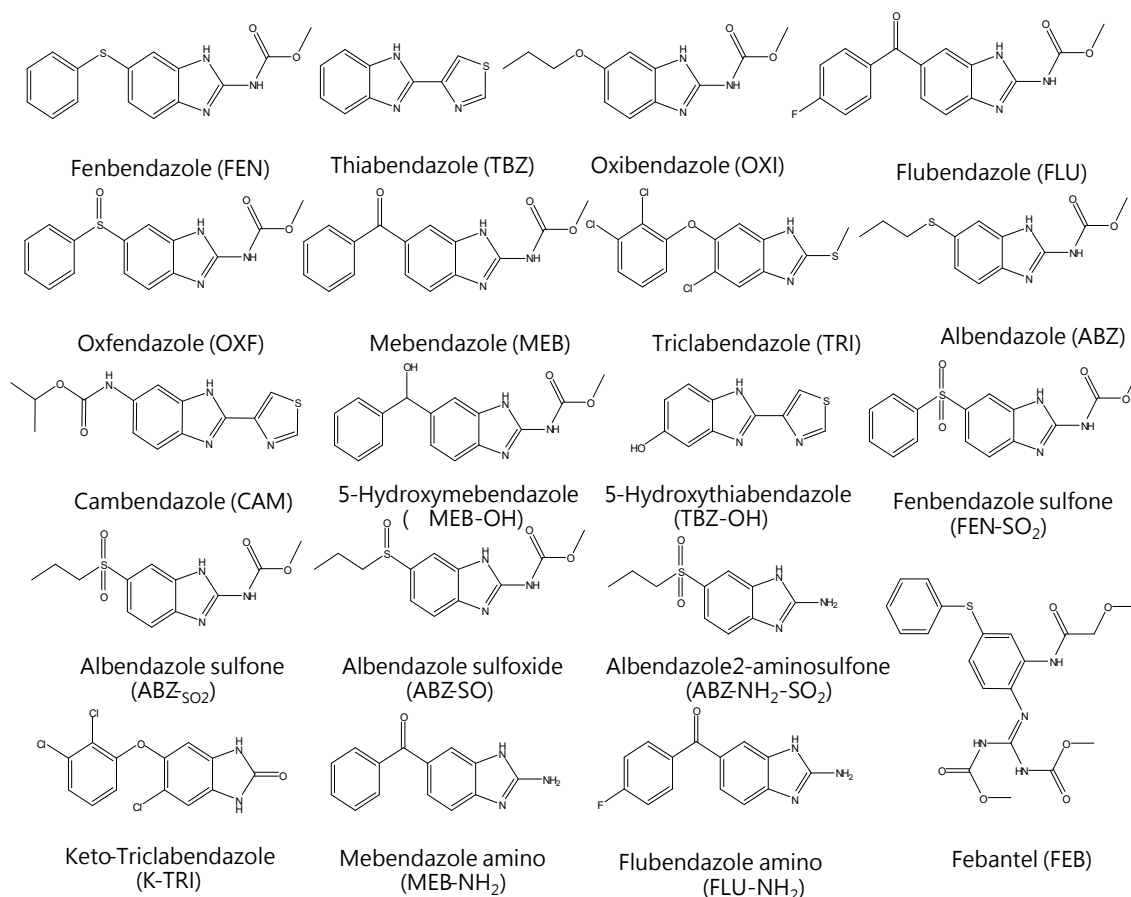


Figura 1.4. Benzimidazoles i alguns dels seus metabolits estudiats en la present tesi

Adicionalment, cal destacar l'ús que se'n fa d'alguns d'aquests compostos en agricultura per al control de nematodes paràsits de diversos cultius així com per al control de l'aparició de fongs en fruits recollits.

1.2 Consum de medicaments antiparasitaris

És difícil trobar informació detallada sobre l'ús global de les diferents substàncies medicamentoses antiparasitàries administrades als animals de producció ja sigui amb finalitats autoritzades mitjançant recepta veterinària per a tractament terapèutic o profilàctic o bé amb intencions fraudulentament (promotor del creixement). Probablement això es conseqüència de la gran dispersió del sistema de distribució dels medicaments veterinaris i a l'existència d'un mercat negre relacionat amb l'ús fraudulent. Malgrat això, Veterindustria, l'associació empresarial espanyola de la indústria de sanitat i

nutrició animal, proporciona dades globals sobre el volum de negoci dels productes farmacològics veterinaris a l'estat espanyol. Així, l'any 2014 el sector farmacològic veterinari va moure 339,78 milions d'euros (un 42,69% del total de la indústria farmacoveterinària). Per la seva banda el sector d'additius i premescles, sector que consumeix la major part dels coccidiostats, en va moure un total de 145,65 milions d'euros, que representa un 18,3% del total del sector. Aquestes dades però, si bé donen una idea del volum de negoci, no detallen les tones de fàrmacs consumides. Les dades a nivell europeu del 2007-2008 apunten que dels 40,7 milions de tones de pinso destinats a engreixar pollastres, galls d'indi i conills, prop de 18,7 milions es van preparar addicionant-hi coccidiostats. Encara que la majoria de països no proporcionen dades referents al consum anual d'aquests productes, en els últims anys han aparegut estudis que estimen el volum de fàrmacs consumits amb el propòsit d'avaluar l'exposició indirecta dels éssers humans a aquests productes (Kools i cols., 2008). La taula 1.2 recull les dades referents al consum de medicaments antiparasitaris en alguns països de la Unió Europea així com el volum de producció ramadera. Tot i així, es creu que les estimacions proporcionen xifres inferiors a les reals, atès que fins a l'any 2005 els antiparasitaris encara no estaven subjectes a recepta veterinària a molts dels països de la Unió Europea. Malauradament a la literatura no existeixen dades actualitzades que puguin corroborar aquestes suposicions.

Taula 1.2. Dades sobre el consum de fàrmacs antiparasitaris durant l'any 2004 i la producció ramadera (Kools i cols., 2008). (* Xifres estimades)

País	Producció (x1000 T)	Consum	Ratio
		d'antiparasitaris (T)	Consum/Producció
Dinamarca	2149	0,24	$1,12 \cdot 10^{-7}$
Finlàndia	377	1,8	$4,77 \cdot 10^{-6}$
França	5869	28,5	$4,86 \cdot 10^{-6}$
Alemanya	6612	43,3	$6,55 \cdot 10^{-6}$
Suècia	536	3,86	$7,20 \cdot 10^{-6}$
Holanda	2321	11,3	$4,87 \cdot 10^{-6}$
Regne Unit	3329	10,84	$3,26 \cdot 10^{-6}$
Espanya*	5308	26	$4,90 \cdot 10^{-6}$

1.3 Implicacions dels fàrmacs antiparasitaris en la salut pública. Toxicitat.

L'ús massiu i el probable abús de fàrmacs antiparasitaris en animals destinats al consum humà planteja certs dubtes tant pel què fa a la pròpia salut dels animals com respecte a la salut humana. És lícit pensar que una sobreexposició dels animals a un determinat fàrmac pot desembocar en la ineficàcia del medicament en qüestió. Concretament s'han reportat casos de resistència a les benzimidazoles (Lacey i cols., 1994), antihelmíntics d'ús molt estès, en ruminants. Per tal d'evitar aquesta resistència, s'acostumen a administrar els medicaments emprant els anomenats cicles farmacològics (Stamatakis i cols., 2009) en els quals es van alternant diferents tipus de medicaments que permeten atacar els paràsits i al mateix temps evitar que aquests esdevinguin resistents (Felipe i cols., 2006). Tanmateix, si els fàrmacs administrats no són eliminats de l'organisme abans que l'animal sigui sacrificat, es possible que es trobin residus medicamentosos en els productes destinats al consum humà (carn, ous, llet) (Reig i cols., 2008; Girardi i cols., 2008). Els efectes directes de la presència de fàrmacs en els productes de consum poden ser entre d'altres, reaccions adverses de tipus al·lèrgic en individus hipersensibles, efectes sinèrgics en persones que reben per prescripció mèdica tractaments farmacològics (Philips i cols., 2003) i potser el més conegut, la resistència bacteriana als agents antimicrobians que pot comportar a mitjà termini la ineficàcia dels antimicrobians emprats en l'actualitat (Marshall i cols., 2011).

Com a mesura preventiva per tal de minimitzar la presència de residus en els productes d'origen animal, s'han establert períodes d'espera. Es tracta dels períodes de temps que requereix cada espècie animal per eliminar el fàrmac del seu organisme des del moment en què se li ha administrat la última dosi. Per tant, tots els animals abans del sacrifici, han de estar un període de temps sense rebre cap medicació a l'espera justament de l'eliminació de la mateixa. Tot i així, aquests períodes de d'espera no garanteixen l'eliminació completa del principi actiu, sinó que únicament asseguren que la presència del compost en els diferents teixits animals es mantingui per sota d'unes concentracions lliars de seguretat. Aquestes concentracions es coneixen com a MRLs (acrònim anglès de nivell de residu màxim) i són establerts per les autoritats competents de cada país a excepció dels països integrants de la Unió Europea on és justament aquest organisme

qui estableix els nivells objectiu per a tots els països membres. D'aquest tema se'n parlarà de forma més extensa a l'apartat 1.4 que fa referència a la legislació vigent sobre productes veterinaris antiparasitaris.

S'assumeix per tant, que els productes d'origen animal poden contenir en major o menor mesura, residus de fàrmacs veterinaris en general i antiparasitaris en particular. La problemàtica rau doncs en els efectes que aquestes baixes concentracions de principi actiu poden produir en els éssers humans.

En relació als estudis toxicològics existents sobre els coccidiostats i les benzimidazoles en humans, s'ha de diferenciar entre les diferents famílies químiques que els componen atès que químicament són compostos molt diferents. Com ja s'ha comentat amb anterioritat, d'entre els coccidiostats, els polièters ionòfors són productes naturals lipofílics amb un mecanisme d'acció quelant que afecta al transport cel·lular d'ions a través de les membranes i per tant, poden afectar també al transport cel·lular en organismes sans. Els efectes tòxics dels coccidiostats químics, atès que són un grup molt heterogeni de productes químics sintètics poden ser molt diversos. Entre els seus efectes en humans, es parla de desordres neurotòxics, toxicitat maternal i fetotoxicitat, descens de les proteïnes sèriques i degeneració focal dels músculs esquelètics (Dorne i cols., 2013). Pel que fa a les benzimidazoles, s'ha de tenir en compte que algunes d'elles també són utilitzades com a medicament d'ús humà i per tant, les consideracions en relació a la seva toxicitat són les que consten en els prospectes dels medicaments humans. Així, s'ha de destacar que en general les benzimidazoles són teratogèniques i embriotòxiques i per tant, les embarassades n'han d'evitar l'ús tant directe com indirecte (Teruel i cols., 2003; Teruel i cols., 2009).

Fins ara s'ha parlat de l'exposició a residus antiparasitaris a través de la ingesta de productes d'origen animal, però en els últims anys també s'ha començat a estudiar la contribució que hi poden tenir aliments d'origen vegetal o fins i tot l'aigua (Sarmah i cols., 2006). Els animals que reben tractament farmacològic eliminen els principis actius per excreció ja sigui la forma química inalterada del principi actiu o bé els seus metabòlits. Si els excrements són utilitzats per a la fabricació d'adobs, aquests poden anar a parar a camps de conreu on encara no està clar si els productes que s'hi conreen podran absorbir part d'aquests compostos. El cas de l'aigua és similar, ja que a part de

la presència dels compostos en les aigües residuals, si les pluges són capaces de lixiviar aquests compostos dels sòls, els fàrmacs poden arribar tan a les aigües superficials com a les subterrànies. A més, és sabut que les plantes de tractament d'aigües residuals no són capaces d'eliminar totalment aquests compostos (Castiglioni i cols., 2006) que són abocats a les aigües superficials que amb freqüència s'empren com a aigua d'entrada a les plantes potabilitzadores la qual cosa podria arribar a comportar un consum humà involuntari. En qualsevol cas, esdevenen evidentment una problemàtica ambiental a tenir en compte i és per això que alguns autors estan intentant determinar també l'impacte ecològic d'aquestes substàncies (Boxall i cols., 2003; Boxall i cols., 2003; Capleton i cols., 2006; Kim i cols., 2008).

1.4 Legislació

1.4.1. Medicina veterinària i seguretat alimentària

En termes generals, el món farmacèutic està fortament regulat. La legislació que estableix el curs que un medicament ha de transitar des que un laboratori en fa la seva producció i/o desenvolupament fins que aquest arriba al consumidor, és força exigent a la majoria de països i no fa gaires distincions entre medicaments destinats al consum humà i veterinari. De fet, les agències i/o ministeris tan nacionals com internacionals que vetllen per la salut i seguretat dels consumidors (European medicines agency (EMA), Agencia española del medicamento y productos sanitarios (AEMPS), Ministeri de sanitat, etc.) van adreçades tan a la població en general com a veterinaris/cuidadors.

En el cas de la salut animal, especialment la d'aquells animals destinats al consum humà, els afers reguladors s'estenen encara més si cap. A nivell estatal la llei que regula els medicaments veterinaris és el reial decret 109/1995. Aquest reial decret regula la fabricació, elaboració, control de qualitat, circulació, distribució, comercialització, informació i publicitat, importació, exportació, emmagatzematge, prescripció, dispensació, avaluació, autorització i registre dels medicaments d'ús veterinari i de les substàncies, excipients i materials utilitzats per a la seva fabricació, preparació i envasat. Aquesta normativa defineix també els temps d'espera, temps que necessàriament ha de

transcórrer entre la última aplicació del medicament i l'aprofitament dels aliments obtinguts de l'animal tractat (carn, ous, llet,...). D'aquesta manera s'aconsegueix que els residus de medicaments es trobin en una concentració inferior al límit màxim legalment admès (MRL) per a cada medicament i aliment.

La Regulació CE 2377/90 ja establia un procediment comunitari per a fixar els MRLs. Segons aquest reglament, i per aquesta finalitat, els medicaments d'ús veterinari es divideixen en quatre grups (Annexes I al IV).

- Annex I: El constitueixen substàncies aprovades com a medicaments d'ús veterinari per a les quals es pot establir un MRL.
- Annex II: Constituït en la seva majoria compostos inorgànics i d'altres d'orgànics per als quals no es considera necessari establir un MRL per ser considerades substàncies segures.
- Annex III: Substàncies farmacològicament actives amb MRLs provisionals atès que es creu necessari realitzar estudis addicionals per a determinar la seva seguretat.
- Annex IV: El constitueixen substàncies prohibides com hormones promotores del creixement, nitrofurans i cloramfenicol, substàncies per a les quals no es pot fixar un MRL i per tant hi ha tolerància zero.

Aquesta regulació va ser substituïda pel Reglament 470/2009 que defineix un nou procediment per a l'establiment dels MRLs i pel 37/2010 que classifica les diferents substàncies en dues taules. La Taula 1 la constitueixen aquells compostos que al Reglament 2377/1990 es trobaven als annexes I, II i III, mentre que aquells compostos que a l'antic reglament es trobaven a l'annex IV, ara passen a formar directament la Taula 2.

A la taula 1.3 es mostren els nivells màxims de residu per als coccidiostats i benzimidazoles, el residu marcador així com l'espècie animal i teixit diana en què aquest ha de ser determinat.

Taula 1.3. MRLs establerts per als coccidiostats i benzimidazoles inclosos en aquest estudi (Reglament 37/2010 segons Taula 1)

Substància farmacològicament activa	Residu Marcador	Espècie animal	MRLs µg/kg	Teixit diana
Ionòfors				
Monensina	Monensina A	Boví	2 10 30 2 2	Múscul Greix Fetge Ronyó Llet
Lasalocid	Lasalocid A	Aviram	20 100 100 50 150	Múscul Greix Fetge Ronyó Ous
Benzimidazoles				
Albendazole	Suma d'albendazole, albendazole sulfòxid, albendazole sulfona i albendazole 2-aminosulfona	Tots els ruminants	100 100 1000 500 100	Múscul Greix Fetge Ronyó Llet
Fenbendazole	Suma de residus extractables que poden ser oxidats a oxfendazole sulfona	Tots els ruminants	50 50 500 50 10	Múscul Greix Fetge Ronyó Llet
Flubendazole	Flubendazole	Aviram	400	Ous
Mebendazole	Suma de mebendazole i metabòlits	Oví, caprí i equí	60 60 400 60	Múscul Greix Fetge Ronyó
Oxfendazole	Suma de residus extractables que poden ser oxidats a oxfendazole sulfona	Tots els ruminants	50 50 500 50 10	Múscul Greix Fetge Ronyó Llet
Oxibendazole	Oxibendazole	Porcí	100 500 200 100	Múscul Pell i greix Fetge Ronyó
Tiabendazole	Suma de tiabendazole i 5-hidroxitiabendazole	Caprí	100 100 100 100 100	Múscul Greix Fetge Ronyó Llet
Triclabendazole	Suma de residus extractables que poden ser oxidats a ceto-triclabendazole	Tots els ruminants	225 100 250 150	Múscul Greix Fetge Ronyó

A més, la Directiva 96/23/EEC obliga als estats membres a definir els seus programes de control de residus farmacològics en productes d'origen animal com a mesura de

seguretat alimentària per als consumidors. Aquesta directiva defineix el mostreig a realitzar en cada cas, ja sigui per a un producte càrnic (teixits) o un derivat (llet, mel, etc.) així com les sancions a aplicar en cas d'incompliment de la mateixa.

Estretament lligada a aquesta Directiva, la Decisió de la Comissió 657/2002/EC estableix els paràmetres de qualitat mínims que han de complir els mètodes d'anàlisi emprats en la determinació de residus farmacèutics en productes d'origen animal destinats al consum humà. Per a aquells mètodes d'anàlisi emprats en la determinació de compostos prohibits (Taula 2 del Reglament 37/2010) cal destacar el paràmetre anomenat nivell de funcionament mínim a exigir (*minimum required performance limit*, MRPL) definit com a la mínima quantitat d'anàlit que pot ser detectada i confirmada pel mètode analític en ús.

Els fàrmacs veterinaris estudiats en aquesta tesi, les benzimidazoles i els coccidiostats es troben inclosos a la taula 1 del Reglament 37/2010 i per tant, en els seus mètodes d'anàlisi cal aplicar els requeriments que fan referència a la confirmació (3 punts d'identificació) i quantificació (precisió i exactitud d'acord amb la fracció de massa de l'anàlit a la mostra) dels mateixos.

1.4.2. Additius per a pinsos

Entre els medicaments veterinaris els coccidiostats es poden considerar un cas particular. Aquests compostos són administrats de manera rutinària mitjançant els pinsos, sobretot en la producció avícola, i per aquest motiu, també són considerats additius per a pinsos, la qual cosa comporta que se'ls apliqui complementàriament la legislació corresponent als additius per a pinsos.

Un additiu per a pinso és un ingredient o combinació d'ingredients que s'afegeix a la mescla base de l'aliment o a part d'aquest per satisfer una necessitat específica. Normalment s'afegeix en microquantitats i el producte final requereix d'un mesclat i manipulació molt curosos (AAFCO, 2000). El Reglament Europeu 1831/2003/EC sobre els additius en l'alimentació animal estableix les directrius sobre l'autorització, ús i comercialització dels additius per a pinsos. D'altra banda, i en funció del seu efecte sobre

el pinso o animal consumidor del pinso, l'annex 1 de l'esmentat Reglament classifica aquests productes en cinc subgrups anomenats:

- Tecnològics, qualsevol substància afegida als pinsos amb finalitats tecnològiques;
- Organolèptics, qualsevol substància que afegida als pinsos, millora o modifica les propietats organolèptiques d'aquests o les característiques visuals dels aliments d'origen animal;
- Nutricionals;
- Zootècnics, qualsevol additiu utilitzat per influir positivament en la productivitat dels animals sans o en el medi ambient;
- Coccidiostats i histomonòstats

En relació als coccidiostats autoritzats com a additius per a pinsos, la Directiva del Consell 70/524/EEC de l'any 2004 ja en contemplava els 11 actuals, 6 ionòfors (monensina, salinomicina, lasalocid, maduramicina, narasina i semduramicina) i 5 químics (robenidina, decoquinat, halofuginona, nicarbazina i diclazuril) les autoritzacions dels quals, a dia d'avui, s'han anat renovant a mesura que els períodes de validesa establerts inicialment han anat exhaurint-se.

Al marge de la legislació esmentada fins ara, els productors de pinsos estan subjectes a legislació específica sobre higiene dels pinsos, la seva fabricació així com respecte a la importació (Reglament Europeu 183/2005/CE). Aquest reglament estableix les bones pràctiques de fabricació de pinsos, però tot i així, contempla la realitat d'aquesta indústria, en la qual en les mateixes instal·lacions on s'hi fabriquen els pinsos no medicamentosos normalment també s'hi fabriquen els pinsos medicamentosos. Això comporta que, malgrat la neteja de les línies després de la fabricació de pinsos medicamentosos, els pinsos no medicamentosos puguin contenir traces de coccidiostats degut a la transferència de partícules de pinso residuals que poden quedar adherides a les conduccions, el què s'anomena contaminació creuada. Per aquest motiu, la Unió Europea reconeix aquesta contaminació creuada com a fet inevitable mitjançant la Directiva 2009/8/CE la qual estableix els nivells màxims de residus de coccidiostats en pinsos no medicamentosos deguda a contaminació creuada inevitable (taula 1.4).

Taula 1.4. Concentració màxima permesa de coccidiostats en pinsos no medicamentosos deguda a contaminació creuada segons Directiva 2009/8/CE (Valors més restrictius, per a espècies sensibles)

Compost	Concentració màxima permesa en pinso (mg/kg)
Lasalocid	1,25
Narasina	0,7
Salinomicina	0,7
Monensina	1,25
Semduramicina	0,25
Maduramicina	0,05
Robenidina	0,7
Decoquinat	0,4
Halofuginona	0,03
Nicarbazina	0,5
Diclazuril	0,01

Per tant, s'assumeix que hi haurà animals que podran ser alimentats amb pinsos contaminats amb coccidiostats quan ja no haurien d'estar rebent tractament profilàctic, és a dir, durant el període d'espera. Això comporta que productes càrnics o d'origen animal (ous o llet) podrien contenir baixos nivells d'aquests compostos. És per aquest motiu que el Reglament 124/2009 i la seva posterior modificació segons el Reglament 610/2012 estableixen uns nous MRLs específics per a coccidiostats en productes destinats al consum humà derivats de l'alimentació d'animals amb pinsos que hagin patit contaminació creuada (Taula 1.5).

Taula 1.5. MRLs establerts per a coccidiostats en productes destinats al consum humà derivats de l'alimentació amb pinsos que hagin patit contaminació creuada (Reglament 124/2009)

Substància	Producte alimentari	MRL (µg/kg)
Lasalocid	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents a les aus de corral i els bovins:	
	- Llet	1
	- Fetge	50
	- Ronyons	20
Narasina	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix:	
	- Ous	2
	- Llet	1
	- Fetge	50
Salinomicina	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix i els conills d'engreix:	
	- Ous	3
	- Fetge	5
	- Altres aliments	2
Monensina	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix, gall d'indis i els bovins (incloses les vaques lleteres):	
	- Fetge	8
Semduramicina	- Altres aliments	2
	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix i els gall d'indis:	
Maduramicina	- Ous	12
	- Altres aliments	2
Robenidina	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix, els gall d'indis i els conills d'engreix i de reproducció:	
	- Ous,	25
	- Fetge, ronyó, pell i greix	50
	- Altres aliments	5
Halofuginona	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix, gall d'indis i els bovins amb excepció de les vaques lleteres:	
	- Ous	6
	- Fetge i ronyons	30
	- Llet	1
	- Altres aliments	3

Taula 1.5. MRLs establerts per a coccidiostats en productes destinats al consum humà derivats de l'alimentació amb pinsos que hagin patit contaminació creuada (Reglament 124/2009) (Continuació)

Substància	Producte alimentari	MRL (µg/kg)
Nicarbazina (residu 4,4'-dinitrocarbanilida)	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix:	
	- Ous	300
	- Llet	5
	- Fetge	300
	- Ronyons	100
	- Altres aliments	50
Diclazuril	Aliments d'origen animal procedents d'animals d'espècies diferents als pollastres d'engreix, gall d'indis d'engreix, pintades, conills d'engreix i reproducció, ruminants i porcí:	
	- Ous	2
	- Fetge i ronyons	40
	- Altres aliments	5

1.5 Metodologia analítica

La metodologia analítica emprada en l'anàlisi de fàrmacs antiparasitaris ha estat, ja des de les primeres propostes, basada preferentment en la cromatografia de líquids i aquesta és encara avui, la tècnica més comuna. Ara bé, els avenços tant en les metodologies de tractament de mostra com en la pròpia cromatografia i en els sistemes de detecció han permès disposar de mètodes d'anàlisi cada cop més ràpids, fiables i sensibles.

Tot i així, i amb excepció d'alguns mètodes multiresidu, l'objectiu dels quals es la determinació d'un nombre elevat de compostos de característiques diferents (més de 50), els mètodes proposats a la literatura per a l'anàlisi de medicaments antiparasitaris estan majoritàriament dirigits a famílies específiques. A continuació es comenten les publicacions més recents sobre els mètodes proposats per a l'anàlisi dels compostos estudiats en aquesta tesi, coccidiostats i benzimidazoles, en mostres de tipus alimentari i mediambiental (aigües, fangs i sòls).

1.5.1 Metodologia analítica per a la determinació coccidiostats

Com ja s'ha comentat, els coccidiostats són una família de compostos amb una estructura química molt variada entre els quals es poden trobar compostos molt polars, com per exemple l'ampròlium (amina quaternària), fins a compostos amb un clar caràcter lipofílic, com els polièters ionòfors. Aquest fet fa que sigui difícil analitzar-los tots emprant un únic mètode. Per tant, a l'hora de desenvolupar un mètode d'anàlisi, cal tenir en compte tant els compostos a analitzar com la tècnica analítica a emprar i el tipus de mostra. La tècnica analítica a utilitzar determina principalment els límits de detecció que el mètode serà capaç d'assolir. D'altra banda, la mostra a analitzar requerirà d'un procés d'extracció i/o purificació més o menys exigent en funció de diversos factors com són, el tipus de matriu (contingut d'aigua i greix), la naturalesa química dels anàlits i la tècnica d'anàlisi a emprar posteriorment. La taula 1.6 recull els mètodes publicats a partir de l'any 2000, atès el baix impacte que els mètodes desenvolupats amb anterioritat tenen en els mètodes desenvolupats en l'actualitat per a la determinació de coccidiostats tot detallant el tractament de mostra emprat així com els valors de recuperació obtinguts, la tècnica analítica utilitzada i els límits de detecció assolits.

Extracció i purificació

El tractament de la mostra a analitzar consisteix bàsicament en l'extracció dels anàlits d'interès de la matriu i la posterior purificació de l'extracte. En l'anàlisi de coccidiostats en matrius alimentàries, un cop la mostra ha estat homogeneïtzada, el procediment més estès és l'extracció amb dissolvents orgànics. A la pràctica s'utilitzen diferents solvents en funció de la natura de la mostra (Taula 1.6). Així, per a l'anàlisi de pinsos, premescles medicamentoses i vegetals normalment s'utilitza metanol (MeOH) o mescles d'aquest solvent amb acetona, tetrahidrofurà (THF) i aigua. En canvi, per a l'extracció de teixits animals així com ous o llet, l'acetonitril (ACN) acostuma a ser el dissolvent preferit, atès que té la capacitat precipitar les proteïnes i per tant, d'eliminar la seva possible interferència. Alguns autors proposen utilitzar com a solvent alternatiu a l'acetonitril,

l'acetat d'etil (EtAc), un solvent amb major capacitat d'extracció, o bé diferents mesclades com per exemple una d'acetona i tetrahidrofurà per a l'extracció de toltrazuril i el seu metabòlit toltrazuril sulfona en mostres de múscul i ous (Hormazábal i cols., 2003). En els casos en què el solvent d'extracció és l'acetonitril, molts dels mètodes descrits a la literatura, afegeixen sulfat de sodi anhidre a la mostra abans de l'addició del solvent amb la finalitat d'absorbir la humitat de la matriu i prevenir que aquesta aigua passi a l'extracte i pugui dificultar o alentir la posterior evaporació.

En l'anàlisi de mostres de tipus alimentari, la posterior etapa de purificació i/o preconcentració, es fa necessària atesa la co-extracció de components de la matriu, i la majoria dels mètodes fan ús de la partició líquid-líquid o darrerament de l'extracció en fase sòlida. En el cas de l'anàlisi de mostres amb un elevat contingut en greix, l'hexà (Kanda i cols., 2003) o bé el diclormetà (Hormazábal i cols., 2003) s'empren per a desgreixar l'extracte. Alguns autors utilitzen permeació per gels (GPC) com a procediment addicional per eliminar interferències (Ai i col., 2011; Chico i cols. (Chico i cols., 2013) tot i que l'extracció en fase sòlida (SPE) emprant rebliments de sílice, C18 i en els últims anys els polimèrics de fase invertida OASIS HLB (Waters) són els que s'han emprat amb major freqüència.

Alternativament i com a mètodes més nous, tot i que amb menor freqüència d'aplicació, s'han proposat procediments de cromatografia d'immunoafinitat, dispersió en fase sòlida (*matrix solid phase dispersion*, MSPD) i extraccions amb fluids supercrítics.

Aquest esquema de tractament de mostra clàssic (extracció-purificació) és en general lent i pot ser més o menys difícil segons la matriu i les etapes necessàries, encara que acostuma a ser imprescindible en utilitzar determinats sistemes de detecció. Així, els sistemes de detecció poc selectius, com ara el detector ultraviolat (UV), requereixen d'extractes força nets per tal de minimitzar les interferències i així millorar els paràmetres de qualitat dels mètodes d'anàlisi. Per contra, si el mètode de detecció és selectiu com per exemple l'espectrometria de masses, el nivell d'exigència de la neteja dels extractes a injectar no és tan elevat i encara ho és menys si es treballa en espectrometria de masses en tàndem. Atès que aquest mode de treball és el més emprat actualment (Taula 1.6), en els darrers anys s'estan imposant tractaments de mostra més ràpids tot i que són menys efectius des del punt de vista de la puresa de l'extracte. En

aquesta línia, Matabudul i cols. (Matabudul i cols., 2002) van desenvolupar un tractament de mostra per a ous i fetge que posteriorment ha estat aplicat per molts altres autors. El procediment consisteix a barrejar les mostres amb Na_2SO_4 per eliminar aigua, i posteriorment extreure amb acetonitril i purificar emprant extracció en fase sòlida amb sílice. Les recuperacions es van situar entorn el 90% per als compostos estudiats en les dues matrius. Encara s'han proposat procediments més senzills, per exemple Mortier i cols. (Mortier i cols., 2003) descriuen la determinació de 5 coccidiostats en ous emprant un procediment que consisteix en una extracció amb acetonitril, evaporació del solvent a sequedat i posterior reconstitució en una mescla a parts iguals d'acetonitril i aigua amb filtració de l'extracte prèvia a la injecció. En aquesta mateixa línia Shao i cols., (Shao i cols., 2009) proposen l'extracció de 14 coccidiostats d'ous i carn amb acetonitril, concentració dels extractes i injecció en el cromatogràf de líquids i reporten recuperacions superiors al 78% per a tots els anàlits estudiats. Els últims anys diversos autors, proposen utilitzar el mètode conegut com a QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* és a dir, ràpid, fàcil, econòmic, efectiu, robust i segur). Aquest mètode primerament es va aplicar a l'anàlisi de pesticides en fruites però a poc a poc s'ha anat estenent a altres àrees com ara anàlisi de residus de medicaments en aliments. Es basa en l'extracció amb acetonitril i l'addició de sals per a induir una separació de fases entre el solvent orgànic i l'aquós, seguida d'una etapa d'extracció en fase sòlida dispersiva, mitjançant l'addició de sorbents (sílice, C18, carbó actiu, etc.) per a l'eliminació de part de la matriu i de sulfat de magnesi per a eliminar possibles traces d'aigua. Posteriorment, l'extracte acostuma a ser evaporat fins a un volum conegut o bé a sequedat, la qual cosa permet reconstituir l'extracte en un solvent compatible amb la cromatografia i aconseguir així una millora dels límits de quantificació. Seguint aquesta estratègia Clarke i cols., (Clarke i cols., 2013) van desenvolupar un mètode d'anàlisi per a coccidiostats en llet de vaca obtenint recuperacions superiors al 80% per a tots els compostos estudiats.

En el cas de l'anàlisi de mostres de caire ambiental, s'ha utilitzat l'extracció amb solvents o solucions tamponades per a l'anàlisi de fangs, sediments i sòls. Kim i cols. (Kim i cols., 2006) utilitzen una solució tampó d'hidròxid sòdic 1 M a pH 10,0 per a l'extracció de monensina, salinomicina i narasina de sediments de riu. El procediment que segueixen

requereix tan sols l'agitació de la mostra amb la solució d'extracció. Aquest mateix procediment el segueixen també Sun i cols. (Sun i cols., 2013) amb una solució d'extracció constituïda per una mescla de tampó de McIlvaine (EDTA, Na₂HPO₄, àcid cítric):metanol:hexà que permet extreure els compostos de sòls i gallinassa. Per la seva banda, Herrero i cols. (Herrero i cols., 2013) proposen un mètode d'extracció basat en l'extracció amb solvents pressuritzats emprant únicament acetona com a solvent d'extracció dels polièters ionòfors de fangs de depuradora. Per a l'anàlisi d'aigües, ja siguin superficials o d'entrada/sortida de plantes depuradores, s'utilitza extracció en fase sòlida (P. Herrero i cols. (2012); A. Iglesias i cols. (2012)). Aquesta es duu a terme fent passar un gran volum de mostra (250-1000 mL) per cartutxos reblerts amb sorbents polimèrics de fase invertida o bé mixtos bescanvi iònic/fase invertida. Aquests són capaços de retenir eficaçment els anàlits en estudi els quals són posteriorment eluïts amb petits volums de solvent, de manera que s'aconsegueix una concentració dels anàlits a l'extracte i a més una primera etapa de purificació de la mostra atesa la no retenció d'aquells components de la mostra que no són afins amb l'adsorbent escollit. L'any 2010 l'Agència Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) preocupada per l'ús de coccidiostats en les granges va proposar avaluar la probabilitat que aquests compostos arribessin a la cadena alimentària degut a l'absorció per part dels vegetals dels medicaments presents en els sòls i adobs. En resposta a aquesta proposta Broekaert et al. (Broekaert et al. 2011) van desenvolupar un mètode d'anàlisi de coccidiostats en vegetals i van comparar el mètode QuEChERS amb una extracció amb metanol seguida d'una purificació amb columnes de C18, conclouent que els millors resultats els proporcionava la segona metodologia ja que permetia assolir millors límits de quantificació.

Separació i detecció

La determinació de coccidiostats ja sigui en mostres ambientals o alimentàries es duu a terme generalment mitjançant cromatografia de líquids. Atesa la naturalesa apolar de la majoria de compostos de la família dels coccidiostats, especialment els polièters ionòfors, els rebliments de les columnes utilitzades acostumen a ser de base sílice amb fases estacionàries de C18, tal com es pot apreciar a la taula 1.6. Si bé hi ha autors que

han optat per fases estacionaries amb cadenes de menor longitud (C8) (Dubreil i cols., 2009) que ofereixen una menor retenció, o d'una certa polaritat com les fenil (Heller i cols., 2004; Li i cols., 2006), fenil-hexil (Olejnik i cols., 2009) o amida (Herrero i cols., 2012). Les longituds de columna són molt variables i en general, les columnes més llargues s'utilitzen en els mètodes proposats per a la determinació d'un nombre de compostos elevat. Pel què fa a la utilització de sistemes de cromatografia de líquids d'elevada eficàcia, a partir de l'any 2011 es comencen a trobar alguns treballs que utilitzen aproximacions similars a les proposades en aquesta tesi. Es a dir es comencen a emprar columnes de tecnologia UPLC amb diàmetres de partícula d'1,7 µm (Broekaert i cols., 2011; Clarke i cols., 2013) i columnes de tecnologia FusedCore (Herrero i cols., 2012; Herrero i cols., 2013).

En relació a les fases mòbils utilitzades, aquestes són majoritàriament mescles d'acetonitril:aigua, metanol:aigua, o barreges de metanol, acetonitril, tetrahidrofurà i aigua, sovint tamponades amb acetat o formiat amònic o acidificades amb un 0,1% d'àcid fòrmic ja sigui a la fase aquosa o en ambdues, aquosa i orgànica. Una excepció a aquests tipus de fases mòbils, són les emprades en els mètodes de determinació d'amprolium ja que en aquest cas, pràcticament tots els mètodes descrits a la bibliografia utilitzen fases mòbils que contenen formadors de parells iònics com l'heptanosulfonat de sodi (Furusawa i cols., 2002) o més freqüentment l'àcid heptafluorobutíric (Song i cols., 2007; Squadrone i cols., 2008), un àcid compatible amb l'espectrometria de masses tot i que contamina els equips si s'utilitza de forma prolongada. Normalment s'utilitza gradient d'elució especialment en els mètodes enfocats a l'anàlisi d'un nombre elevat de compostos mentre que els mètodes isocràtics s'acostumen a emprar si es pretén determinar un únic o pocs anàlits.

Pel què fa referència a la detecció, cal esmentar que abans de l'any 2000 pràcticament tots els mètodes d'anàlisi de coccidiostats empraven detecció UV tant per als coccidiostats químics com per als polièters ionòfors. Un exhaustiu recull d'aquest tipus de metodologies es pot trobar en l'article de revisió publicat l'any 2014 per Clarke i cols., on a més, s'inclouen els mètodes basats en tècniques d'immunoafinitat com l'ELISA. Encara a principis del nou mil·lenni, alguns autors es decantaven per aquest tipus de detecció o per la fluorescència (Tarbin i cols., 2002). Cal esmentar que en el cas de la

determinació de coccidiostats químics, la detecció UV directa no presenta cap inconvenient al marge de la poca selectivitat i dels límits de detecció que permet assolir, ara bé, per als polièters ionòfors, la detecció UV implica, per tal d'obtenir uns límits de detecció acceptables, una derivatització pre o post columna atesa la manca de grups cromòfors d'aquestes molècules. Un exemple és el mètode desenvolupat per Blazsek i cols. (2005) per a la detecció de salinomicina en premescles medicamentoses emprant derivatització post-columna amb vanil·lina i treballant a una longitud d'ona de detecció de 520 nm. Els polièters ionòfors reaccionen amb la vanil·lina produint complexos acolorits en un medi d'àcid sulfúric-metanol, aquesta és una reacció inespecífica que transcorre seguint un mecanisme de substitució electròfila aromàtica entre la vanil·lina i els àtoms d'oxigen dels polièters ionòfors resultant en la formació de compostos triarilmetà responsables del color. No obstant això, i com es pot observar a la taula 1.6, la gran majoria de mètodes descrits a la literatura utilitzen l'espectrometria de masses com a tècnica de detecció ja que és més selectiva i amb freqüència més sensible que qualsevol dels altres sistemes de detecció emprats habitualment en cromatografia de líquids.

Per tant, la tendència en la determinació de residus de coccidiostats en aliments es veu clarament abocada a la utilització de l'espectrometria de masses i preferentment en mode tàndem. Entre els avantatges més importants que presenta aquesta tècnica cal esmentar, com ja s'ha exposat anteriorment, la seva selectivitat que permet emprar mètodes de purificació de mostra menys exhaustius, l'elevada sensibilitat que sobre tot s'obté si es treballa en tàndem (en concret amb MRM (*múltiple reaction monitoring*) amb un triple quadrupol), a més de la possibilitat de confirmar la identitat dels compostos analitzats. L'espectrometria de masses només requereix que els compostos a analitzar siguin ionitzables. D'entre les tècniques d'ionització a pressió atmosfèrica emprades en l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses, la que més s'ha utilitzat per a l'anàlisi dels coccidiostats (Taula 1.6) ha estat l'electrospray (ESI en polaritat positiva per als polièters ionòfors i en polaritat tant positiva com negativa pels coccidiostats. Els polièters ionòfors generen ions intensos en ESI del tipus $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ i $[M+NH_4]^+$, que es fragmenten fàcilment en tàndem donant lloc a diversos ions producte la majoria d'ells fruit de múltiples pèrdues de

molècules d'aigua atès l'elevat nombre de grups hidroxil presents a la seva estructura. En canvi els coccidiostats químics tenen poca tendència a formar adductes amb Na^+ i NH_4^+ i per tant, els ions produïts són els $[\text{M}+\text{H}]^+$ en mode positiu i el $[\text{M}-\text{H}]^-$ en mode negatiu amb l'excepció de l'amprolium que en ésser una amina quaternària dóna lloc a l'ió $[\text{M}]^+$. En general, els coccidiostats es ionitzen fàcilment en ESI excepte el toltrazuril i els seus metabòlits que presenten certs inconvenients. Tan sols es ionitzen en mode negatiu i a més, els ions desprotonats generats són difícils de fragmentar. De fet, el toltrazuril només genera un ió producte, mentre que la toltrazuril sulfona i el toltrazuril sulfòxid no es fragmenten, la qual cosa dificulta la seva anàlisi ja que no es poden satisfer els criteris de confirmació de la UE que requereixen d'un nombre mínim de 3 punts d'identificació.

Pel que fa referència als analitzadors, la gran majoria dels mètodes publicats a la literatura utilitzen equips de triple quadrupol (QqQ) ja que en general, són capaços d'assolir límits de detecció/quantificació per sota dels $5 \mu\text{g}/\text{kg}$, i per tant permeten complir amb garanties els límits màxims (MRLs) establerts a la legislació per alguns dels coccidiostats. A més, aquests analitzadors proporcionen la informació necessària, per a la confirmació que la Decisió de la Comissió 657/2002/EC obliga per a residus en aliments. Aquests últims anys també s'han emprat instruments híbrids de més altes prestacions com els Q-Trap (Iglesias i cols., 2012, Nebot i cols. 2012) que proporcionen nivells de quantificació per sota del $\mu\text{g}/\text{kg}$. Tot i així en l'anàlisi de coccidiostats també s'han obtingut bons resultats amb instruments més senzills com per exemple, els de trampa iònica (Heller i cols., 2004, Cha i cols., 2005, Li i cols., 2006, Kim i cols., 2006, Squadrone i cols., 2008) que en poder treballar en MS^n permeten obtenir informació estructural dels compostos a analitzar tot i que els límits de quantificació obtinguts són una mica més elevats. Alguns autors utilitzen analitzadors de quadrupol simple (Q) que ofereixen prestacions més limitades pel fet de no poder proporcionar confirmació però amb sensibilitats força acceptables, de l'ordre dels baixos ppb. Per obtenir més d'un ió i així disposar dels punts d'identificació necessaris per confirmar la presència dels compostos alguns autors han emprat estratègies basades en l'aplicació d'elevats voltatges a la font d'ionització per tal de provocar la fragmentació de les molècules que hi arriben. Per exemple, Sun i cols. (2013) van desenvolupar un mètode per a l'anàlisi de

monensina, salinomicina i narasina en sòls, gallinassa i aigües de filtració. Aquests polièters ionòfors generen únicament un ió, la molècula sodiada ($[M+Na]^+$), però la monitorització en el quadrupol dels ions sense fragmentar i dels fragmentats generats a la font els va permetre aconseguir el seguiment de més d'un ió per anàlit.

Taula 1.6. Metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats en mostres alimentàries i ambientals

Anàlits	Matriu	Extracció- Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
AMP	Múscul i fetge	EtOH/aigua (Ultrasons)-centrifugació	96	Mightysil RP-4 GP (endcapped) (150 x 4.6 mm, 5µm)	EtOH: heptonosulfonat de sodi 5 mM (35:65)	UV	0,22-0,25 µg/g	Furusawa i cols. (2002)
DNC, LAS, MON, NAR, SAL	Ous i fetge	LSE (ACN i Na ₂ SO ₄)-SPE (Sílice)	86-92	Luna Fenil-hexil (150 x 2,1 mm, 3 µm)	ACN: aigua: MeOH: THF:TFA (67:13:10:10:0,1)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	LOQ: 2,5 µg/kg	Matabudul i cols. (2002)
LAS	Carn processada	LSE (ACN i Na ₂ SO ₄ O)-SPE (sílice +NH ₂)	74-96	PLRP-S (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Tetraborat de sodi 0,01 M pH10: ACN (45:55)	FLD	-	Tarbin i cols. (2002)
DIC, DNC	Greix, fetge i múscul	LSE (ACN) i hexà-LLP	>87	XTerra RP-18	ACN-0,5% acetat d'amoni 0,01 M hidrogensulfat de tetrabutilamoni (43:57)	UV	LOQ: 4-10 µg/kg	Kanda i cols. (2003)
TOL, TOLSO₂ (i altres)	Múscul i ous	Acetona/THF-DCM/Evaporació fase aquosa: àcid heptanosulfònic Greix: hexà i filtració	91-98	Chromolith Performance RP-18e (100 x 4.6 mm)	ACN: àcid acètic 0.1% (Gradient) (TOL, TOLS,	ESI (+) MS (Q)	2-5 µg/kg	Hormazábal i cols. (2003)
DIC, DMZ, DNZ, HFG, ROB	Ous	LSE (ACN)-evaporació-reconstitució	42-113	Waters Symmetry C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm)	ACN 0,1% àcid fòrmic: 0,1 % àcid fòrmic (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 0,75-6,0 µg/kg	Mortier i cols. (2003)
LAS, MON, NAR, SAL	Ous	LSE (ACN+Na ₂ SO ₄)-SPE (Sílice)	60-85	YMC Fenil (50 x 4 mm, 3 µm)	ACN: àcid fòrmic 0,1 % (Gradient)	ESI (+) MS/MS (IT)	1 µg/kg	Heller i cols. (2004)
HFG, DIC, DNC, ROB, LAS, MAD, MON, NAR, SAL	Ous i múscul	LSE (ACN+Na ₂ SO ₄)-SPE (Sílice)	40-60	Purosphere C18 (125 x 3 mm, 5µm)	ACN 0,1% àcid fòrmic: àcid fòrmic 0,1 % (Gradient)	ESI (+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 0,07-0,6 µg/kg	Dubois i cols. (2004)

Taula 1.6. Metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció- Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
NAR, MON, LAS, SAL	Ous	Extracció amb ACN-centrifugació-evaporació i redissolució	90,3-112,7	Waters Symmetry C18 (150 x 2.1 mm, 5 µm)	Aigua:ACN (95:5) 0,1% àcid fòrmic: ACN 0,1 %àcid fòrmic (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	CCα: 1 µg/kg	Mortier i cols. (2005)f
ROB	Ous	ACN/hexà	79-105	Novapack C18 (250 x 4,6 mm)	ACN: tampó fosfats pH 6,8 ajustat amb TEA (65:35)	UV	CCα: 10 µg/kg	Dowling i cols. (2005)
DNC	Fetge	ACN/Hexà/evaporació/reconstitució ACN-aigua/SPE C ₁₈ / evaporació/reconstitució	73.0-125.5	Hypersil BDS C18 (250 x 4,6 mm)	Aigua: ACN (55:45)	UV	CCα: 228 µg/kg	Capurro i cols. (2005)
TOL, HFG	Ous	EtAc/evaporació/reconstitució hexà/extracció Na ₃ PO ₄ 0,02M/SPE(OasisHLB)/ evaporació-reconstitució	-	Waters Symmetry (150 x 4,6, 5 µm)	MeOH: 0,2% àcid acetic	ESI(+) MS/MS (QqQ)	30 µg/kg	Mulder i cols. (2005)
TOLSO₂ altres*)	(i Gambes	5% àcid tricloroacètic/SPE (Oasis HLB)/Evaporació i reconstitució	10%	YMC fenil (50 x 4 mm, 3 µm)	5% ACN/0,1% àcid fòrmic:85% ACN/0,05% àcid fòrmic (Gradient)	APCI(-) MS ⁿ (IT)	50 µg/kg	Li i cols. (2006)
LAS, MON, NAR, SAL	Ous i múscul	LSE (ACN)+SPE (Sílice)	62-100	Luna C18 (150 x 3 mm, 5 µm)	ACN: acetat d'amoni 2mm/2% àcid acètic (95:5)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	CCα: 0,8-2,5 µg/kg	Rokka i cols. (2006)
TOL, DIC	Ronyó i fetge	MSPD	>71	C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampó Àcid fosfòric 0,05 M/TEA:ACN (40:60)	UV	LOQ: ≤15 µg/kg	Qi i cols. (2007)

Taula 1.6. Metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció- Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
LAS, MAD, MON, NAR, SAL	Fetge i múscul	LSE (ACN+Na ₂ SO ₄)-SPE (Sílice)	65-94	Luna C18 (150 x 3 mm, 5 µm)	ACN: acetat d'amoni 2mm/2% àcid acètic (95:5)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	CCα: 0,7-2,4 µg/kg	Jestoi i cols. (2007)
SAL, NAR	Múscul	Cromatografia d'immunoafinitat	83-106	Supelcosil LC-18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	MeOH:àcid acètic: H ₂ O (940:30:30 (v/v))	UV (deriv. Vainillina)	2,5 µg/kg	Ra i cols. (2008)
HFG, DEC, DIC, DNC, CLAZ, LAS, MAD, MON, NAR, ROB, SAL, SEM	Fetge	LSE (ACN)-SPE (Alúmina +HLB)	81-120	Luna Fenil-hexil (150 x 2 mm, 3 µm)	ACN:MeOH: tampó 0,01 M formiat amònic pH 4 (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 3,18-245 µg/kg	Olejnik i cols. (2009)
AMP, DEC, DIA, DIC, DMZ, DNC, ETH, HFG, LAS, MAD, MNZ, MON, NAR, RNZ, ROB, SAL	Ous i múscul	LSE (ACN)-concentració	78-125	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	0,1% àcid fòrmic: MeOH (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	LOQ: 0,1-0,2 µg/kg	Shao i cols. (2009)
HFG, ROB, DIC, DNC, MON, NAR, LAS, SAL, MAD, SEM	Ous	LSE (ACN)-evaporació-reconstitució	85-108	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 3 mm, 5 µm)	ACN 0,1% àcid fòrmic: àcid fòrmic 0,1 % (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 0,27-165 µg/kg	Dubreil-Cheneau i cols. (2009)
ROB	Ous i múscul	LSE (ACN)-SPE (HLB)	>73	-	ACN: 0,05 M tampó dihidrogenfosfat d'amoni (6:4, pH 6,5)	UV	15 µg/kg	Liu i cols. (2010)
LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEM	Ous	LSE (ACN)-evaporació-reconstitució	78-168	ACE C18 (50 x 2,1 mm, 3 µm)	Aigua:MeOH:ACN (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOQ: 1,1-3,4 µg/kg	Ferraz Spisso i cols. (2010)
LAS, MON, NAR, SAL	Llet	LSE (ACN)	60-118	Waters XTerra MS C18 (50 x 2,1 mm, 3,5 µm)	Aigua: ACN:MeOH (0,1% àcid fòrmic a cada fases)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOQ: 1 µg/kg	Thompson i cols. (2011)

Taula 1.6. Metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció- Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
DIC, TOL, TOLSO, TOLSO2	Ous i múscul	LSE (EtAc)-GPC	89-93	Intertsil ODS-3 (150 x 2,1 mm, 4,6 µm)	ACN: 0,1% àcid acètic (55:45)	ESI(-) MS/MS (QqQ)	LOQ: 1,2-1,8 µg/kg	Ai i cols. (2011)
MON, SAL, LAS, NAR, DNC, DIC	Vegetals	LSE (MeOH)-SPE C18	93-120	Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	MeOH 0,1% àcid fòrmic: 0,1 % àcid fòrmic (gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	LOQ: 5,02-16,0 µg/kg	Broekaert i cols. (2011)
LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEM, DEC, DIC, HFG, DNC, ROB	Ous	ACN-Hexà-SPE (Sílice)		Synergy Fusion (150 x 2,0 mm, 4 µm)	0,1% àcid fòrmic:ACN (0,1 % àcid fòrmic i 0,02M acetat de sodi) (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 2,2-174 µg/kg	Galarini i cols. (2011)
DEC, DIC, DNC, HFG, LAS, MAD, MON, NAR, ROB, SAL, SEM	Llet	LSE (ACN)-SPE- evaporació- reconstitució	77-118	Agilent Eclipse XDB-C8 (150 x 3 mm, 3,5 µm)	Aigua:ACN (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	CCα: 1,25-21	Nasz i cols. (2012)
ROB, DEC, MON, SAL, LAS, MAD, NAR	Llet	Extracció amb ACN/SPE Strata-X	69-109	Synergy Polar-RP (50 x 2,0 mm, 2,5 µm)	Aigua:ACN (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QTrap)	LOQ: 0,5-2,5 µg/kg	Nebot i cols. (2012)
CLO, DIC, ETH, LAS, MAD, MON, NAR, SAL	Ous	EtAc+GPC	No indicat	Luna C18 (2) HST (50 x 2,1 mm, 2,5 µm)	ACN:aigua (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	LOQ: 0,16-163 µg/kg	Chico i cols. (2013)
CLO,ETH,NEQ,DEC, DIC, HFG, LAS,MAD,MON, NAR,NIC, ROB, SAL, SEM, TOL, TOLSO	Llet, múscul d'ànec i altres espècies (no aviram)	Llet: QuEChERS LSE (ACN)- evaporació- reconstitució	80-125	Aquity BEH C8 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	ACN 0,1% àcid fòrmic: àcid fòrmic 0,1 % (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 1,1-122 µg/kg	Clarke i cols. (2013)
LAS, MAD, MON, NAR, SAL, SEM	Llet	QuEChERS (sense purificació dSPE)	93-113	ACE C18 (50 x 2,1 mm, 3µm)	Aigua:ACN:MeOH (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOD: 0,03-0,4 µg/kg	Ulberg Pereira i cols. (2016)

Taula 1.6. Metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció- Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
AMP, ETH, LAS, MON, NAR, SAL	Pinsos	MeOH/Acetona/T HF/aigua (ultrasons) - centrifugació	87-99	Purosphere STAR RP-18e (55x4 mm, 3 µm) (LAS, MON, NAR, SAL). Supelcosil LC-ABZ+Plus (250x4.6mm,5µm) (ETH). Supelcosil LC-CN (150x4.6mm,5µm) (AMP)	88%MeOH: 12% àcid fòrmic 0.1% 65% acetat d'amoni 10 mM: 35%acetonitril 50% acetonitril: 50% acetat d'amoni 10 mM	ESI (+) MS (Q)	1,5-5 µg/g	Hormazábal i cols. (2000)
LAS, MON, NAR, SAL	Pinsos	MeOH/Acetona/T HF-centrifugació-Hexà- evaporació-reconstitució	97-106	PLRP-S 100Å (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Acetat d'amoni 10 mM: MeOH:ACN:THF (Gradient)	ESI(+) MS (Q)	0,2-0,6 µg/g	Hormazábal i cols. (2005)
AMP	Pinsos	MeOH:aigua/ Filtració i dilució amb fase mòbil	89,1-103,1	Pursuit XRs (C18) (150 x 2 mm, 3 µm)	HFBA 5 mM:MeOH (Gradient)	ESI(+) MS/MS (IT)	1 mg/kg	Squadrone i cols. (2008)
AMP, CLO, DEC, DIC, DNC, ETH, HLF, LAS, MAD, MeDIC, MON, NAR, ROB, SAL, SEM, TOL	Pinsos	1% NH ₃ en MeOH/Ultrasons/ 2% àcid acètic en MeOH/Agitació i centrifugació	89-124	Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 x 2,1 mm, 2,7 µm)	Formiat d'amoni 0,01M pH 4.0: MeOH: Acetonitril (Gradient)	ESI (+/-) MS/MS (QqQ)	LOD: 0,002-0,14 mg/kg	Pietruk i cols. (2015)
SAL	Premescles medicamentoses i medis de cultiu	EtOH (ultrasons)- Filtració	-	Intertsil ODS-3 (150 x4.6 mm, 5µm)	MeOH: tampó acetat 0.2 M pH 5.8 (100:10)	UV	32,5 µg/mL	Blazsek i cols. (2003)
SAL	Premescles medicamentoses i medis de cultiu	Acetona/filtració	-	Chromolith RP-18e (100 x 4,6 mm)	MeOH:0,1 % àcid fòrmic (85:15)	UV (derivatització)	-	Blazsek i cols. (2005)
MON, SAL, NAR	Aigües superficials	SPE (Oasis HLB)	83,6-101,7	XTerra MS C18 (50 x 2,1 mm, 2,5 µm)	0,1% àcid fòrmic:MeOH: ACN	ESI (+)- MS/MS (IT)	0,03-0,05 µg/L	Cha i cols. (2005)

Taula 1.6. Metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció- Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
MON, SAL, NAR	Aigües superficials i sediments	SPE (Oasis HLB) *Sediments: extracció NaOH 1 M pH 10,0	51,7-123,6	XTerra MS C18 (50 x 2,1 mm, 2,5 µm)	0,1% àcid fòrmic:MeOH	ESI (+) MS/MS (IT)	0,001 µg/L (aigües) 1 µg/kg (sediments)	Kim i cols. (2006)
AMP, MON (i altres**)	Aigües superficials	SPE (Oasis HLB)	94,9-113,0	Thermo Hypersil Gold (50 x 2,1 mm, 5 µm)	ACN:Aigua (20 mM HFBA a cada fase) (gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	1-8 ng/L	Song i cols. (2007)
LAS, MAD, MON, NAR, SAL	Aigües de depuradora d'entrada i sortida i superficials	SPE (Oasis MAX)	86-100	Ascentis Express RP-Amide (100 x 2,1 mm, 2,7 µm)	0,1 % àcid fòrmic:MeOH:ACN (50:50) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOQ: 1-20 ng/L	Herrero i cols. (2012)
DEC, DIC, LAS, MAD, MON, NAR, NIC, ROB, SAL	Aigües superficials	SPE (Strata-X)	94-101	Synergy Polar-RP (50 x 2,0 mm, 2,5 µm)	Aigua:ACN (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QTrap)	LOQ: 12,5 ng/L	Iglesias i cols. (2012)
LAS, MAD, MON, NAR, SAL	Fangs depuradora	PLE (Acetona)	80-98	Ascentis Express RP-Amide (100 x 2,1 mm, 2,7 µm)	0,1 % àcid fòrmic:MeOH:ACN (50:50) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOQ: 1-5 µg/kg	Herrero i al. (2013)
MON, SAL, NAR	Sòls, gallinassa i aigües de filtració	Aigües: SPE Oasis HLB Sòls: Tampó de Mcllvaine: 10 mM EDTA, Na ₂ HPO ₄ i àcid cítric (pH 7), MeOH:Hexà (x2)/evaporació i reconstitució	79-99	Ascentis RP-Amida (150 x 2,1 mm, 3 µm)	Àcid fòrmic 0,1%: ACN: MeOH (Gradient)	ESI (+) MS (Q)	LOD: 15,5-38,8 ng/L 7,6-25,1 µg/kg	Sun i cols. (2013)

1.5.2 Metodologia analítica per a la determinació benzimidazoles

Com ja s'ha indicat a l'apartat 1.1 d'aquesta tesi les benzimidazoles presenten una estructura química basada en un anell de benzè fusionat amb un anell imidazole i contenen diversos grups funcionals. Alhora, els processos metabòlics dels organismes vius transformen aquests compostos hidroxilant-los, sulfonant-los o aminant-los, per mitjà de reaccions generalment de tipus redox de manera que el conjunt dels possibles compostos benzimidazòlics i dels seus metabòlits esdevé un grup que presenta notables diferències en les seves propietats físico-químiques. En conseqüència, el desenvolupament de mètodes per a la determinació de residus de benzoimidazoles pot esdevenir un procés complex tan pel que fa referència a l'extracció dels compostos de la matriu com a la seva separació que generalment es duu a terme mitjançant cromatografia de líquids.

Extracció i purificació

Les benzimidazoles s'han analitzat en diverses matrius, normalment alimentàries. A la taula 1.7 es recullen els treballs publicats a partir de l'any 1995 ja que els mètodes desenvolupats per a l'anàlisi i control d'aquests compostos a partir d'aquesta data tenen una clara relació amb els que es desenvolupen actualment. Les publicacions incloses en aquesta taula s'han agrupat pel tipus de matriu estudiada. La llet és la matriu estudiada amb més freqüència, si bé existeixen mètodes dedicats a l'anàlisi de diversos tipus de teixits (múscul, fetge, etc.) així com de pinsos. Altrament, algunes benzimidazoles, essencialment la tiabendazole, han estat emprades en agricultura on s'afegeixen a fruites i verdures després de la recol·lecció per prevenir l'aparició de fongs. Per aquest motiu, a la literatura es troben també algunes referències de mètodes en els quals s'analitzen benzimidazoles juntament amb altres pesticides en matrius com fruites i verdures, que a priori tenen poca relació amb l'ús habitual d'un fàrmac veterinari. Tot i la varietat de matrius a analitzar la major part dels mètodes publicats a la literatura per a l'anàlisi de benzimidazoles s'inicien amb una extracció líquid-líquid convencional emprant acetonitril o acetat d'etil com a solvent. En ocasions, l'extracció es realitza en medi àcid o bàsic en funció dels anàlits a extreure. Les polaritats i pKa poden diferir notablement entre el compost parental i el metabòlit, la qual cosa pot obligar a treballar en un determinat interval de pH per afavorir el pas dels anàlits al solvent d'extracció. Danaher i cols. (Danaher i cols., 2007) publicaren un article de revisió de la metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en teixits biològics on s'inclou un recull dels pKa, obtinguts tant experimentalment com mitjançant programes de simulació (Pallas Software v 3.0) que és una bona font per establir l'interval de pH en el qual les diferents molècules es troben en forma neutre i per tant, es podran extreure fàcilment amb

solvents orgànics. En aquest article es posa de manifest que alguns compostos com per exemple la 5-hidroxitiabendazole es troben sempre en forma iònica.

En el cas de l'anàlisi de mostres amb un contingut elevat de greix (llet, fetge, etc.) molts autors opten per una etapa d'eliminació del greix després de l'extracció, normalment duent a terme una nova extracció amb un solvent no polar com l'hexà. La purificació de l'extracte resultant normalment es realitza per extracció en fase sòlida utilitzant en la majoria de casos, resines de bescanvi catiònic, fort (SCX) o mitjà (MCX), tot i que no són les úniques opcions. Per exemple, Cannavan i cols. (Cannavan i cols., 1998) proposen emprar cartutxos de cianopropil mentre que altres autors utilitzen rebliments de fase invertida polimèrics (OASIS HLB) i amb cadenes alquíliques de diferents longituds (C2, C8 i C18).

Tot i que la majoria dels mètodes es basen en una extracció líquid-líquid seguida de purificació/preconcentració mitjançant SPE, també es troben mètodes alternatius basats en altres tècniques. Així, a partir de la segona meitat de la dècada 2000-2010 van començar a utilitzar-se els QuEChERS per a l'extracció. Aquest mètode ha estat emprat en l'anàlisi de llet (Kinsella i cols., 2009; Keegan i cols., 2009), proporcionant recuperacions superiors al 66%, ous (Domínguez-Álvarez i cols., 2013) amb recuperacions superiors al 74% i aliments infantils (Gilbert-López i cols. (2007) amb una recuperació per a la tiabendazole del 94,9%. Altres mètodes que es troben a la literatura són la microextracció en fase sòlida (SPME) emprada en l'anàlisi de llet i aigua per Zhang i cols. (2015) i Cacho i cols (2008) respectivament, la microextracció líquid-líquid dispersiva assistida per ultrasons amb surfactants com agent d'emulsió (Boontognto i cols., 2014) que s'ha utilitzat per a l'anàlisi de llet, així com la preconcentració *on-line* emprant cartutxos LiChroCart, reblerts de material de sílice que s'ha proposat per a l'anàlisi de llet encara que cal diluir i ajustar el pH de la mostra (García-Gómez i cols. 2012).

Separació

Per a la separació i anàlisi de les benzimidazoles normalment s'utilitza cromatografia de líquids i pràcticament la totalitat dels mètodes descrits a la literatura empen columnes de fase invertida de C18. Només Gilbert-López i cols. (Gilbert-López i cols., 2007) van emprar una columna de C8 encara que cal esmentar que aquests autors proposen un mètode per a la determinació de tiabendazole i 11 pesticides més. Respecte a les fases mòbils utilitzades, la majoria dels mètodes empen acetonitril com a fase orgànica i fases aquoses acidificades principalment amb àcid fòrmic o bé que contenen tampons fòrmic/formiat o acètic/acetat. Quan la detecció posterior a la separació es duu a terme per UV, es poden trobar fases mòbils

amb tampons no volàtils, com els fosfats o fins i tot amb formadors de parells iònics com l'octanosulfonat de sodi (De Ruyck i cols., 2000). Sovint quan la detecció es realitza per mitjà de l'espectrometria de masses, s'acidifica tant la fase aquosa com l'orgànica addicionant un 0,1% d'àcid fòrmic a cada fase.

D'altra banda, i tenint en compte la capacitat d'ionització de les benzimidazoles a determinats pHs, existeix una quantitat gens menyspreable de mètodes basats en l'electroforesi capil·lar. Aquesta tècnica de separació ha estat aplicada preferentment en la determinació de tiabendazole en fruites, però Domínguez-Àlvarez i cols. (Domínguez-Àlvarez i cols., 20013) la varen emprar també en l'anàlisi d'ous on van determinar fins a 9 benzimidazoles entre compostos parentals i metabòlits. Derivada de l'electroforesi capil·lar, l'electrocromatografia capil·lar, un híbrid entre l'HPLC i la CE també ha estat emprada en la determinació de tiabendazole. En aquesta tècnica la fase mòbil es transporta gràcies al flux electroosmòtic a través de la fase estacionària que rebleix el capil·lar de sílice. Concretament, el treball descrit per Cacho i cols. (Cacho i cols., 2008) va emprar un capil·lar amb una fase estacionària de polímers d'empremta molecular (MIP) dissenyats per al reconeixement de THB i una fase mòbil o electròlit de transport d'acetonitril amb un 4% d'àcid cítric.

Per a la determinació de benzimidazoles també s'han utilitzat altres tècniques d'anàlisi. Així, a la literatura es troben mètodes per a la determinació de benzimidazoles que utilitzen cromatografia de gasos, tal com es recull a l'article de revisió de Danaher i cols. (Danaher i cols., 2007). Si bé la naturalesa bàsica d'aquests compostos i la seva baixa volatilitat fan que siguin mètodes complexos. No obstant, la tiabendazole i la triclabendazole són suficientment volàtils com per poder ser determinades per GC sense necessitat de derivatització. Es troben aplicacions d'aquesta metodologia per a la determinació d'aquests compostos que s'utilitzen com a fungicides en fruita. Val a dir però, que actualment aquesta metodologia no s'aplica, òbviament perquè presenta molts inconvenients en comparació amb la cromatografia de líquids.

Les tècniques que tot i ser de les més antigues, encara prevalen en l'actualitat són les basades en kits d'immunoassaig i ELISA. Principalment perquè el camp d'aplicació no acostuma a ser el de la determinació de residus en aliments o medi ambient, sinó el seguiment de la farmacocinètica dels medicaments en estudi i els nivells de depleció dels mateixos, raó per la qual els nivells de concentració que acostumen a determinar-se són força elevats en comparació amb els mètodes basats en la cromatografia de líquids, per exemple de 50 a 500 µg/kg en fetge (Brandon i cols., 1998), però perfectament compatibles amb aquests tipus de tècnica.

Com a tècnica més innovadora, es pot destacar la publicació de Keegan i cols. (Keegan i cols., 2009) en què van emprar un biosensor de ressonància de plasmons per a la determinació d'onze benzimidazoles entre compostos parentals i metabòlits en llet assolint un límit de detecció de 2,7 µg/kg. Els resultats obtinguts mitjançant aquesta nova tècnica varen ser contrastats amb un mètode d'UPLC-MS/MS confirmant-se la idoneïtat de la tècnica per a un ràpid cribratge d'aquests compostos en llet. La proporció de falsos negatius va ser establerta per sota del 5% i en qualsevol cas, els autors proposaren el propi mètode d'UPLC-MS/MS per a la confirmació de mostres sospitoses de ser positives.

Detecció

La detecció emprada en l'anàlisi de benzimidazoles en cromatografia de líquids acostuma a ser bàsicament de tres tipus, UV, fluorescència o bé acoblament a l'espectrometria de masses. Les benzimidazoles posseeixen un grup cromòfor molt potent i per tant poden ser fàcilment determinades mitjançant detecció UV. Per aquesta raó aquest sistema de detecció fou dels primers en ésser utilitzats i existeixen nombrosos treballs a la literatura que empen aquesta detecció per a l'anàlisi de mostres biològiques, ambientals i alimentàries. Ara bé, atès que alguns compostos (ABZ, CAM, FLU, TCB; TBZ i els seus metabòlits) presenten estructures amb anells condensats que són naturalment fluorescents, la detecció per fluorescència, que és més sensible i selectiva que la detecció UV és i ha estat una bona opció per aquests compostos. Per exemple, López i cols. (López i cols., 2007) utilitzant una longitud d'ona d'excitació de 300 nm una d'emissió de 350 nm van obtenir uns límits de detecció per a la tiabendazole i flubendazole en mostres d'aigua de l'ordre dels ppt. Tot i així, l'aplicabilitat d'aquesta tècnica és limitada i per aquest motiu ha estat tradicionalment, molt menys emprada que la detecció UV. En UV s'acostuma a treballar a longituds d'ona de detecció entorn els 290-300 nm i s'obtenen límits de quantificació de l'ordre dels baixos ppbs.

Darrerament, però, l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses s'ha imposat atesa la seva capacitat de combinar l'anàlisi quantitativa amb la confirmació de l'anàlit. Les benzimidazoles s'ionitzen preferentment en mode positiu generant ions intensos del tipus $[M+H]^+$ mentre que en aplicar polaritat negativa s'obtenen els ions $[M-H]^-$ que en general presenten una intensitat menor. Tan sols la triclabendazole i els seus metabòlits acostumen a ser analitzats preferentment en polaritat negativa ja que la presència de diversos àtoms de clor en la seva estructura estabilitza la càrrega negativa proporcionant en conseqüència una senyal notablement més intensa que en polaritat positiva (Kinsella i cols., 2009; Jedziniak i cols., 2009).

Pel que fa referència a les fonts d'ionització, la gran majoria dels mètodes de MS que es troben descrits a la literatura utilitzen l'electrosprai i només Cannavan i cols. (Cannavan i cols., 1998) van utilitzat una font d'ionització química a pressió atmosfèrica (APCI). En aquest cas, la utilització d'aquesta font d'ionització enlloc de l'ESI va permetre als autors treballar amb fragmentació a la font i obtenir més d'un ió producte per a la confirmació dels anàlits emprant un quadrupol simple (Q) i complint els requeriments de la legislació pel que fa a la confirmació.

De fet el mètode més emprat avui dia per a l'anàlisi de les benzimidazoles és l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses emprant ESI com a font d'ionització i un triple quadrupol com analitzador. Aquesta tècnica permet obtenir baixos límits de detecció que pot arribar als ng/kg (Wangs i cols., 2016) i garanteix el suficient nombre d'ions diagnòstic per a una adequada confirmació. Això queda reflectit a la taula 1.7 on es pot comprovar que gairebé la totalitat dels mètodes basats en l'espectrometria de masses, fan ús d'aquest tipus d'instrumentació. Val la pena destacar, per ser l'excepció a aquesta tendència generalitzada, el treball de Gilbert-López i cols. (Gilbert-López i cols., 2007) on es va emprar un analitzador de temps de vol (TOF) per a la determinació de tiabendazole i altres pesticides en aliments infantils determinant les masses exactes d'ions precursors i productes per a la confirmació dels compostos analitzats.

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
ABZ i altres	Llet	ACN-Hexà-DCM- evaporació/ redissolució- SPE (C2)	-	Supelco C18 (75 x 4,6 mm)	ACN: 10 mM NH ₄ Ac/HFor pH=4,5 (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOD: 5 µg/L	Casetta i cols., 1996
FEN, TBZ, ABZ, OXI	Llet	CHCl ₃ /0,1 M NaOH- concentració	68-85 %	Alltima C18 (150 x 3,2 mm, 5 µm)	0,01 M octanosulfonat de sodi pH 3,5 H ₃ PO ₄ :ACN:Aigua (Gradient)	UV (295 nm)	LOQ: 1,4-6,9 µg/L	De Ruyck i cols., 2000
TBZ, OXF, OXI, ABZ, FEN, FEB, TCB	Llet	Mostra en medi basic (NaOH)-EtAc- evaporació- reconstitució	90-102 %	Alltima C18 (150 x 3,2 mm, 5 µm)	0,1% àcid fòrmic:ACN (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	CCα:1,1-1,4 µg/L	De Ruyck i cols., 2002
BZ CAM, OXI, FLU, MEB, OXF, TBZ, TCB i metabòlits	Llet	QuEChERS	66-111 %	Phenomenex Prodigy C18 (150 x 3 mm, 5 µm)	25 mM NH ₄ COOH pH 4: 12,5 mM NH ₄ COOH en ACN:MeOH (50:50) (Gradient)	ESI (+/-) MS/MS (QqQ)	CCα: 11-112 µg/kg	Kinsella i cols., 2009
ABZ, MEB, OXF, OXI, FLU, TCB, FEB i metabòlits	Llet	QuEChERS	81-116 %	-	-	Biosensor SPR (Ressonància de plasmons de superfície)	LOD: 2,7 µg/kg	Keegan i cols., 2009

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
LEV, TCB, CAM, FEN, MEB, FLU, OXI, OXF, TBZ, ABZ i metabòlits	Llet	EtAc-hexà-EtOH acidificat	70-110 %	XTerra MS C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	ACN: 0,025 M NH ₄ Ac/HAc pH 5,0 (Gradient)	ESI (+/-) MS (Q)	LOD: 0,1-1,0 µg/kg	Jedziniak i cols., 2009
ABZ, TBZ, FEN, MEB, CAM, OXI, FLU, FEN, TCB i metabòlits	Llet	Solució 1 % BHT ACN, Na ₂ SO ₄ anhidre- evaporació- redissolució-SPE (MCX)	78-110 %	XTerra C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	0,02 N NH ₄ Ac/ ACN (Gradient)	UV (292 nm)	LOD: 3 µg/kg	Chen i cols., 2010
TBZ, ABZ, OXF, OXI, FEN, MEB, FLU, FEB i metabòlits	Llet	Centrifugació- eliminació del greix- SPE (Oasis MCX)	80-101 %	Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	ACN:aigua (0,1% àcid formic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOD: 0,01-0,5 µg/L	Xia i cols., 2010
ABZ, MEB, FEN, OXF, OXI, FLU, FEB i metabòlits	Llet	Dilució 50% MeOH i tampó fosfat /citrat pH 7,2, i EDTA (0,37 g)- preconcentració <i>on-line</i> LiChroCART 254LiChrospher RP4 alkyl-diol-silica (ADS) (25 µm, 25x 4 mm)	70-120 %	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	ACN:Aigua (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	CCα: 3,2-5,7 µg/kg	García-Gómez i cols., 2012

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
OXF, ABZ, MEB, FLU, FEN	Llet	<i>Ultrasound-assisted surfactant enhanced emulsification microextraction (UASEME)</i>	79-118 %	Intertsil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN: 0,1% àcid formic (Gradient)	UV (296 nm)	LOD: 0,5-6,0 µg/L	Boontognto i cols., 2014
ABZ, TBZ, MEB, FLU, FEN, OXF, OXI, FEB, metabòlits i altres	Llet	1% àcid acetic en ACN-evaporació-reconstitució-SPE (OASIS MCX)	87-119 %	Acquiti BHE C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	0,1% àcid formic/5 mM acetat d'amoni: MeOH (Gradient)	ESI (+) MS/MS (QqQ)	CCα: 0,01-112 µg/kg	Mahou i cols., 2014
FEN, TBZ, MEB, ABZ, OXF	Llet i mel	TFA/aigua-SPME (fibres monolítiques)	72-121 %	Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN: 0,1% àcid formic (Gradient)	UV (DAD)	LOD: 0,1-0,30 µg/L	Zhang i cols., 2015
TBZ, ABZ, OXI, MEB, FEN, FLU, OXF metabòlits i altres	Llet	ACN-evaporació-reconstitució-SPE (Oasis MCX)	60-102 %	Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	ACN:aigua (0,1% àcid formic a cada fase) (Gradient)	ESI(+/-) MS/MS (QqQ)	LOQ: 5-50 ng/kg	Wang i cols., 2016

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
TBZ i metabòlit	Múscul, fetge i ronyó	Tampó fosfat (pH 7.0)/EtAc-centrifugació i evaporació-hexà/SPE (CN)	96-103 %	Prodigy 5 ODS 3 (150 x 4,5 mm, 2 µm)	0,1% NH ₄ Ac: ACN (Gradient)	APCI (+) MS (Q)	-	Cannavan i cols., 1998
TBZ, ABZ, FEB, FEN, TCB, OXI, CAM, FLU i metabòlits	Múscul, fetge i ous	EtAc- SPE (estirè-divinilbenzè)	>50 %	Zorbax RX C18 (150 x 1,1 mm, 5 µm)	ACN-0,01 NH ₄ Ac 0,5% HAc (60:40)	M ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOQ:5-30 µg/kg	Balitz, 1999
FEB, FEN, OXF i metabòlits	Fetge	ACN-acidificació acètic-SPE (SCX)	37-105 %	Chromosphere 5C8 (250 x 3 mm)	A: NH ₄ CO ₃ 0,1 M-MeOH (80:20) B: NH ₄ CO ₃ 0,1 M-MeOH (20:80) (Gradient)	UV (290 nm)	-	Rose, 1999
MEB i metabòlits	Fetge	EtAc-evaporació-reconstitució en MeOH-hexà	86-99 %	Alltima C18 (150 x 2,1 mm, 5 µm)	0,1% àcid fòrmic: ACN (Gradient)	ESI (+) MS/MS (QqQ)	CCα: 56,6-64,2 µg/L	De Ruyck i cols., 2001
TBZ, OXF, MEB, OXI, CAM, MEB, ABZ, FEN, TCB, FLU i metabòlits	Fetge	Extracció amb CO ₂ supercrític-SPE (SCX)	31-93 %	XTerra C18 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm)	A: NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 6,8: MeOH:ACN (76:15:9) B: NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 6,8: MeOH:ACN (52:30:18) C: NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 6,8:MeOH (18:82) (Gradient)	UV (298 nm)	LOD: 50 µg/kg	Danaher i cols., 2003

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
ABZ, FLU, MBZ, OXI, OXF, TBZ I metabòlits	Fetge	Na ₂ SO ₄ -K ₂ CO ₃ 4 M- EtAc-centrifugació- evaporació-EtOH:HCl 0,2 M: Hexà-centrifugació-SPE (C18)-elució amb EtAc- evaporació- redissolució	20-94 %	XTerra C18 (150 x 3,0 mm, 3,5 µm)	NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 6,5:MeOH, ACN (Gradient)	UV (298 nm)	CCα:242-1303 µg/kg	Dowling i cols. 2005
ABZ, OXI, TBZ, OXF, TCB, FEN, FLU I metabòlits	Fetge	ACN, Na ₂ SO ₄ anhidre- SPE (SCX)	80-101 %	Zorbax SB-C18 (250 x 4,6 mm, 3 µm)	A: ACN:MeOH(9:1) B: t NH ₄ H ₂ PO ₄ pH 4,78 (Gradient)	UV (285 nm)	LOD: 5-15 µg/kg	Caprioli i cols., 2010
ABZ, OXI, FEN, OXF, MEB I metabòlits	Ous	QuEChERS (PSA)	74-112 %	-	Aigua:isopropanol (70:30) 6 M àcid fòrmic	CE-ESI (+) MS (Q)	CCα: 7-62 µg/kg	Domínguez-Álvarez i cols., 2013
TBZ, ABZ, OXI, MEB, FEN, FLU, OXF I metabòlits	Múscul, fetge i ronyons	EtAc-SPE (Oasis MCX)	63-109 %	Acquity BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	ACN:aigua (0,1% àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOD: 1-30 ng/kg	Xia i cols., 2013
FLU, FEB	Pinsos	DMF	98-99 %	Supelcosil LC-18 DB (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN: H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 3; 0,017M (Gradient)	UV (300 nm)	LOD: 3 mg/kg	Dusi i cols. 2005

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
TBZ, OXI, ABZ, MEB, FEN, FLU, OXF, TCB	Pinsos	0,1% àcid formic en ACN-dilució amb 0,1% àcid fòrmic	84-104 %	XBridge C18 (150 x 2,1 mm, 3,5 µm)	0,1% àcid fòrmic: ACN (Gradient)	ESI (+) MS/MS (QqQ)	LOD: 2,1-63,0 µg/kg	Li i cols., 2011
FEN, FLU i altres	Pinsos	MeOH-evaporació-reconstitució	-	Acquity UPLC HSS T3 (C18) (150 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Aigua:ACN (0,05% àcid formic a cada fase) (Gradient)	ESI (+) MS/MS (QqQ)	-	Robert i cols., 2015
TBZ i altres	Raïm	MeOH:H ₂ O-SPE (C8)	73-75 %	-	4mM H ₃ PO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH= 3,5	CZE-UV (210 nm)	LOD: 50 µg/kg	Rodríguez i cols., 2001
TBZ	Llimones	EtAc i NH ₃ /Na ₂ SO ₄ ⁻ evaporació-CHCl ₃ -evaporació	62 %	-	33% 50 mM NaH ₂ PO ₄ /H ₃ PO ₄ pH 3 67% ACN	CE-UV	LOD: 2,3 µg/mL	Kaltsonoudis i cols., 2003
TBZ i altres	Llimones	0,5% TFA en ACN/ EtAc:éter de petroli-addició NH ₃ 30%/ evaporació-reconstitució en ACN i SDS 3 mM/SPE (HLB)	97-98 %	Supelcosil LC-C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN:aigua:NH ₃ (30%) (39:60,5:0,5)	UV (254)	LOD: 270 µg/kg	Konstantinos i cols., 2004
TBZ i altres	Aliments infantils	QuEChERS i SPE (Oasis HLB) (per a suc de fruites)	95 %	Zorbax Eclipse C ₈ XDB-C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	ACN:0,1% àcid formic (Gradient)	ESI(+) MS (TOF)	LOD: 0,4 µg/kg	Gilber-López i cols., 2007

Taula 1.7. Metodologia analítica per a la determinació de benzimidazoles en mostres alimentàries i ambientals (Continuació)

Anàlits	Matriu	Extracció-Purificació	Recuperació	Columna analítica	Fase mòbil	Detecció	Sensibilitat	Referència
TBZ (multiresidu pesticides)	Fruites i verdures	EtAc (Na ₂ SO ₄ anhidre)- evaporació-dilució	70-106,8	XTerra MS C18 (100 x 2,5 mm, 3,5 µm)	Aigua:ACN (0,1 % àcid fòrmic a cada fase) (Gradient)	ESI(+) MS/MS (QqQ)	LOQ: 10 µg/kg	Boititsi i cols., 2007
THB, FLU	Aigua	SPME	115-119	Symmetry C18 (150 x 3,9 mm, 8 µm)	MeOH:aigua (45:55)	FLD (300 nm excitació/350 emmissió)	LOD: 0,03-0,04 µg/L	López i cols., 2007
TBZ	Cítrics	ACN-ultrasons	97-99	Capilar d'electroforesi reblert de MIP	ACN 4 % àcid cítric	MIP-CEC-UV (305 nm)	LOD: 40 µg/kg	Cacho i cols., 2008

1.6 Presència de fàrmacs antiparasitaris en aliments i el medi ambient

Tot i la legislació vigent en matèria de seguretat alimentària, avui dia encara es detecta amb una certa freqüència la presència d'alguns compostos antiparasitaris en mostres destinades al consum humà. Segons diversos estudis, la raó principal per la qual es troben mostres no conformes amb la legislació és que s'hagin administrat fàrmacs a animals per als quals no estan destinats o bé que s'hagi superat la dosi recomanada. També pot ser que no es respectin els períodes de depleció i que per tant, no es doni temps per a l'eliminació metabòlica del fàrmac de l'organisme de l'animal. Finalment, la presència de fàrmacs als teixits animals també pot estar causada pel consum de pinsos que estiguin involuntàriament contaminats amb aquestes substàncies.

Durant la dècada dels 90 l'interès per determinar residus de coccidiostats en aliments va augmentar degut a l'elevat nombre d'informes que van aparèixer sobre aliments contaminats amb nicarbazina i lasalocid. Durant aquells anys i la primera dècada del 2000, es van trobar nivells de lasalocid en ous entre 0,3 i 129 µg/kg. L'any 2005 un estudi dut a terme per la UE va posar de manifest que el lasalocid era el coccidiostat que es trobava amb més freqüència en ous. Per exemple, en un dels estudis va ser detectat en el 23% de les mostres analitzades (300) (Mortier i cols., 2005). Un altre aspecte a destacar d'aquest mateix estudi és que es va detectar la presència de més d'un coccidiostat en més d'una tercera part de les mostres analitzades. En un altre estudi Danaher i cols. (2008), van detectar la presència de nicarbazina en el 26% de les mostres analitzades. En aquest context, diverses investigacions portades a terme a les granges de producció avícola, van concloure que la causa més probable d'aquestes contaminacions eren les males praxis en la manipulació dels pinsos (O'Keeffe i cols., 2007; Kennedy i cols., 1998). Un altre aspecte a destacar d'aquests estudis és que es va observar que més d'un 20% dels pinsos no medicats analitzats presentaven contaminació creuada per monensina a uns nivells un 5% superiors a la dosi terapèutica de l'esmentat principi actiu i aquest fet va posar en evidència la problemàtica de les contaminacions creuades. Es va demostrar, a més, que l'administració de pinsos contaminats a una concentració superior a la dosi terapèutica pot provocar la presència d'aquest fàrmac en ous per sobre dels límits legals establerts. Altres estudis duts a terme

per determinar la font de la contaminació per coccidiostats van posar de manifest que en la majoria dels casos són les males pràctiques a les fàbriques de pinsos i les manipulacions portades a terme a les mateixes granges les responsables de la contaminació creuada.

L'informe anual de la UE sobre residus de coccidiostats de l'any 2010 reporta un índex de mostres no conformes d'un 2,1% en mostres de carn de pollastre i d'un 1,2% en ous mentre que en aquest mateix informe de l'any 2011 aquest índex mostra una reducció fins un 0,22% i 0,72% respectivament. Ara bé, aquesta millora es deu majoritàriament a una relaxació dels MRLs per a la nicarbazina que va passar de 200 µg/kg per a qualsevol teixit (abans del 2010) a 4000 µg/kg, 6000 µg/kg i 15000 µg/kg per a múscul, ronyó i fetge respectivament (a partir de finals del 2010). Això implica que mostres que haurien estat no conformes segons els MRLs anteriors al 2010, amb els nous MRLs van passar a ser considerades mostres conformes. Fora de la UE, una publicació de Shao i cols. (2009) reporta la presència de maduramicina a nivells entre 0,21-0,93 µg/kg en el 45% de les mostres de pollastre analitzades (27) i en un 12% de les mostres d'ou a concentracions entre 0,14-0,30 µg/kg. En un 42% de les mostres d'ous aquests autors també van detectar salinomicina a nivells entre 0,26-2,15 µg/kg.

Respecte les benzimidazoles, a la bibliografia d'accés públic no s'han publicat dades sobre la presència d'aquests compostos en mostres d'origen animal destinades al consum humà. La pràctica totalitat de les publicacions en les que s'estableixen mètodes de determinació de benzimidazoles en productes de consum humà empen matrius blanques per a la validació dels mètodes desenvolupats i no reporten resultats positius per a cap dels compostos analitzats. Els MRLs establerts sembla doncs que garanteixen la seguretat dels productes consumits i atenent a la manca de dades disponibles, cal considerar que en els laboratoris de seguretat alimentària no és freqüent trobar mostres no conformes. Ara bé, la utilització de tiabendazole com a pesticida antifúngic en fruites i verdures, ha portat a trobar aquest compost en productes destinats a infants com per exemple en els purés de fruites. Gilbert i cols. (2007) van trobar nivells d'aquest compost en aquests productes a unes concentracions d'entre els 0,82 µg/kg i els 3,63 µg/kg.

Pel que fa referència a la presència d'aquests compostos en el medi ambient, existeixen pocs estudis al respecte. Tot i així, Herrero i cols. (2012) van analitzar aigües de

depuradora en la cerca de polièters ionòfors i van trobar nivells de monensina i narasina de 10-16 ng/L i 43-47 ng/L respectivament en les aigües residuals d'entrada a plantes depuradores i en una de les mostres van detectar la presència de salinomicina a un nivell de 32 ng/L. En els efluents de la depuradora, els nivells trobats de monensina i narasina van ser de 22-34 ng/L i 6-15 ng/L respectivament, la qual cosa posa de manifest que el procés de depuració de l'aigua és efectiu pel que fa a l'eliminació de narasina però no per a la monensina. També s'han detectat residus de monensina i narasina en fangs de depuradora de plantes de tractament d'aigües residuals a uns nivells de concentració de 3,5 µg/kg i 3,7 µg/kg respectivament (Herrero i cols., 2013). Aquests compostos així com la salinomicina, també s'han trobat en aigües superficials a nivells d'entre els 3 ng/L i 38 ng/L els dos primers i d'entre els 4 ng/L i els 7 ng/L la salinomicina (Cha i cols., 2005; Kim i cols., 2006; Kim i cols., 2007).

CAPÍTOL 2

Anàlisi de fàrmacs antiparasitaris

2.1 Introducció

En aquest capítol s'inclouen les publicacions resultat del treball experimental realitzat en aquesta tesi doctoral. Amb l'objectiu de desenvolupar metodologies ràpides i eficients per a la determinació de fàrmacs antiparasitaris en aliments i aigües superficials s'han posat a punt diversos mètodes que pretenen ésser una alternativa a la metodologia disponible a la literatura. En el desenvolupament dels mètodes s'ha incidit tant en el tractament de la mostra com en la separació dels anàlits i en la seva caracterització i quantificació.

En l'anàlisi de mostres complexes és necessari aïllar els anàlits d'interès de la resta de compostos de la mostra i això obliga a un exhaustiu tractament de la mostra que inclou etapes d'extracció, preconcentració, fraccionament i purificació dels extractes (*clean-up*). En aquesta tesi s'ha intentat en la mesura del possible, minimitzar els volums de dissolvents emprats en l'extracció així com el grau de perillositat dels solvents seleccionats. En tots els mètodes optimitzats s'ha dut a terme una avaluació del procediment d'extracció i purificació dels extractes i en concret s'han emprat dues tècniques: l'extracció en fase sòlida i els QuEChERS, els fonaments dels quals s'han exposat en l'apartat 1.4 d'aquesta memòria.

D'altra banda, la correcta identificació i quantificació dels anàlits d'interès, requereix la seva separació i en conseqüència, és pràcticament imprescindible la utilització de les tècniques de separació. En concret, com s'ha comentat a l'apartat 1.4 d'aquesta memòria, per a la determinació de fàrmacs veterinaris la cromatografia de líquids és la tècnica de separació més emprada. En els últims anys, i amb l'objectiu d'augmentar l'eficàcia de la separació cromatogràfica i de desenvolupar mètodes ràpids, s'utilitzen columnes de diàmetre de partícula sub-2 μ m. Aquesta reducció del diàmetre de la partícula comporta una important disminució de la difusió aparent, de la resistència a la transferència de massa de l'anàlit a la fase mòbil i a la fase mòbil estagnant, així com de la fracció de fase mòbil estagnant que fa disminuir l'alçada equivalent a un plat teòric i augmentar l'eficàcia, tot i que comporta un augment considerable de la pressió. Un tipus de rebliments que també permet millorar l'eficàcia amb l'avantatge que no genera sobrepressions és el que conté partícules de nucli sòlid. Aquest tipus de partícules han

irromput al mercat aquesta última dècada i es caracteritzen per tenir un nucli no porós envoltat d'una capa porosa d'un gruix d'entre un 30% i un 40% del diàmetre total de la partícula. Això permet minimitzar la difusió de l'analit en els porus de les partícules del rebliment i reduir la resistència a la transferència de massa a la fase mòbil estagnant. A més, la gran l'homogeneïtat de les partícules, superior a la de les sub-2 μ m, es tradueix en una menor variació en la distribució de mides de les partícules i permet un bon empaquetament i disminuir significativament la difusió aparent. Una altra innovació de la cromatografia de líquids d'aquests últims anys ha estat el desenvolupament de noves fases estacionàries que han permès disposar de fases alternatives a les d'octadecilsilà (C18). En aquesta tesi s'ha emprat la cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica (HILIC) per a l'anàlisi d'ampròlium (Article III). Aquest compost, com ja s'ha comentat a l'apartat 1.4 d'aquesta tesi, s'ha analitzat tradicionalment per cromatografia en fase normal o mitjançant cromatografia de fase invertida amb l'addició de formadors de parell iònic a la fase mòbil atesa la seva naturalesa catiònica. Aquests mètodes però, dificulten la posterior detecció amb espectrometria de masses ja que empren solvents no polars o additius no volàtils. Per exemple, l'àcid heptafluorobutíric, un dels formadors de parell iònic proposats té l'inconvenient el ser un compost difícil d'eliminar dels sistemes, deixa els equips d'espectrometria de masses contaminats durant llargs períodes de temps i provoca efectes de supressió iònica quan es treballa en mode de polaritat negativa. En HILIC (Alpert,1990) s'utilitzen fases estacionàries hidrofíliques que faciliten la formació d'una capa d'aigua en la superfície. El mecanisme de retenció en aquest tipus de cromatografia en emprar una columna de sílice pura és una complexa combinació de partició líquid-líquid que es produeix entre els compostos polars presents en una fase mòbil enriquida en solvent orgànic i la capa d'aigua adsorbida a la fase estacionària, de retenció per bescanvi iònic entre els grups silanols de la sílice pura i els anàlits i d'interaccions de dipol-dipol entre determinats grups funcionals i la fase estacionària. El gran avantatge que presenta aquest tipus de fase estacionària és que permet analitzar compostos molt polars emprant fases mòbils típiques de cromatografia en fase invertida que són comunament més segures, menys contaminants i d'un ús més senzill.

Pel que fa referència a l'espectrometria de masses, en aquesta tesi ha estat emprada tan com a eina d'elucidació estructural com per a la detecció i quantificació dels anàlits. S'han avaluat diferents fonts d'ionització a pressió atmosfèrica (API), electrosprai (ESI), ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) i fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI), tenint en compte les característiques dels anàlits i els mecanismes d'ionització en cada cas. L'electrosprai és la font d'ionització més emprada en l'acoblament de la cromatografia de líquids amb l'espectrometria de masses ja que és compatible amb un gran ventall de compostos de polaritat mitjana-alta. En ESI la ionització dels compostos es produeix en fase líquida mitjançant equilibris àcid-base, es formen micro-gotes carregades enriquides en ions positius o negatius segons la polaritat emprada, i els ions passen a la fase gas via evaporació iònica. Aquesta font d'ionització produeix una ionització suau que evita que les molècules es fragmentin i permet analitzar molècules d'elevat pes molecular sempre que presentin en la seva estructura diversos grups funcionals ionitzables. Ara bé, aquest tipus d'ionització, és més susceptible de patir efectes matriu, ja siguin de supressió o augment de la ionització. En ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) per contra, la ionització es produeix en fase gas en aplicar un potencial de descàrrega a un elèctrode en forma d'agulla, de manera que els compostos que coelueixen interfereixen menys en l'eficàcia de la ionització essent per tant, una font menys sensible a la supressió de la ionització que l'ESI. Ara bé, en aquesta tècnica, es treballa a unes condicions més energètiques que en ESI la qual cosa facilita la fragmentació a la font. Pel que fa al camp d'aplicació, el de l'APCI és més limitat que el de l'ESI ja que només es ionitzen molècules de pes molecular relativament baix i polaritats moderades i baixes. En APPI, una altra de les tècniques API emprades en el desenvolupament d'aquesta tesi (Article V), la ionització de les molècules té lloc en fase gas per mitjà dels fotons emesos (10,0 i 10,6 eV) per una làmpada de criptó i és adequada per a la ionització de compostos aromàtics. En aquest tipus d'ionització l'eficàcia acostuma a ser baixa si no s'afegeixen dissolvents (dopants) fàcilment ionitzables i que puguin transferir la càrrega als compostos d'interès per mitjà de reaccions de transferència de càrrega, transferència protònica o captura electrònica. El camp d'aplicació d'aquesta font API és bastant més limitat que el de les fonts d'ionització anteriors i per aquest motiu, el nombre de publicacions que es troben a la literatura és baix en comparació amb les altres tècniques i sovint, basades en l'estudi dels

mecanismes d'ionització que es produeixen més que no pas en aplicacions a l'anàlisi de mostres reals.

En aquesta tesi també s'ha avaluat la potencialitat d'una font d'ionització de les anomenades "ambient", concretament el *Direct analysis in real time* (DART) (Article VI). Avui dia les tècniques "ambient" tenen un gran interès ja que permeten l'anàlisi directe de mostres sense cap preparació prèvia o bé amb una mínima manipulació. Aquestes tècniques són molt indicades per a l'anàlisi de substàncies en superfícies i permeten una anàlisi dels compostos en segons ja que no requereixen de separació cromatogràfica prèvia. Ara bé, per a una òptima identificació dels compostos requereixen utilitzar un espectròmetre de masses amb un analitzador de masses d'alta resolució que compensi la manca de separació prèvia. Entre les tècniques "ambient" les més emprades són la *Desorption electrospray ionization* (DESI) i el DART, tot i que aquest últim és més popular probablement degut a que és més fàcil d'utilitzar. El DESI es basa en una extracció/ionització per electrospai mentre que el DART utilitza un plasma d'àtoms d'heli metaestable generat mitjançant una descàrrega elèctrica en una cambra de *glow discharge* (efecte corona) que reaccionen amb els gasos atmosfèrics (N₂, O₂, H₂O). Aquest procés inicia un seguit de reaccions ió-molècula en fase gas que produeixen en última instància les reaccions de protonació/desprotonació o transferència de càrrega que originaran els ions dels anàlits d'estudi.

Pel què fa als tipus d'analitzadors de masses emprats en el desenvolupament d'aquesta tesi se n'han utilitzat essencialment tres, la trampa de ions (IT), el triple quadrupol (QqQ) i l'Obitrap. El primer d'ells, l'IT, és un analitzador amb capacitat per a produir la fragmentació dels ions seleccionats en el temps, estabilitzant els ions precursors a l'interior de la trampa de ions per posteriorment fragmentar-los i realitzar l'escombratge d'ions producte. Els ions que entren a l'analitzador provinents de la font d'ionització o bé els produïts per fragmentació a l'interior de la trampa d'ions són estabilitzats mitjançant un camp electromagnètic amb una trajectòria oscil·lant estable i expulsats de manera seqüencial a mesura que es va variant l'amplitud del camp de radiofreqüència aplicat. El disseny d'aquest analitzador permet realitzar múltiples etapes de selecció d'ió precursor-fragmentació sent, per tant, un analitzador molt útil per a la caracterització i elucidació estructural dels compostos ja que proporciona

informació de l'ordre genealògic dels ions producte. Els modes habituals de treball són el *Full Scan* i el *Product ions scan*, ambdós modes permeten adquirir tot l'espectre de masses en el rang de m/z seleccionat. El QqQ consta de tres quadrupols consecutius on el primer d'ells (Q1) actua com a filtre de masses permetent la selecció d'un determinat ió. El segon quadrupol (q) és pròpiament la cambra de col·lisió on es produeix la fragmentació de l'ió prèviament seleccionat al Q1 i els ions generats són finalment separats en el tercer quadrupol (Q3). A diferència de la IT, la fragmentació dels ions es produeix en l'espai i per tant només permet arribar a la segona generació d'ions producte. Els triples quadrupols treballant en mode tàndem (MS/MS) i concretament monitoritzant les transicions seleccionades, és a dir en mode *Selected Reaction Monitoring* (SRM) o *Multiple Reaction Monitoring* (MRM) permeten augmentar considerablement la sensibilitat la qual cosa explica que siguin l'analitzador i mode de treball més estesos per a l'anàlisi quantitativa. Tan la IT com el QqQ utilitzats en els mètodes desenvolupats en aquesta tesi són equips de baixa resolució. Ara bé, l'analitzador QqQ empleat utilitza quadrupols de geometria hiperbòlica que permeten treballar en unes condicions de resolució superior a la dels instruments de baixa resolució ($0.7 m/z$ *Full Width Half Maximum*, FWHM). Aquest valor es pot reduir fins a valors de m/z 0.1-0,04 FWHM mitjançant una correcta calibració dels quadrupols Q1 i/o Q3. Els modes de treball en què un dels quadrupols o ambdós treballen a resolucions superiors a $0.7 m/z$ FWHM es denominen modes *Highly Selective*, i s'abreugen amb les sigles habituals del mode de treball (SRM, SIM) precedides per una H, així es diu que es treballa en *Highly Selective selected reaction monitoring* (H-SRM) o *Highly selective single ion monitoring* (H-SIM).

Finalment, en aquesta tesi també s'ha emprat un analitzador de masses Orbitrap que és l'analitzador més nou del mercat. Fou desenvolupat per Makarov durant la dècada dels 90 i el seu llançament comercial es va produir l'any 2005 durant el congrés de l'Associació Americana d'Espectrometria de Masses (ASMS) on es va presentar el LTQ Orbitrap de Thermo Fisher Scientific. El seu funcionament es basa en la tradicional trampa d'ions millorada, formada per dos elèctrodes, un intern en forma de fus i l'altre extern que tanca la cambra generada. Mitjançant l'aplicació de camps elèctrics entre l'elèctrode intern (fus) i el l'extern (cilindre) s'aconsegueix que els ions descriguin òrbites

al voltant de l'elèctrode intern. Aquest analitzador és capaç de proporcionar poders de resolució de fins a 140.000 FWHM a m/z 200, és per tant, un analitzador d'alta resolució. En el desenvolupament d'aquesta tesi, aquest analitzador ha estat emprat en dos equips de configuracions diferents. El primer d'ells és un equip híbrid de trampa lineal combinada amb un analitzador Orbitrap (LTQ Orbitrap XL) (Article I). Aquest instrument (figura 2.1) permet realitzar experiments en MS^n gràcies a la trampa de ions lineal de que disposa i determinar les masses exactes dels ions producte generats en les diferents etapes de fragmentació gracies a l'elevada resolució de l'Orbitrap.

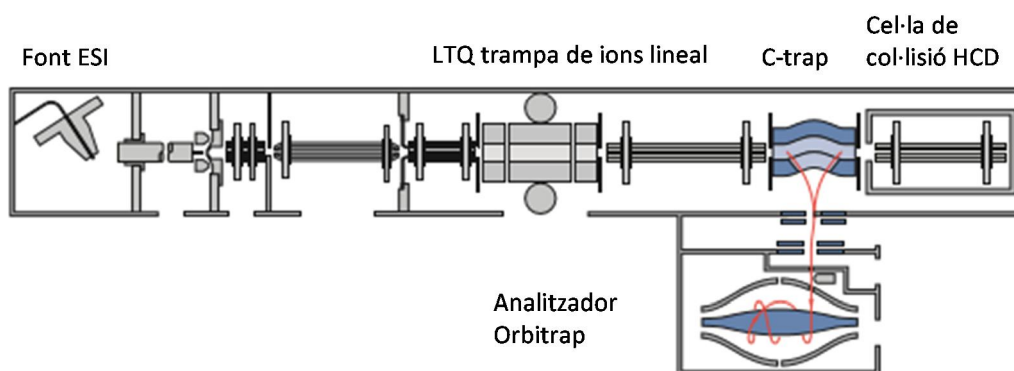


Figura 2.1. Esquema de l'instrument LTQ Orbitrap XL (Imatge de Thermo Fischer Scientific)

L'altra configuració emprada és una versió més senzilla dels equips de la sèrie Orbitrap, què només disposa d'un analitzador Orbitrap amb una cel·la de fragmentació anomenada HCD i un acumulador o focalitzador de ions denominat C-trap. L'esquema d'aquest instrument es mostra a la figura 2.2.

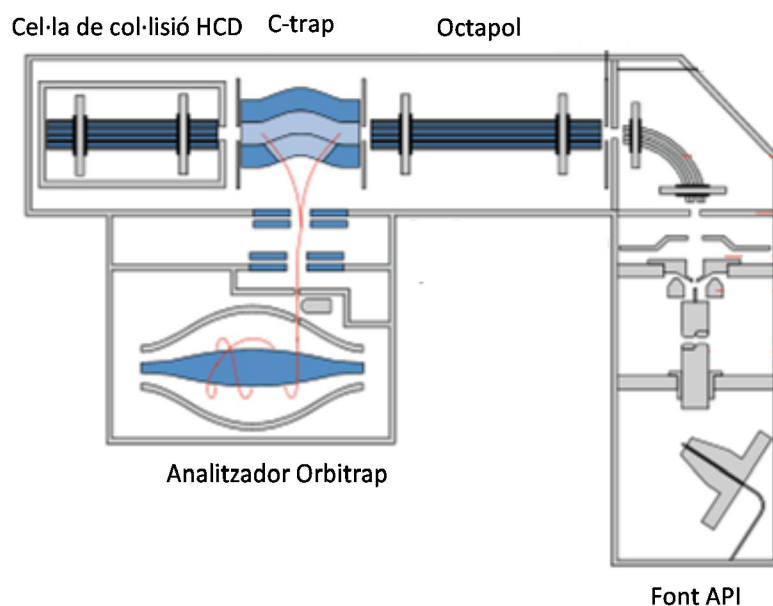


Figura 2.2. Esquema de l'instrument Orbitrap (Imatge de Thermo Fischer Scientific)

Aquest equip no permet treballar en tàndem (MS/MS) ja que no disposa de cap analitzador col·locat davant de l'orbitrap tot i que permet treballar en la modalitat *all ion fragmentation* en el qual s'aplica un potencial a la cel·la de col·lisió que fragmenta de forma no selectiva tots els ions provinents de la font d'ionització. Els ions producte generats són focalitzats en la C-trap i enviats a l'analitzador Orbitrap. Aquest és un equip que malgrat les limitacions pel que fa a la versatilitat dels modes de treball, presenta certes característiques interessants, especialment la velocitat d'escombratge, la facilitat d'ús i el poc manteniment que requereix.

2.2 Treball experimental

En aquest apartat s'inclou el treball experimental realitzat en aquesta tesi el qual s'ha basat en el desenvolupament de mètodes per a la determinació de fàrmacs antiparasitaris, coccidiostats i benzimidazoles, especialment en mostres alimentàries. L'ordre d'inclusió de les diferents publicacions en aquest apartat s'ha establert seguint majoritàriament l'ordre cronològic de publicació. El primer bloc (articles I a IV) fa referència als mètodes desenvolupats per a la determinació de compostos pertanyents al grup dels coccidiostats seguit d'un article (Article V) en el qual es desenvolupa un

mètode per a la determinació d'un elevat nombre de benzimidazoles. Finalment s'inclou un últim article (Article VI) on es planteja la determinació d'ambdós famílies de compostos (coccidiostats i benzimidazoles).

En el primer treball es desenvolupa un mètode per a la determinació de coccidiostats mitjançant LC-MS/MS. Aquest treball s'ha publicat amb el títol *Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats* a la revista *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23 (2009) 1255-1263. Aquest treball, a més de presentar un mètode de cromatografia ràpida per a l'anàlisi d'aquests compostos emprant una columna de diàmetre de partícula sub-2 μ m, aprofundeix en l'estudi dels patrons de fragmentació dels polièters ionòfors i alguns dels coccidiostats químics estudiats en el transcurs de la present tesi mitjançant l'espectrometria de masses en tàndem en múltiples etapes en un analitzador de trampa de ions amb una font d'ionització d'electrosprai.

En el treball, *Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the determination of toltrazuril and its metabolites in food*, publicat a la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397 (2010) 2893-2901, es desenvolupa un mètode per a la determinació del coccidiostat toltrazuril i els seus principals metabòlits en productes carnis. En aquest treball es presenta un estudi comparatiu de la ionització d'aquests compostos en dues fonts d'ionització com són l'ESI i l'APCI que determina de forma decisiva el posterior mètode d'anàlisi. A més, es posa de manifest l'avantatge d'augmentar la resolució per millorar la selectivitat i sensibilitat del mètode eliminant interferències. En concret l'augment de resolució s'ha aconseguit utilitzant un triple quadrupol que permet treballar en la modalitat "enhanced-resolution" ($\Delta m/z$ 0,1 FWHM).

A continuació, s'inclouen dos treballs en què es proposen mètodes per a la determinació d'ampròlium, *Analysis of amprolium by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, publicat a la revista *Journal of Liquid Chromatography A* 1217 (2010) 5802-5807 i *Field amplified sample injection-capillary zone electrophoresis for the analysis of amprolium in eggs*, publicat a la revista *Electrophoresis* 34 (2013) 870-876. En el primer d'aquests articles es proposa un mètode de determinació d'ampròlium basat en cromatografia de líquids emprant una columna HILIC acoblada a

l'espectrometria de masses en tàndem combinada amb un tractament de mostra extremadament senzill basat en una estratègia d'*extract-and-shoot*. En el segon treball es proposa un mètode d'anàlisi basat en electroforesi capil·lar de zona (CZE) combinada amb una estratègia de pre-concentració de la mostra *on-line* com és el *Field Amplified Sample Injection* (FASI). Per a l'extracció de les mostres en aquest cas, es proposa una etapa de SPE de carbó grafititzat per tal de purificar els extractes. Ambdues publicacions tracten addicionalment la problemàtica de la identificació de compostos desconeguts interferents en l'anàlisi de l'ampròlium.

L'article *Ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples* publicat a la revista *Journal of Chromatography A* 133 (2013) 119-131 proposa un mètode d'UHPLC-MS/MS per a la determinació de 19 benzimidazoles en llet. Aquest treball presenta a més un estudi exhaustiu de la ionització d'aquesta família de compostos en diferents fonts d'ionització com l'ESI, l'APCI i l'APPI i de la seva fragmentació tan en un analitzador de trampa de ions com en un de triple quadrupol.

Finalment el treball *Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food* ha estat publicat a la revista *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 27 (2013) 467-475. En aquest treball s'avalua el potencial d'una novadora font d'ionització emprada per a l'anàlisi directe com és el DART per a l'anàlisi de coccidiostats i benzimidazoles en combinació amb l'espectrometria de masses d'alta resolució emprant un equip d'analitzador Orbitrap. Per a l'anàlisi de pinsos i llet es necessari dur a terme una etapa d'extracció i clean-up de les mostres i es proposa emprar el mètode QuEChERS adaptat en cada cas al tipus d'analits d'interès.

2.2.1. ARTICLE CIENTÍFIC I

Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats.

A. Martínez-Villalba, E. Moyano, M.T. Galceran

Rapid Communications in Mass Spectrometry (2009) 23, 1255-1263

Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats

Anna Martínez-Villalba, Encarnación Moyano* and Maria T. Galceran

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Av. Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain

Received 14 January 2009; Revised 20 February 2009; Accepted 24 February 2009

Drugs that are used as medicines and also as growth promoters in veterinary care are considered as emerging environmental contaminants and in recent years concern about their potential risk to ecosystems and human health has risen. In this paper we used a method based on liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry to analyze eight coccidiostatic compounds: diclazuril, dinitrocarbanilide (the main metabolite of nicarbazin), robenidine, lasalocid, monensin, salinomycin, maduramicin and narsin. Multiple-stage mass spectrometry (MS^n) based on the precursor ions $[M+Na]^+$ (polyether ionophores), $[M+H]^+$ (robenidine) and $[M-H]^-$ (diclazuril and dinitrocarbanilide) was used to study the fragmentation of these compounds. MS^n data and genealogical relationships were used to propose a tentative assignment of the different fragment ions. Loss of water, decarboxylations, ketone β -cleavages and rearrangement of cyclic ethers and amide groups were some of the fragmentations observed for these compounds. Liquid chromatography with a sub-2 μm particle size column was coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) allowing the separation of these compounds in less than 7 min. Method detection limits ranging from 11 to 71 $ng L^{-1}$ and run-to-run values in terms of relative standard deviation (RSD) (up to 12%) were obtained. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Veterinary medicines are widely used across developed countries in order to treat animals and protect their health. Moreover, they are used as growth promoters and are also routinely added as supplements in livestock feed. Both active ingredients and their metabolites can potentially enter into the environment via different pathways.¹ For instance, in fish farming veterinary drugs are directly poured into the water. Another source is via the application of animal manure to land in agricultural practices, since manure may be contaminated due to animal excretion (urine and faeces) of veterinary products. Although the amount that is introduced into the environment is probably low, and veterinary drugs are not known to be persistent, their continuous release may lead to a relatively high long-term concentration. Due to the wide variety of veterinary medicines available, it is difficult to select those substances that should be investigated. In this context, several studies have established a prioritization approach according to their potential to reach the environment, their toxicity profile and their usage.^{2–4} Among the compounds included in this approach are the coccidiostats, a group of compounds that are used as feed additives for the prevention and treatment of coccidiosis, an infectious disease caused by protozoa of the

genus *Eimeria*, which damages the intestinal tract in poultry and livestock.⁵ Some of the most commonly used drugs against this disease are nicarbazin, diclazuril, robenidine, monensin, salinomycin, narsin, lasalocid and maduramicin, compounds that are only used in veterinary medicine.

Nicarbazin is the generic name for the complex of 4,4'-dinitrocarbanilide (DNC) and 2-hydroxy-4,6-dimethylpyrimidine (HDP) in 1:1 molar ratio. As nicarbazin depletion studies have shown that DNC is a more persistent residue than HDP, DNC is usually monitored. Diclazuril is a benzeneacetonitrile broad-spectrum anticoccidial for broiler chickens while robenidine is the only anticoccidial drug of the guanidine group. Monensin, salinomycin, narsin, lasalocid and maduramicin are ionophore antibiotics naturally produced by certain strains of *Streptomyces*. The chemical structure of these compounds is based on multiple cyclic ethers, a free carboxylic acid group at one end of the molecule and a terminal alcohol group at the other end. They are named polyether antibiotics and readily form pseudo-macrocylic complexes with alkali cations, especially sodium ions, and they have the ability to cross biological membranes, which is the basis of their biological activity⁶ (structures are shown in Fig. 1).

These compounds are usually analyzed in matrices such as animal tissues (liver, kidney and muscle), eggs, medicated feed and premixes.^{7–9} However, a few studies about their occurrence in environmental matrices have been published. Several authors have reported the measurement of polyether ionophores in surface water and sediments.^{10–13} With

*Correspondence to: E. Moyano, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Av. Diagonal 647, E-08028 Barcelona, Spain.

E-mail: encarna.moyano@ub.edu

Contract/grant sponsor: Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología; contract/grant number: CTM2006-00753/TECNO.

1256 A. Martínez-Villalba, E. Moyano and M. T. Galceran

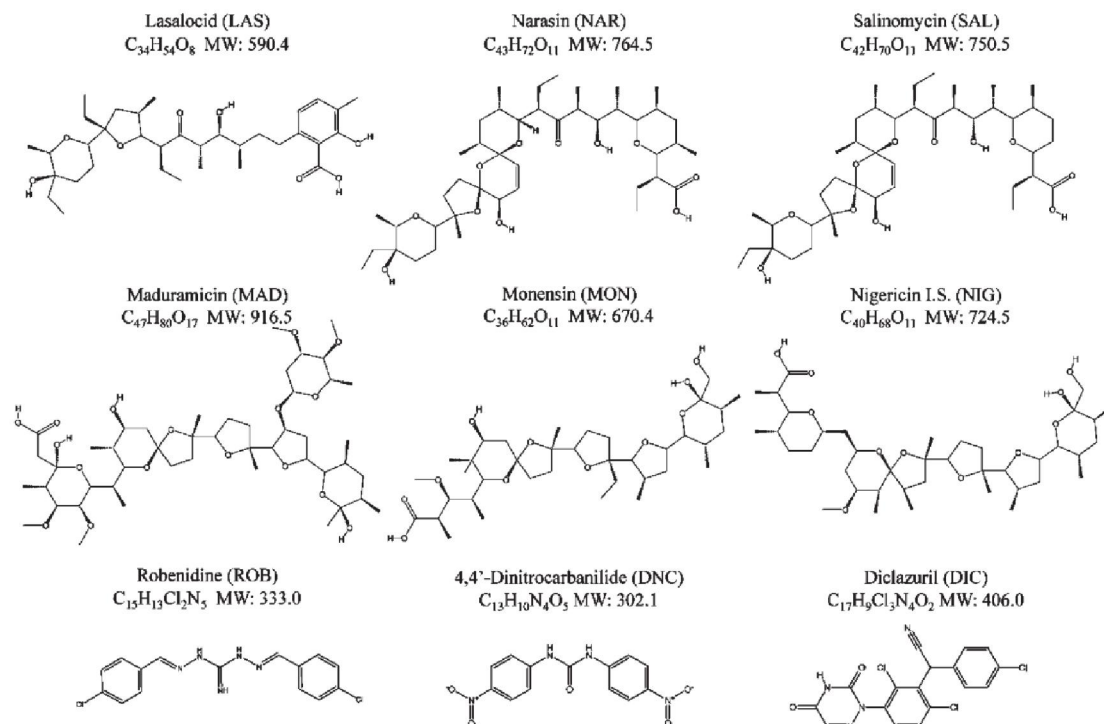


Figure 1. Structures, abbreviated names, molecular formulas and molecular weights of coccidiostats.

regards to the analytical technique used for the determination of coccidiostats, reversed-phase liquid chromatography (LC) is generally preferred. Although octadecylsilyl is the most common stationary phase generally used for all coccidiostats, polyether ionophores and chemical coccidiostats are not frequently analyzed in the same chromatographic run and only a few studies have suggested methods for their simultaneous determination. However, these methods generally have a longer analysis time and the separation obtained is worse than that achieved when analyzing only one family.¹⁴ Spectrophotometric detection, both ultraviolet (UV)^{15,16} and fluorescence,¹⁷ have traditionally been used for the determination of these compounds. However, due to the lack of chromophore groups in the chemical structures of the ionophores, a pre-column¹⁸ or post-column¹⁹ derivatization is usually necessary. Nowadays, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC/MS), especially using tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and electrospray ionization (ESI), is the technique most usually used for the analysis of these compounds.^{13,14,20–25} The chemical coccidiostats such as robenidine and polyether ionophores are usually analyzed in positive ESI mode while diclazuril and nicarbazin are generally determined in negative mode. Selected reaction monitoring (SRM) in triple quadrupole analyzers is the preferred acquisition mode probably because of its high selectivity and sensitivity. Ion traps have rarely been applied for the analysis of these compounds despite the sensitivity and the information provided for confirmatory purposes by

the product ion scan. Moreover, the multiple-stage mass spectrometry (MSⁿ) capability of the ion trap for the structural elucidation of the coccidiostat family has not been taken advantage of, since only MS/MS has been performed in this analyzer.^{10,13,23} To establish the fragmentation pathways of the protonated sodium salts of the polyethers monensin and lasalocid, both quadrupole time-of-flight (QTOF) and Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) mass analyzers were used.^{26–29} In a study about new polyether antibiotics, Kim *et al.*³⁰ examined the fragmentation patterns of nigericin (a synthetic polyether ionophore frequently used as an internal standard) and abierixin (a synthetic precursor of nigericin) by fast atom bombardment tandem mass spectrometry (FAB-MS/MS) using a magnetic sector instrument. Other authors^{10,24} have studied the interactions of polyether ionophores such as monensin, salinomycin, narasin and lasalocid with mono- and divalent alkali metal cations under ESI conditions as well as the fragmentation of ionophore/metal ion complexes under tandem mass spectrometry. No structural information has been found in the literature either for maduramicin or for chemical coccidiostats, since only the transitions monitored without any ion assignment or fragmentation mechanism are usually reported.

The main objective of this study was to develop a fast and sensitive LC/MS/MS method for the simultaneous determination of eight coccidiostats (five polyether ionophores and three chemical coccidiostats). A detailed characterization of these compounds by MSⁿ was also performed.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Monensin, narasin, salinomycin, maduramicin, robenidone and diclazuril and the internal standards nigericin and dinitrocarbanilide-*d*₈ were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) while lasalocid and nicarbazin were purchased from Dr. Ehrestorfer (Augsburg, Germany). Acetonitrile, methanol (MeOH) and water were LC/MS grade and were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). *N,N*-Dimethylformamide (DMF, >99.5%) and formic acid (98–100%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Nitrogen (99.8% purity) used for the atmospheric pressure ionization (API) source and the evaporation of the samples was supplied by a Claid nitrogen generator N₂ FLO (Lenno, Italy) and high-purity helium was purchased from Air Liquide (Madrid, Spain) and was used as a damper gas for the ion trap. Stock standard solutions (1 mg mL⁻¹) were prepared in methanol, except for maduramicin which was prepared in water, and diclazuril and nicarbazin, which were dissolved in DMF. The stock standard solutions were stored at 4°C, and 1 µg mL⁻¹ working standard solutions were prepared weekly by dilution in acetonitrile/water (1:1, v/v). Standards and samples were filtered before injection into the LC/MS system using Nylon syringe filters (0.22 µm) purchased from Tracer Tecnologías Analíticas (Madrid, Spain). Water samples were filtered before the sample treatment using glass fiber filters (0.45 µm) obtained from Whatman (Clifton, NJ, USA).

Sample extraction

Different river water samples were collected from the Barcelona area (Tenes river, Lliçà de Vall and Riera de Caldes, Palau-Solità i Plegamans). These samples were filtered, acidified with 0.1% formic acid and kept in the dark at 4°C before analysis. Aliquots of 200 mL of the filtered water sample were passed through a C₁₈ solid-phase extraction (SPE) cartridge (3 cc and 60 mg; Varian, Harbor City, USA) previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of water. Sample loading was performed at a flow rate of ~2 mL min⁻¹ and the SPE cartridge was washed with 5 mL of water and air-dried. The analytes were eluted with 5 mL of acidic MeOH (0.1% formic acid) and the extract was evaporated to dryness under a nitrogen stream. The sample was reconstituted with 900 µL of acetonitrile/water (1:1 v/v), and 50 µL of each internal standard solution (1 µg mL⁻¹) were added prior to LC/MS/MS analysis. Supelco Visiprep and Visidry SPE vacuum manifolds (Supelco, Gland, Switzerland) were used for SPE and solvent evaporation, respectively.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry

A 2695 Alliance liquid chromatograph (Waters, Milford, MA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler and a column oven was used. The chromatographic separation was performed on a Thermo Hypersil Gold C₁₈ column (50 × 2.1 mm, 1.9 µm particle size; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) protected by a javelin filter (Thermo Fisher Scientific). Column temperature was set at

Fast LC/MSⁿ of coccidiostats 1257

50°C and the flow rate was 500 µL min⁻¹. An acetonitrile/formic acid gradient was used for the chromatographic separation. Solvent A was acetonitrile with 0.1% formic acid and solvent B was 0.1% formic acid aqueous solution. The gradient started at 40% solvent A, followed by a linear gradient up to 70% solvent A in 0.75 min and an isocratic step (70% solvent A) for 5.75 min. Finally, the system was returned to the initial conditions in 3.5 min. The injection volume was 5 µL.

The LC system was coupled to an LCQ mass spectrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an electrospray ionization (ESI) source and an ion trap as the mass analyzer. Data acquisition and general operation were controlled by Xcalibur software (version 1.4; Thermo Electron, San Jose, CA, USA). Tuning experiments were performed by infusion of standard solutions of each compound (1 µg mL⁻¹) using a built-in syringe pump at a flow rate of 10 µL min⁻¹ in an LC flow of 200 µL min⁻¹ using a Valco T-piece. The positive ionization mode was used for polyether ionophores, and the negative mode was necessary to analyze diclazuril, DNC and DNC-*d*₈. The electrospray voltage was set at 4 kV when using the positive mode, while in the negative mode this voltage was set at -5 kV. The heated capillary and tube lens voltages were 21 and 5 V, respectively, in positive mode and -7 and -25 V in negative mode. The heated capillary temperature was set at 250°C. Nitrogen was used as the sheath gas and auxiliary gas at a flow rate of 86 a.u. and 24 a.u., respectively, for the positive mode and at 94 a.u. and 12 a.u. for negative mode. Helium was used as the ion trap buffer gas.

A mass range from *m/z* 50 to 1000 was used for the single MS full scan and multiple-stage mass spectrometry (MSⁿ) product ion scan. The MSⁿ parameters and the main fragment ions observed are shown in Table I. The maximum injection time used was 50 ms and only one µscan/scan was acquired. For tandem mass spectrometry (MS/MS) experiments the activation time was fixed at 30 ms and chromatograms were segmented in time in order to monitor a low number of compounds in each segment.

RESULTS AND DISCUSSION

Liquid chromatography/mass spectrometry

A reversed-phase C₁₈ sub-2 µm column was selected for the chromatographic separation of eight coccidiostats because of its high peak efficiency and the possibility of performing fast chromatography. However, high column backpressure was obtained when using mobile phases with high water content and at high flow rates. In order to avoid high pressure when working with a conventional LC system, the effect of temperature (25–50°C) on the backpressure and chromatographic separation was studied. As temperature increased the column backpressure and the analysis time decreased significantly without any significant effect on selectivity. Finally, the best separation was obtained in less than 7 min with a column temperature of 50°C and a flow rate of 500 µL min⁻¹. A fast gradient was applied to separate the three chemical coccidiostats while polyether ionophores eluted in the isocratic stage. As can be seen in Fig. 2, which shows an LC/MS chromatogram of a standard solution

Table 1. MS/MS and MS³ spectral data and working conditions. Precursor ions are highlighted in bold

Compound	MS		MS/MS				MS ³							
	<i>m/z</i> (% Ab)	Assignment	NCE (%)	AQ	<i>m/z</i> (% Ab)	Assignment	NCE (%)	AQ	<i>m/z</i> (% Ab)	Assignment				
LAS	613 (100)	[M+Na] ⁺	30	0.3	595 (100)	[M+Na-H ₂ O] ⁺	32	0.4	577 (100)	[M+Na-H ₂ O-H ₂ O] ⁺				
					577 (22)	[M+Na-2H ₂ O] ⁺			551 (15)	[M+Na-H ₂ O-COO] ⁺				
					569 (10)	[M+Na-COO] ⁺			359 (8)	[M+Na-H ₂ O-C ₁₃ H ₂₄ O ₂] ⁺				
NAR	787 (100)	[M+Na] ⁺	27	0.3	769 (100)	[M+Na-H ₂ O] ⁺	30	0.3	751 (60)	[M+Na-H ₂ O-H ₂ O] ⁺				
					743 (7)	[M+Na-COO] ⁺			733 (12)	[M+Na-H ₂ O-2H ₂ O] ⁺				
									725 (25)	[M+Na-H ₂ O-COO] ⁺				
									513 (100)	[M+Na-H ₂ O-C ₁₄ H ₂₄ O ₄] ⁺				
									431 (15)	[M+Na-H ₂ O-C ₂₀ H ₃₄ O ₄] ⁺				
									413 (35)	[M+Na-H ₂ O-C ₂₀ H ₃₆ O ₃] ⁺				
SAL	773 (100)	[M+Na] ⁺	30	0.3	755 (100)	[M+Na-H ₂ O] ⁺	32	0.3	737 (35)	[M+Na-H ₂ O-H ₂ O] ⁺				
					729 (5)	[M+Na-COO] ⁺			711 (10)	[M+Na-H ₂ O-COO] ⁺				
									693 (15)	[M+Na-H ₂ O-(H ₂ O+COO)] ⁺				
									513 (100)	[M+Na-H ₂ O-C ₁₃ H ₂₄ O ₄] ⁺				
									413 (50)	[M+Na-H ₂ O-C ₁₉ H ₃₀ O ₃] ⁺				
									513 (45)	[M+Na-C ₁₃ H ₂₂ O ₄ -H ₂ O] ⁺				
									431 (100)	[M+Na-C ₁₃ H ₂₂ O ₄ -C ₄ H ₈ O] ⁺				
									296 (40)	[M+Na-C ₁₃ H ₂₂ O ₄ -C ₁₅ H ₂₂ O ₂] ⁺				
									431 (8)	[M+Na-C ₁₉ H ₃₄ O ₃] ⁺	403 (100)	[M+Na-C ₁₉ H ₃₂ O ₃ -C ₂ H ₄] ⁺		
									675 (100)	[M+Na-H ₂ O] ⁺	30	0.3	657 (100)	[M+Na-H ₂ O-H ₂ O] ⁺
MON	693 (100)	[M+Na] ⁺	30	0.3			30	0.3	639 (12)	[M+Na-H ₂ O-2H ₂ O] ⁺				
									613 (10)	[M+Na-H ₂ O-(H ₂ O+COO)] ⁺				
									599 (15)	[M+Na-H ₂ O-C ₂ H ₄ O ₃] ⁺				
									581 (15)	[M+Na-H ₂ O-C ₂ H ₆ O ₄] ⁺				
									483 (10)	[M+Na-H ₂ O-C ₈ H ₁₆ O ₄] ⁺				
									461 (18)	[M+Na-H ₂ O-C ₁₂ H ₂₂ O ₃] ⁺				
									443 (23)	[M+Na-H ₂ O-C ₁₃ H ₂₄ O ₄] ⁺				
									921 (75)	[M+Na-H ₂ O] ⁺	23	0.3	859 (85)	[M+Na-(H ₂ O+COO)-H ₂ O] ⁺
									895 (20)	[M+Na-COO] ⁺			841 (40)	[M+Na-(H ₂ O+COO)-2H ₂ O] ⁺
									877 (100)	[M+Na-(H ₂ O+COO)] ⁺			719 (100)	[M+Na-(H ₂ O+COO)-C ₂ H ₄ O ₄] ⁺
									397 (70)	[M+Na-C ₂₉ H ₅₀ O ₃] ⁺			637 (60)	[M+Na-(H ₂ O+COO)-C ₁₃ H ₂₆ O ₄] ⁺
				591 (65)	[M+Na-(H ₂ O+COO)-C ₁₄ H ₂₂ O ₆] ⁺									
ROB	334 (100)	[M+H] ⁺	35	0.3	317 (80)	[M+H-NH ₄] ⁺	37	0.3	290 (30)	[M+H-NH ₃ -CHN] ⁺				
									288 (25)	[M+H-NH ₃ -HN ₂] ⁺				
									263 (100)	[M+H-NH ₃ -CN ₃] ⁺				
									180 (60)	[M+H-NH ₃ -C ₂ H ₄ NCl] ⁺				
									138 (35)	[M+H-NH ₃ -C ₈ H ₆ N ₃ Cl] ⁺				
									178 (95)	[M+H-C ₇ H ₆ NCl-NH ₃] ⁺				
									195 (100)	[M+H-C ₇ H ₆ NCl] ⁺	153 (100)	[M+H-C ₇ H ₆ NCl-CH ₃ N ₃] ⁺		
DNC	301 (100)	[M-H] ⁻	23	0.2	137 (100)	[M-H-C ₇ H ₄ O ₃ N ₂] ⁻	39	0.2	107 (100)	[M-H-C ₇ H ₄ O ₃ N ₂ -NO] ⁻				
DIC	405 (100)	[M-H] ⁻	37	0.5	335 (100)	[M-H-C ₂ H ₂ ON ₂] ⁻	39	0.3	299 (100)	[M-H-C ₂ H ₂ ON ₂ -HCl] ⁻				
					334 (40)	[M-H-C ₂ HO ₂ N] ⁻								

NCE: normalized collision energy; AQ: activation Q.

(250 µg L⁻¹), the eight coccidiostats were separated and only lasalocid and monensin coeluted. Nevertheless, molecular weight differences between these compounds permitted their individual quantification since no ion suppression was observed.

Under these chromatographic conditions the LC system was coupled to a mass spectrometer using ESI as the ionization source in both positive and negative modes. The polyether ionophore family showed a good response in positive ESI providing a full scan mass spectra dominated by sodium adducts [M+Na]⁺ (Table 1). However, other metal adduct ions can be formed if other alkali metal or ammonium

ions are present in the LC/MS system. It must be pointed out that ammonium adducts [M+NH₄]⁺ dominated the mass spectra even at very low levels of ammonium. However, these adduct ions could not be used in MS/MS experiments because their high lability prevented their isolation in the ion trap. Only maduramicin showed ion source fragmentation, giving a fragment at *m/z* 877. Among the chemical coccidiostats only robenidine was ionized in positive mode, showing as the main ion the protonated molecule without additional fragments or adducts. Dinitrocarbanilide and diclazuril were ionized in negative ESI and the mass spectra were dominated by the deprotonated molecule. For dicla-

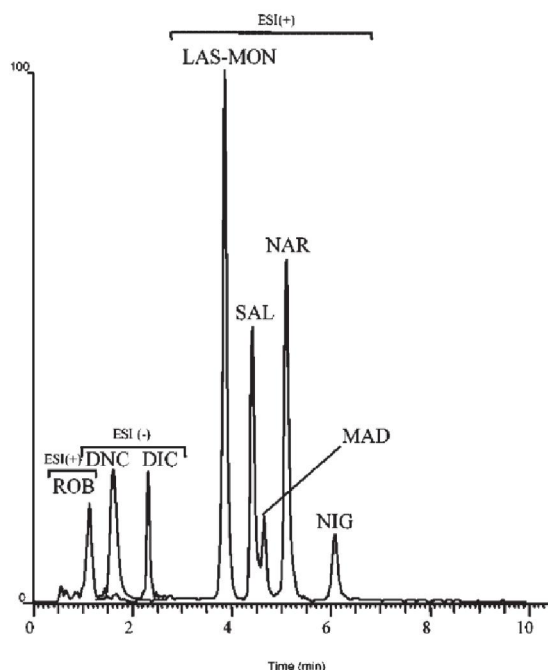


Figure 2. LC/MS chromatogram of a standard solution ($250 \mu\text{g L}^{-1}$) of eight coccidiostats (nigericin as internal standard).

zuril, which contains three chlorine atoms, a typical pattern of the molecular cluster was also observed. MSⁿ was used to study the fragmentation of these compounds and to select the most characteristic and sensitive transitions to be used for quantitation. Table 1 summarizes the mass spectral data obtained up to MS³, which included the most significant ions. Sodium adduct ions were used as precursor ions for MS/MS experiments of polyether ionophores. Tandem mass spectra of these ions generally showed the expected loss of water $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$ as base peak.^{24,26,27} In addition, those polyether ionophores that contain a ketone group, such as lasalocid, salinomycin and narasin, yielded product ions due to β -cleavage reactions in both alkyl chain sides, carboxyl and hydroxyl moieties explaining ions at m/z 531 (salinomycin and narasin) and m/z 377 (lasalocid) on the carboxyl side and m/z 431 (salinomycin and narasin) on the hydroxyl side. As an example, the possible mechanism for the formation of fragment ions on the hydroxyl side of salinomycin starts, as previously described by Lopes *et al.*²⁷ for lasalocid acid, by the cation inducing an electron density increase in the

Table 2. Accurate mass measurement data for maduramicin and monensin

Ion assignment	Calculated mass (Da)	Accurate mass (Da)	Error (ppm)
Maduramicin			
$[\text{M}+\text{Na}-(\text{H}_2\text{O}+\text{COO})]^+$	877.5284	877.5272	-1.4
$[\text{M}+\text{Na}-(\text{CH}_3\text{O})_2]^+$	877.4920	877.5272	+40.1
$[\text{M}+\text{Na}-(\text{COO})]^+$	895.5389	895.5375	-1.6
Monensin			
$[\text{M}+\text{Na}-(\text{H}_2\text{O}+\text{COO})]^+$	613.4075	613.4045	-4.9
$[\text{M}+\text{Na}-(\text{CH}_3\text{O})_2]^+$	613.3711	613.4045	+54.4

LTQ Orbitrap XL; resolving power: 60000; NCE: 27; AQ: 0.3.

carbonyl oxygen followed by a gas-phase β -elimination (Fig. 3). These ions had a relatively low abundance (<35%) in the MS/MS spectra, although they were the main ions in MS³. For instance, the base peak in the 3rd generation product ion scan mass spectra of salinomycin and narasin (precursor ion $[\text{M}+\text{Na}-\text{H}_2\text{O}]^+$) was the carboxyl moiety β -cleavage ion (m/z 513).

For maduramicin, that does not contain any ketone group, the base peak of the MS/MS spectrum (Table 1) is the ion at m/z 877 which can be explained by the loss of two methoxy groups or the simultaneous loss of CO₂ and H₂O. For the correct assignment of this ion the accurate mass spectrum of maduramicin was obtained using an LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). The data obtained are given in Table 2 where it can be seen that the simultaneous loss of CO₂ and H₂O with an error of 1.4 ppm is the most plausible assignment. The cyclic conformation of the sodium complexes of the polyether ionophores^{31,32} can allow hydrogen-bond interactions between the carboxylic group and the terminal hydroxyl, making the double neutral simultaneous loss possible. The pseudomacrocylic structure of monensin is given in Fig. 4 as an example. Furthermore, maduramicin gave an intense product ion at m/z 397 that can probably be explained by the fragmentation of the pentacyclic ether at the quaternary carbon between the two ether groups and other product ions originated from the loss of water and the carboxyl group (Table 1).

For monensin only the loss of H₂O (m/z 675) was observed in MS/MS without any further fragmentation (Fig. 4), as is reported in the literature.^{24,26,27} The second neutral loss of water was the base peak in the MS³ spectrum of this compound and ions resulting from other neutral losses were also observed (Table 1). The simultaneous loss of H₂O and CO₂ (62 Da) also occurred for monensin (m/z 613) in the 3rd generation product ion spectrum. This

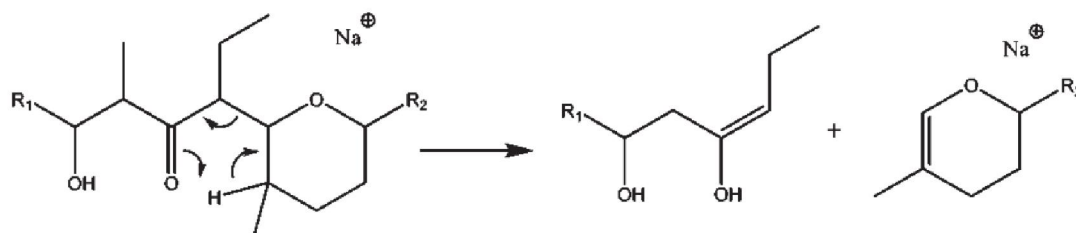


Figure 3. Reaction mechanism of the β -cleavage of salinomycin.

1260 A. Martínez-Villalba, E. Moyano and M. T. Galceran

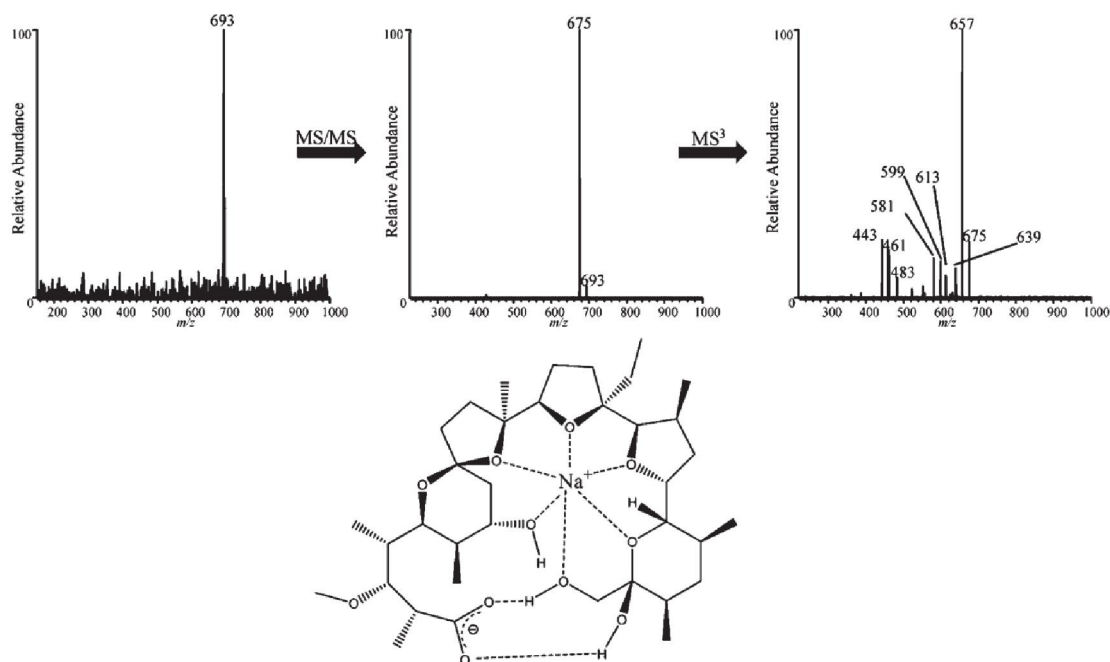


Figure 4. MS, MS/MS and MS³ spectra of monensin. Pseudomacrocyclic structure of monensin.

fragmentation has also been confirmed using the Orbitrap providing an error of 4.9 ppm (Table 2). Other ions such as m/z 483 and 461 reported by Lopes *et al.*²⁶ were also observed in the spectrum.

Other product ions present in the MSⁿ spectra of polyether ionophores were characteristic ions originated from the carboxylic group. For lasalocid, the ortho effect of the hydroxyl and carboxylic groups on the aromatic ring favoured the loss of CO₂ or H₂O in MS/MS. Rearrangements of the cyclic ethers also occurred in the MS³ stage providing product ions with relative abundances lower than 50%; for instance the ion at m/z 296 (40%) for salinomycin and at m/z 265 (15%) for narasin (Table 1) can be assigned via this fragmentation mechanism.

As nigericin was used as an internal standard for quantitation purposes its fragmentation was also studied. The base peak in the full scan mass spectrum was the ion at m/z 747, which corresponds to the sodium adduct as with all the ionophores, while the MS/MS spectrum was dominated

by the loss of water in addition to a fragment at m/z 703 with very low relative abundance (5%) that corresponds to the loss of CO₂.

The chemical coccidiostats did not follow a common fragmentation pattern due to their evident differences in chemical structure. In the product ion spectrum only two main product ions were observed, the ion at m/z 317 arising from the loss of NH₃ and the ion at m/z 195, probably arising from the cleavage of the N–N bond. The loss of NH₃ was also observed in MS³ spectra of m/z 195 in addition to the loss of the imine-amino group (CH₂N₂). In the MS³ stage of m/z 317 the product ion at m/z 263 dominated the spectrum and probably came from the loss of CN₃. In addition other 3rd generation product ions such as those coming from the cleavage of the N–N bond (m/z 180 and 138) and those at m/z 290 and 288 arising from the loss of nitrogen-containing fragments were also observed.

Tandem mass spectrometry of negative ions was performed to study dinitrocarbanilide and diclazuril. When

Table 3. Instrumental limits of detection (LOD), method limits of detection (MLOD) and method quality parameters

Analyte	Instrumental LOD (pg injected)	MLOD (ng L ⁻¹)	Recovery %		Relative error (%)	Run-to-run precision %
			250 ng L ⁻¹	50 ng L ⁻¹		
Salinomycin	10	11	93	90	3	5.8
Narasin	15	18	90	90	3	6.5
Lasalocid	20	23	87	85	4	6.7
Monensin	15	17	90	92	3	5.2
Maduramicin	25	31	85	80	5	8.7
Robenidine	30	50	60	60	8	12.1
Diclazuril	60	71	85	85	6	7.4
Dinitrocarbanilide	50	56	93	90	5	9.3

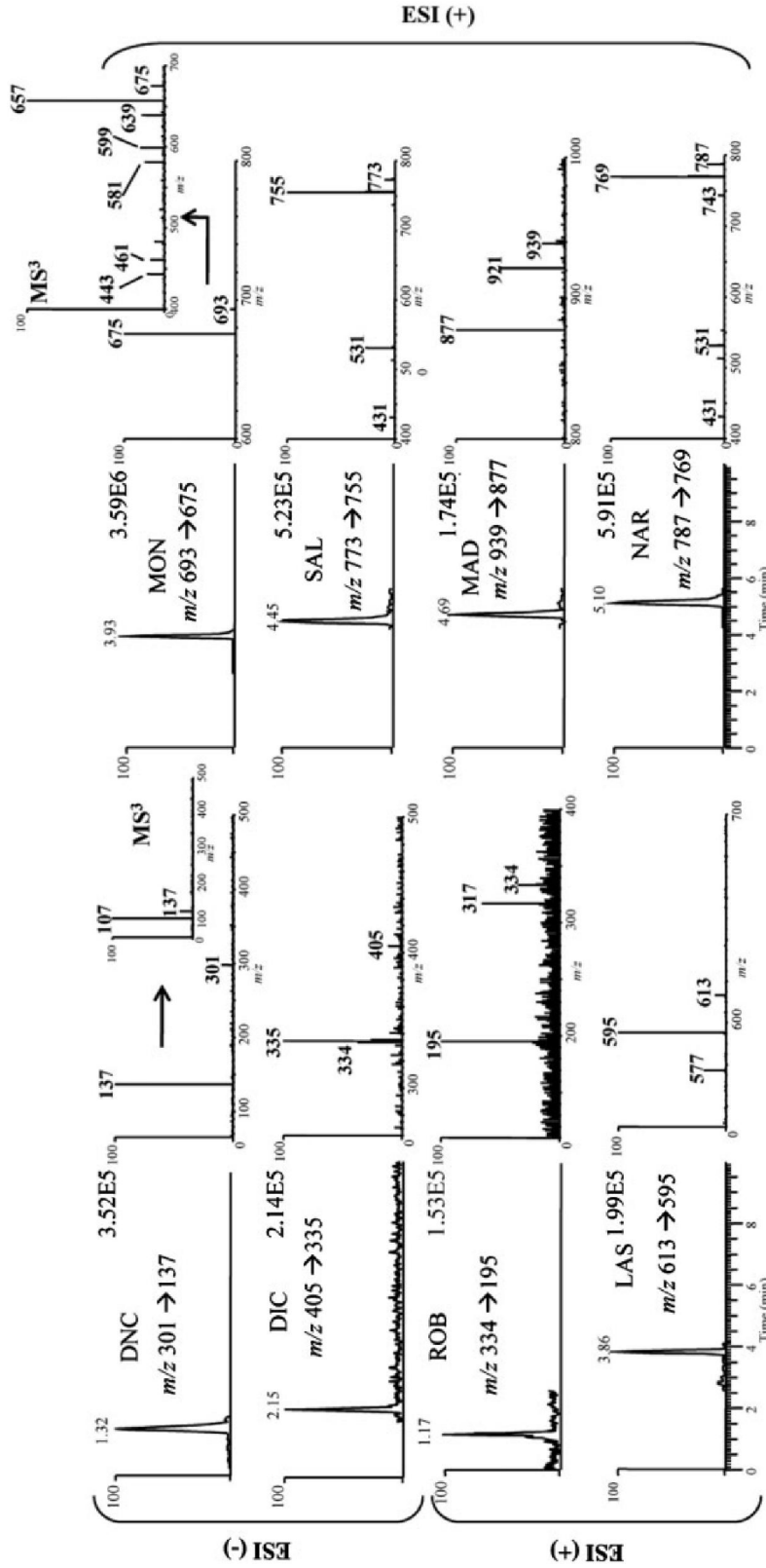


Figure 5. LC/MS/MS chromatograms of a spiked river water (250 ng L⁻¹).

1262 A. Martínez-Villalba, E. Moyano and M. T. Galceran

fragmenting $[M-H]^-$, only one product ion was generated for dinitrocarbanilide while diclazuril showed two fragments that were shifted in mass by just 1 Da. Dinitrocarbanilide provided a product ion at m/z 137 due to the cleavage of the amide bond while for diclazuril two product ions were observed, derived from the cleavage of the triazine group arising from the loss of a fragment containing two nitrogen atoms or just one nitrogen atom, respectively. In addition, when performing MS^3 only one product ion was generated for both compounds, the radical loss of NO^\cdot (m/z 107) for dinitrocarbanilide and the loss of hydrochloric acid for diclazuril.

The most abundant ions of the MS/MS spectra were selected for quantitation purposes in the $LC/MS/MS$ method. Under these conditions, instrumental quality parameters such as limit of detection (LOD), injection reproducibility and linearity range were evaluated. LODs based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 3:1 were estimated by analyzing standard solutions at low concentrations; the values obtained in picograms injected are given in Table 3. The lowest limits of detection (down to 10 pg) were obtained for the compounds ionized in positive mode, whereas the method was less sensitive in negative mode. The $LC/MS/MS$ response was linear ($r^2 \geq 0.999$) in the working range (10–500 $\mu\text{g L}^{-1}$). Reproducibility based on concentration was evaluated using relative standard deviations (RSD %) ranging from 2 to 8%.

Application to water analysis

In order to demonstrate the applicability of the developed $LC/MS/MS$ method, the eight coccidiostats were analyzed in river water samples. Two river water samples free of coccidiostats were collected and preserved by adding 0.1% formic acid (pH 2.5), and thereby the polyether ionophores were found in their neutral species. These samples were used to test ion suppression effects on the electrospray response due to matrix components. These samples were submitted to the sample treatment detailed in the Experimental section and after proving that they were free of coccidiostats the SPE extracts were spiked at 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ and analyzed by $LC/MS/MS$. No significant differences were observed between the signal of the spiked extracts and those for standard solutions at the same concentration, indicating that signal ion suppression due to the matrix effect was not significant and that external calibration can be used to quantify these compounds in water samples. In order to estimate method recoveries blank samples were spiked with different concentrations (250 and 50 ng L^{-1}) and analyzed. The recovery values obtained ranged from 85 to 90% for all compounds except for robenidine, which showed a lower recovery value (60%) probably due to poor retention on the SPE cartridge and a lower breakthrough value as a result of the protonation of the amino group at the working pH (water sample acidified with 0.1% formic acid). The method limit of detection (MLOD) was estimated by analyzing blank river water samples spiked with coccidiostats at low concentrations (up to 20 ng L^{-1}). The MLODs calculated based on a S/N ratio of 3 were between 11 and 71 ng L^{-1} (Table 3). As with the instrumental limits of detection, the highest values

were those for diclazuril and dinitrocarbanilide. However, robenidine showed a relatively high MLOD (50 ng L^{-1}), which may be a consequence of the low recovery obtained by the SPE procedure.

With regards the confirmation of the identity of the compounds, a minimum of three identification points is usually required for unequivocal identification. According to this, when working in tandem mass spectrometry, at least two product ions from the same precursor ion are needed for confirmation. However, as discussed above, dinitrocarbanilide and monensin only provided one abundant product ion in MS/MS . To solve this problem MS^3 was used to confirm the presence of these compounds in samples.

Since coccidiostats were not detected in the river water samples, one water sample was spiked at a concentration of 250 ng L^{-1} and bias and run-to-run precision were evaluated (Table 3). As can be seen, the method performed well; precision was <12% and relative errors lower than 20 ng L^{-1} were obtained. Figure 5 shows the chromatogram obtained for this sample and the MS^3 product ion spectra for the identification of monensin and dinitrocarbanilide.

CONCLUSIONS

In this study a fast $LC/MS/MS$ method using a sub-2 μm particle size column was developed for the determination of eight coccidiostats in water samples. Positive electrospray ionization (ESI) was used for the analysis of polyether ionophores and robenidine, whereas negative ESI was mandatory to analyze dinitrocarbanilide and diclazuril. Multiple-stage mass spectrometry in an ion trap mass analyzer was applied for the first time, allowing assignment of the fragment ions obtained for the coccidiostats studied here. Polyether ionophores generally showed the consecutive loss of H_2O as the most common but least selective cleavage, while the fragmentation of narasin, salinomycin and lasalocid, which contain a carbonyl group in their structure, showed the characteristic ketone β -cleavage. When no carbonyl was present in the structure, rearrangements of the cyclic ethers were the most usual. For the chemical coccidiostats the main cleavages were those that concern the heteroatom bonds of the molecule. MS^3 was required for confirmatory purposes when only one product ion was obtained in MS/MS . The good performance of the method makes its use to determine coccidiostat residues at low ppb levels in environmental water samples feasible.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología under the project CTM2006-00753/TECNO and the technical support from José Antonio Allué from CIBIR Research Center (Logroño, Spain) for the accurate mass measurements with the Orbitrap. Anna Martínez Villalba wishes to thank the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología for an FPI grant.

REFERENCES

1. Sharman AK, Meyer MT, Boxall ABA. *Chemosphere* 2006; **65**: 725.
2. Boxall ABA, Kolpin DW, Sorensen BH, Tolls J. *Environ. Sci. Technol.* 2003; **37**: 286.
3. Boxall ABA, Fogg LA, Kay P, Blackwell PA, Pemberton EJ, Croxford A. *Toxicol. Lett.* 2003; **142**: 207.
4. Capleton AC, Courage C, Rumsby P, Holmes P, Stutt E, Boxall ABA, Levy LS. *Toxicol. Lett.* 2006; **163**: 213.
5. Matabudul DK, Conway B, Lumley I, Sumar S. *Food Chem.* 2001; **75**: 345.
6. Matabudul DK, Lumley ID, Points JS. *Analyst* 2002; **127**: 760.
7. Blanchflower WJ, Kennedy DG. *J. Chromatogr. B* 1996; **675**: 225.
8. Dowling G, O'Keeffe M, Smyth MR. *Anal. Chim. Acta* 2005; **539**: 31.
9. Cannavan A, Ball G, Kennedy DG. *Analyst* 1999; **124**: 1431.
10. Cha JM, Yang S, Carlson KH. *J. Chromatogr. A* 2005; **1065**: 187.
11. Hao C, Lissimore L, Nguyen B, Kleywegt S, Yang P, Solomon K. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; **384**: 505.
12. Kim SC, Carlson K. *Trends Anal. Chem.* 2005; **24**: 635.
13. Kim SC, Carlson K. *Water Res.* 2006; **40**: 2549.
14. Dubois M, Pierret G, Delahayt P. *J. Chromatogr. B* 2004; **813**: 181.
15. Blazsek M, Surovcova A. *J. Pharm. Biomed. Life Sci.* 2003; **31**: 291.
16. Capurro E, Danaher M, Anastasio A, Cortesi ML, O'Keeffe M. *J. Chromatogr. B* 2005; **822**: 154.
17. Cohen H, Armstrong F, Campbell H. *J. Chromatogr. A* 1995; **694**: 407.
18. Dusi G, Gamba V. *J. Chromatogr. A* 1999; **835**: 243.
19. Blazsek M, Kubis M. *J. Pharm. Biomed. Life Sci.* 2005; **39**: 564.
20. Harris JA, Russell CAL, Wilkins JPG. *Analyst* 1998; **123**: 2625.
21. Hormazabal V, Yndestad M, Ostensvik O. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2002; **25**: 2655.
22. Hormazabal V, Ostensvik O, Kaldhusdal M. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 2005; **28**: 2769.
23. Heller DN, Nochetto CB. *J. Agric. Food Chem.* 2004; **52**: 6848.
24. Volmer DA, Lock CM. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1998; **12**: 157.
25. Song W, Huang M, Rumbeih W, Li H. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007; **21**: 1944.
26. Lopes NP, Stark CB, Hong H, Gates PJ, Staunton J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2002; **16**: 414.
27. Lopes NP, Gates PJ, Wilkins JPG, Staunton J. *Analyst* 2002; **127**: 1224.
28. Lopes NP, Stark CBW, Staunton J, Gates PJ. *Org. Biomol. Chem.* 2004; **2**: 358.
29. Miao XS, March RE, Metcalfe CD. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; **17**: 149.
30. Kim YH, Yoo JS, Lee CH, Goo YM, Kim MS. *J. Mass Spectrom.* 1996; **31**: 855.
31. Martinek T, Riddell FG, Wilson C, Weller CTJ. *Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 2002; 35.
32. Paz FAA, Gates PJ, Fowler S, Gallimore A, Harvey B, Lopes NP, Stark CBW, Staunton J, Klinowski J, Spencer JB. *Acta Crystallogr.* 2003; **E59**: m1050.

2.2.2. ARTICLE CIENTÍFIC II

Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the determination of toltrazuril and its metabolites in food

A. Martínez-Villalba, E. Moyano, C.P.B. Martins, M.T. Galceran
Analytical and Bioanalytical Chemistry (2010) 397, 2893-2901

Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the determination of toltrazuril and its metabolites in food

Anna Martínez-Villalba · Encarnación Moyano ·
Claudia P. B. Martins · Maria Teresa Galceran

Received: 22 January 2010 / Revised: 9 March 2010 / Accepted: 29 March 2010 / Published online: 23 April 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract In this work a fast liquid chromatography (LC)–tandem mass spectrometry (MS/MS) method was developed for the analysis of toltrazuril, a coccidiostatic drug, and its metabolites in meat food products. The applicability of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and heated electrospray ionization in both positive and negative modes was studied. APCI in negative mode provided the best results and the base peak originated from the loss of CF_3 (toltrazuril and toltrazuril sulfone) and CHF_3 (toltrazuril sulfoxide) was used as the precursor ion in MS/MS. A fast LC separation on a C_{18} Fused-Core™ column was used together with the APCI-MS/MS method developed using enhanced mass resolution mode (highly selective selected reaction monitoring, H-SRM) to improve the sensitivity and selectivity for the analysis of these compounds in food samples. A simple sample treatment based on an extraction with acetonitrile and a cleanup with a C_{18} cartridge was used. The LC-MS/MS (H-SRM) method showed good precision (relative standard deviation lower than 10%), accuracy, and linearity and allowed the determination of these compounds in food samples down to the parts per billion level (limits of detection between 0.5 and 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Keywords Mass spectrometry · Liquid chromatography · Coccidiostats

A. Martínez-Villalba · E. Moyano · M. T. Galceran (✉)
Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona,
Martí i Franqués 1–11,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: mtgalceran@ub.edu

C. P. B. Martins
Thermo Scientific,
Acer 30–32,
08038 Barcelona, Spain

Introduction

Toltrazuril is a triazinetrione derivative used in the treatment and prevention of coccidiosis in poultry and swine that is commonly administered via drinking water at concentrations ranging from 25 to 75 mg L^{-1} . Although toltrazuril is excreted mainly via feces, its depletion is relatively slow and up to 10 days after the withdrawal period, relatively high concentrations of the drug can still be found in animal tissues [1]. Moreover, this compound is metabolized through gradual sulfoxidation to its sulfoxide and sulfone metabolites (Fig. 1), providing derivative compounds that can also be found in animal tissues and excrement. In recent years interest in these compounds in the environment has risen because if manure is spread onto the land, the active ingredient and the metabolites can be released to the groundwater because of leaching, seriously polluting rivers and drinking water supplies. According to some authors, toltrazuril has a high toxicity profile, which turns this drug into a candidate for high-priority risk assessment lists [2–4]. Additionally, concern about food safety has grown in recent years since drug and metabolite residues may be found in consumption products, leading to the appearance of resistant strains and allergic reactions in sensitive people. For this reason toltrazuril has been included in European legislation [5] and maximum residue limits (MRLs), depending on the animal tissue, have been established (100–600 $\mu\text{g kg}^{-1}$). These MRLs will probably be more restrictive in the near future since the use of coccidiostats as feed additives will be banned after 31 December 2012. Toltrazuril sulfone also has pharmacological activity and it is used as the marker residue for toltrazuril in food products. Moreover, the Food and Drug Administration recently approved its use for the treatment of equine protozoal myeloencephalitis [1], so its

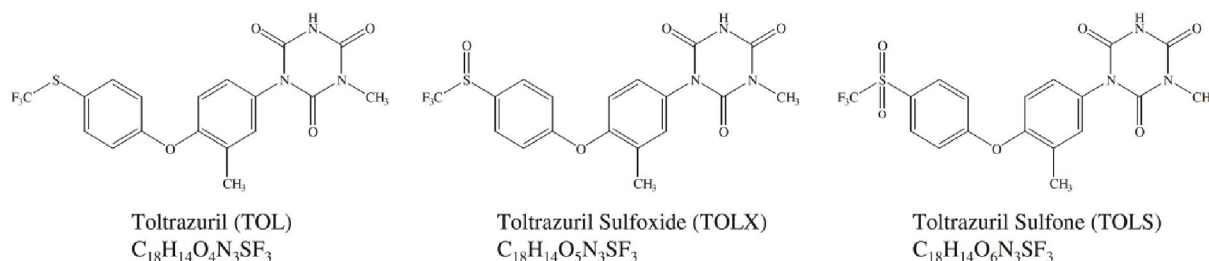


Fig. 1 Chemical structures, acronyms, and molecular formulas of toltrazuril and its metabolites

monitoring is also compulsory. Hence, a reliable, selective, and sensitive analytical method is required for the analysis of these compounds at very low concentrations in both environmental and food samples.

Nowadays, liquid chromatography (LC) coupled with unit mass resolution tandem mass spectrometry (MS/MS) using triple quadrupoles and ion traps is the technique of choice for the analysis of drug residues in animal-derived food products [6–8]. Very few methods have been described in the literature for the LC-MS analysis of toltrazuril and most of them used mass spectrometry (MS), operating in unit mass resolution mode, as a detection technique without any characterization studies [9–12]. Single full-scan MS is used by some authors for pharmacokinetic studies [9], whereas for the determination of toltrazuril and its metabolites MS/MS is recommended to fulfill the requirements of the legislation in terms of quantitative and confirmatory analysis, which requires at least three identification points for compounds belonging to group B (veterinary drugs and contaminants) [13]. Both atmospheric pressure chemical ionization (APCI) [12] and electrospray ionization (ESI) [9–11] in both positive and negative mode have been used as ionization techniques. Negative ESI has only been combined with MS, whereas both ionization sources and ionization modes have been used with MS/MS. Mulder et al. [11] combined positive ESI with MS/MS using the protonated molecule as the precursor ion, whereas Li et al. [12] selected negative APCI after reporting some problems with the fragmentation of the deprotonated molecules in negative ESI. For chromatographic separation all the authors used conventional C_{18} reversed-phase columns, with the exception of Li et al. [12], who employed a phenyl column for the development of a multiresidue method for veterinary drugs. However, none of these methods analyzed toltrazuril and its two metabolites simultaneously and the run times were always over 8 min.

Following the latest trends in LC for faster separations and high chromatographic and mass resolution, in the work reported here we aimed to develop a fast, sensitive, and selective method for the determination of toltrazuril and its metabolites in food after a simple sample treatment procedure. For this purpose a rapid and highly efficient LC separation (a C_{18} Fused-Core™ 2.7 μ m particle size

column) was coupled to a MS/MS system working in enhanced mass resolution mode (highly selective selected reaction monitoring, H-SRM).

Experimental

Chemicals and materials

Toltrazuril (99.8%), toltrazuril sulfone (98%), toltrazuril sulfoxide (99%), diclazuril (99.8%), dinitrocarbanilide- d_8 (99%), and ethopabate (99.8%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Toltrazuril- d_3 (99%) was obtained from Witega Laboratorien Berlin-Adleshof (Berlin, Germany) and was used as an internal standard. Methanol, acetonitrile, and water of LC-MS grade were purchased from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and formic acid (98–100%) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions (1 mg mL⁻¹) were prepared in methanol and stored at 4°C, whereas 1 μ g mL⁻¹ working standard solutions were prepared weekly by dilution in methanol/water (1:1). Standards and samples were filtered before injection into the LC-MS system using nylon syringe filters (0.22 μ m) purchased from Tracer Tecnologías Analíticas (Madrid, Spain)

Nitrogen (99.8% pure) supplied by a Claind N₂ FLO nitrogen generator (Lenno, Italy) was used for the atmospheric pressure ionization (API) source. High-purity argon (Ar₁) and helium from Air Liquide (Madrid, Spain) were used as a collision-induced-dissociation gas in the triple quadrupole and as a damper gas for the ion trap, respectively.

Instrumental

An Accela liquid chromatograph (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler, and a column oven was used. The chromatographic separation was performed on a Fused-Core™ Ascentis Express C_{18} column (150 mm × 2.1-mm inner diameter, 2.7- μ m particle size) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). For the chromatographic separation, gradient

elution with methanol/water as the mobile phase was used. The gradient started at 60% methanol, followed by a linear gradient up to 100% methanol in 0.9 min and an isocratic step for 1.2 min. Finally, the system was returned to the initial conditions in 2.1 min. The flow rate was set at 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, the column temperature was 40°C, and the sample volume injected was 10 μL .

The LC system was coupled to a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer equipped with heated ESI (HESI) and APCI as ionization sources and a triple quadrupole as an analyzer. Data acquisition was performed with MS/MS using H-SRM mode [quadrupole 1 (Q1) 0.1 Th full width at half maximum (FWHM) and quadrupole 3 (Q3) 0.7 Th FWHM]. Argon was used as a collision gas at 1.5 mTorr and the optimum collision energy for each transition was selected. Two transitions for each compound were monitored for quantitative and confirmatory purposes. Table 1 shows the selected reaction monitoring (SRM) transitions and the correspondent collision energies. In accurate mass mode the selected lock masses were m/z 404.9720 (diclazuril), m/z 309.1080 (dinitrocarbanilide- d_8), m/z 236.0930 (ethopabate), or m/z 91.0037 (formic dimer). A low collision energy (5 eV) was applied to these compounds to avoid their fragmentation in quadrupole 2 and to monitor the deprotonated molecules. Xcalibur version 2.0 (Thermo Fisher Scientific) was used to control the LC-MS system and to process data.

For fragmentation studies, a Classic LCQ instrument (Thermo Finnigan) equipped with an ion trap mass analyzer and an APCI source was used. Product ion spectra from multistage MS (MS^n) experiments were acquired (m/z 50–500) in profile mode. For MS/MS experiments an isolation width of 1.5 m/z was required to obtain the maximum trapping efficiency and three microscans per scan were acquired. The maximum injection time and activation time used were 20 and 30 ms, respectively. The trapping radio-frequency voltage was set at 0.3 and the normalized collision energy was 20% for MS/MS and 35% for MS^3 .

Sample treatment

Meat product samples were purchased at different local supermarkets and fast food restaurants in Barcelona (Spain). Samples were homogenized using an Ultraturrax T25 basic (IKA-Werke, Staufen, Germany) and stored at -18°C until

analysis. Subsamples of 0.5 g were weighted into 2-mL Eppendorf tubes and spiked with the internal standard (toltrazuril- d_3) at a concentration of 25 ng g^{-1} ; afterwards the samples were extracted with 1.5 mL of acetonitrile with sonication (Sonorex RK100 ultrasonic bath; Bandelin Electronic, Berlin, Germany) for 15 min. After that, the extracts were centrifuged at 4,000 rpm for 5 min using a Selecta Centronic centrifuge (Selecta, Barcelona, Spain) and 1 mL of the supernatant liquid was transferred into a 15-mL Falcon tube containing 9 mL of water. For cleanup purposes, Bond Elute C_{18} , 500 mg (Varian, Harbor City, USA), cartridges were conditioned with 3 mL of methanol followed by 3 mL of acetonitrile/water (10:90) using a Supelco Visiprep vacuum manifold (Supelco, Gland, Switzerland). The extract was loaded onto a solid phase extraction (SPE) cartridge previously conditioned with 3 mL of water and the analytes were finally eluted with 1 mL of methanol. The sample was evaporated to dryness and reconstituted in 300 μL of methanol/water (1:1). This treatment allows 12 samples to be processed in 1 h. Each extract was filtered through 0.22- μm pore size Ultrafree-MC centrifugal filters (Millipore, Bedford, USA) before injection into the LC-MS/MS system.

Results and discussion

Mass spectrometry

In this work two API sources, HESI and APCI, were evaluated for the analysis of toltrazuril and its metabolites (toltrazuril sulfone and toltrazuril sulfoxide). As expected, when working with the HESI probe in negative mode, the three compounds yielded the deprotonated molecule ($[M-H]^-$) as the only observable ion in the full-scan mass spectrum (Fig. 2a), whereas the protonated molecule was the only ion observed when the polarity was switched to positive ($[M+H]^+$). When positive APCI was used, the same spectrum as obtained with positive HESI was observed; however, in negative mode the base peak of the spectrum was the ion $[M-69]^-$ (m/z 356.1 for toltrazuril and m/z 388.1 for toltrazuril sulfone), probably generated by an in-source fragmentation process that resulted in the loss of CF_3 . Additionally, the deprotonated molecule was observed at a relative abundance lower than 25%. Toltrazuril

Table 1 Selected reaction monitoring (SRM) transitions and optimum collision energy

	Quantification	Collision energy (eV)	Confirmation	Collision energy (eV)
Toltrazuril	356.1→256.0	20	356.1→129.9	39
Toltrazuril sulfoxide	371.1→371.1	10	371.1→271.0	34
Toltrazuril sulfone	388.1→288.0	19	388.1→248.0	29
Toltrazuril - d_3	359.1→256.0	20	359.1→123.9	39

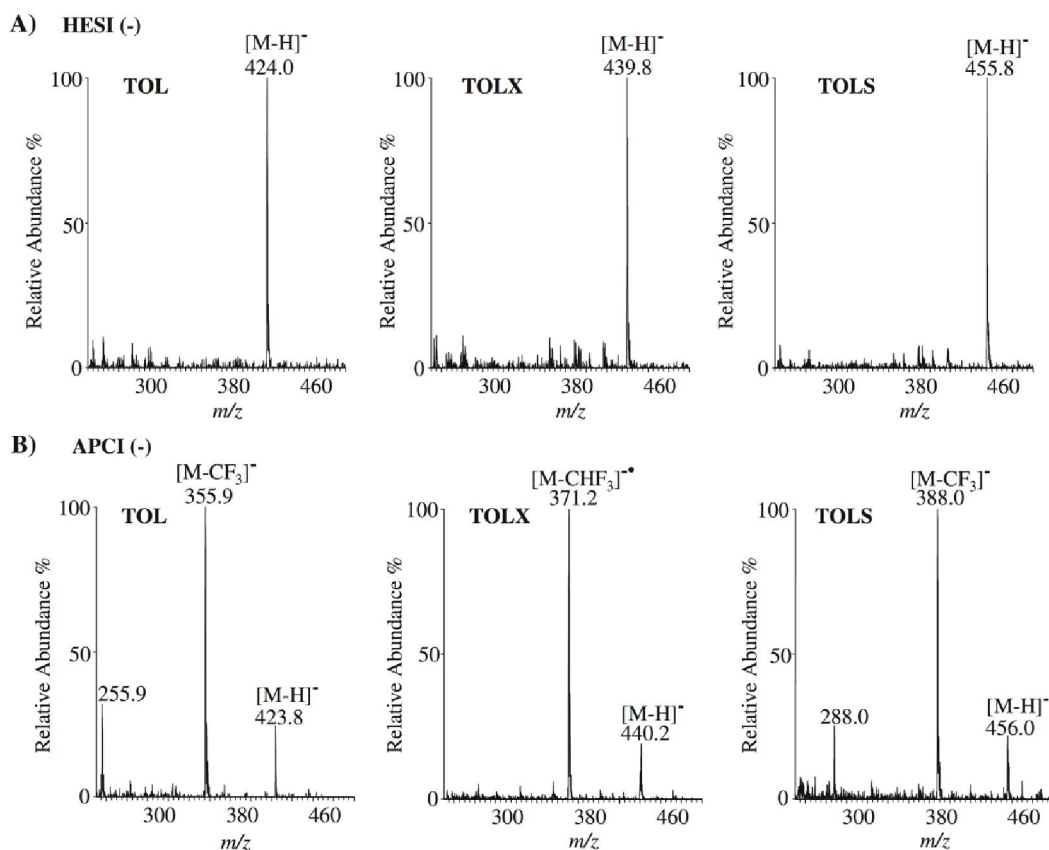


Fig. 2 Full-scan spectra obtained with a heated electrospray ionization in negative mode [*HESI (-)*] and **b** atmospheric pressure chemical ionization in negative mode [*APCI (-)*]

sulfoxide provided a radical anion (m/z 371.1) generated by the loss of CHF_3^\bullet . These in-source fragmentation ions may have originated from an electron capture dissociation mechanism probably favored by the presence of fluorine atoms in the chemical structure. Moreover, for toltrazuril and toltrazuril sulfone an additional ion (less than 40% relative abundance) shifted 100 Da with respect to the base peak was also observed in the full-scan spectrum (Fig. 2b) and was assigned using MS^n in an ion trap (Table 2).

MS/MS experiments were performed with a triple-quadrupole mass analyzer using the base peak of the full scan as the precursor ion, the deprotonated molecule when working with negative HESI, and the protonated molecule when working with positive HESI and positive APCI. For negative APCI, the fragment ions generated from the loss of CF_3 (for toltrazuril and toltrazuril sulfone) and the loss of CHF_3^\bullet (for toltrazuril sulfoxide) were used. Difficulties were observed for the fragmentation of $[M+H]^+$ and $[M-H]^-$ since no product ions could be obtained at collision energies lower than approximately 25 eV and the precursor ion signal was lost at higher collision energies. Hence, positive/negative HESI and negative APCI cannot be

recommended for MS/MS purposes. In contrast, in negative APCI mode, the selected precursor ions were fragmented, easily showing a quite similar fragmentation pattern (Fig. 3). It is worth noting, though, that for toltrazuril sulfoxide the signal intensity was lower than that of the other two compounds. The base peak of the spectrum was the product ion that originated by the loss of 100 Da owing to the cleavage of the triazine ring which might be assigned to $-C_3H_4O_2N_2$. These ions were also observed in the single MS spectra (Fig. 2b) of toltrazuril and toltrazuril sulfone originating from collision-induced-dissociation in-source fragmentation. Additionally, other product ions were also observed in the MS/MS spectra at relatively lower abundances (less than 30%). To obtain additional structural information, characterize these product ions, and establish the fragmentation pathways of toltrazuril and its metabolites, MS^n in an ion trap mass analyzer was performed. The ion trap MS/MS spectra (Table 2) showed only two product ions, the base peak generated by the cleavage of the triazine ring ($[M-CF_3-C_3H_4O_2N_2]^-$) previously observed in the triple-quadrupole MS/MS spectra, and another product ion at relative low abundance (10–30%) also related to the

Table 2 Mass spectrometry (MS)/MS and MS³ spectral data from the ion trap analyzer. The ions also observed in the triple quadrupoles are shown in *bold*

	MS		MS/MS		MS ³	
	<i>m/z</i>	Assignment	<i>m/z</i>	Assignment	<i>m/z</i>	Assignment
Toltrazuril	424 (25)	[M-H] ⁻				
	356 (100)	[M-CF ₃] ⁻	313 (30)	[M-CF ₃ -CHON] ⁻	228 (20)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -CO] ⁻
			256 (100)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂] ⁻	224 (10)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -S] ⁻
					150 (10)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -C ₆ H ₄ NO] ⁻
					124 (100)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -C ₈ H ₆ NO] ⁻
Toltrazuril sulfone	456 (5)	[M-H] ⁻				
	388 (100)	[M-CF ₃] ⁻	345 (15)	[M-CF ₃ -CHON] ⁻	240 (10)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -SO] ⁻
			288 (100)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂] ⁻	224 (100)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -SO ₂] ⁻
					198 (35)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -C ₂ H ₂ SO ₂] ⁻
					148 (10)	[M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -C ₆ H ₄ SO ₂] ⁻
Toltrazuril sulfoxide	440 (60)	[M-H] ⁻				
	371 (100)	[M-CHF ₃] [•]	328 (10)	[M-CHF ₃ -CHON] [•]	254 (100)	[M-CHF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -OH] ⁻
			271 (100)	[M-CHF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂] [•]	239 (75)	[M-CHF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -S] ⁻
					228 (20)	[M-CHF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -CON] ⁻
					224 (20)	[M-CHF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -SO] ⁻
					200 (20)	[M-CHF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂ -C ₂ OS] ⁻

triazine ring that resulted from the neutral loss of CHON. The MS³ product ion scans of [M-CF₃-C₃H₄O₂N₂]⁻ for toltrazuril (*m/z* 256.1) and toltrazuril sulfone (*m/z* 288.1) showed significant differences. For toltrazuril the base peak was an ion at *m/z* 124 originating from the cleavage of the ether bond which kept the sulfur moiety of the molecule, whereas the base peak for toltrazuril sulfone appeared at

m/z 224, arising from the cleavage of sulfur-phenyl bond. When fragmenting [M-CHF₃-C₃H₄O₂N₂][•] of toltrazuril sulfoxide, the MS³ product ion spectrum was dominated by an ion at *m/z* 254 originating from the loss of OH. Another ion with a relative intensity of 75% appeared 32 Da shifted in mass from the precursor ion and it could be due to the loss of the sulfur atom. Other less intense ions

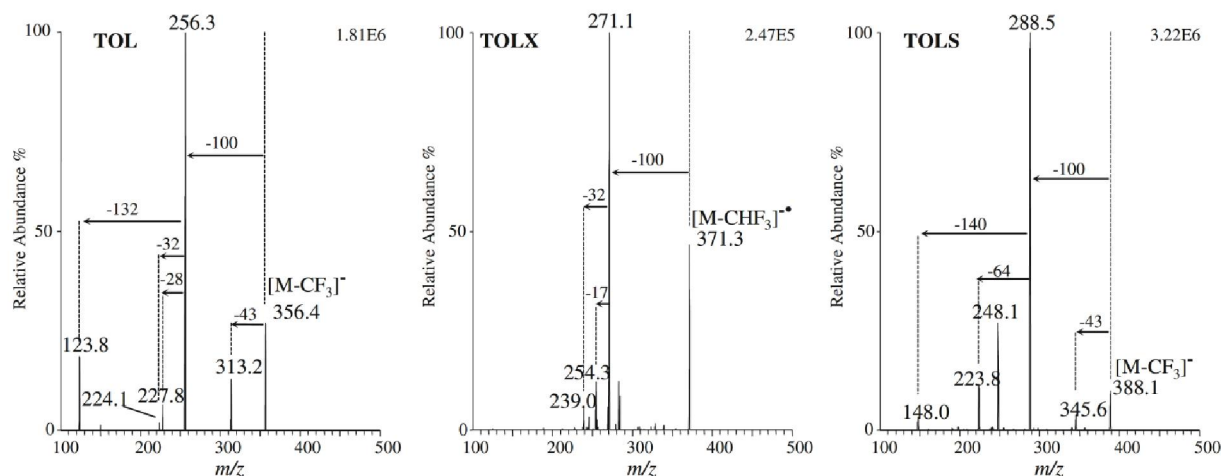


Fig. 3 Tandem mass spectra of toltrazuril and its two metabolites obtained with the triple-quadrupole mass analyzer

(less than 35%) were also observed (Table 2) for the three compounds, coming from fragmentations that involve the aromatic rings, the phenyl ether bonds, the remaining triazine ring, or the sulfur bonds.

To confirm the elemental composition, accurate mass measurements of the most intense product ions were performed using the TSQ Quantum Ultra AM triple quadrupole (Q3 at 0.04 Th FWHM and Q1 at 0.7 Th FWHM). For this purpose internal mass references (two lock masses for each measured mass) were used to overcome the mass drift and obtain absolute errors lower than 5 mDa, thus confirming the elemental compositions of the ions assigned in the mass-fragmentation studies.

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

For a fast and highly efficient LC separation of toltrazuril and its metabolites a Fused-Core™ Ascentis Express C₁₈ column was used. This column is based on 1.7- μm solid core particles surrounded by a 0.5- μm porous silica layer (d_p 2.7 μm) that reduces the mass transfer, increasing the peak efficiency [14, 15], and providing high resolution and chromatographic peak efficiencies very similar to particle sizes below 2 μm . Good separations were obtained when working in gradient elution mode with both methanol/water and acetonitrile/water mobile phases; however, baseline separation was only achieved using methanol/water. To reduce the analysis time and to obtain the maximum column efficiency, the flow rate was raised to 500 $\mu\text{L min}^{-1}$ and the column temperature was set at 40°C to keep the back-pressure below the maximum limit (600 bar) of the column. A rapid gradient elution starting at 60% methanol was optimized allowing the elution of the three compounds in less than 2 min. Despite this fast analysis, the first compound (sulfoxide metabolite) was eluted at twice the dead volume and baseline separation with chromatographic resolutions above 1.25 was obtained (Fig. 4). Peak widths measured at the half of peak height ranged from 3.1 s for toltrazuril sulfoxide to 2.2 s for toltrazuril, which are very good values. This LC method was coupled with MS using the APCI source.

Instrumental quality parameters such as the limit of detection, precision, and linearity were studied using two different acquisition modes in MS/MS, unit mass resolution SRM, and H-SRM. When SRM mode was used, both quadrupoles (Q1 and Q3) were set at 0.7 Th FWHM, whereas for H-SRM mode Q1 operated in enhanced-resolution mode (0.1 Th FWHM) and Q3 in low-resolution mode (0.7 Th FWHM). Instrumental limits of detection based on a signal-to-noise ratio of 3:1 and limits of quantitation based on a signal-to-noise ratio of 10:1 were estimated by injecting 10 μL of standard solutions at low concentrations (down to 50 pg mL^{-1}). Similar limits on the

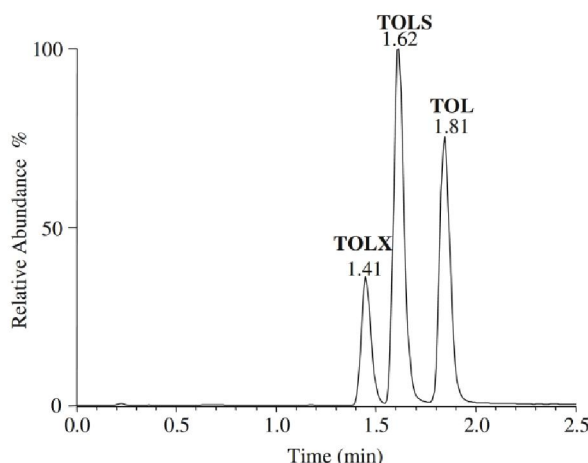


Fig. 4 Total ion chromatogram. Separation obtained with the C₁₈ Fused-Core™ column for a standard (100 ng mL^{-1}) of toltrazuril and its metabolites

level of subpicograms were obtained for the two acquisition modes (0.5–4 pg injected); the values obtained for each compound are given in Table 3. The analysis of standard solutions ranging from 1 to 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ using toltrazuril-*d*₃ as an internal standard (25 $\mu\text{g L}^{-1}$) provided calibration curves based on the peak area ratio that showed good linearity (better than 0.999) for both acquisition modes in the working range. Run-to-run ($n=6$) and day-to-day ($n=6$, 3 days) precisions were evaluated at two concentrations (1 and 75 $\mu\text{g L}^{-1}$) and the relative standard deviations were always lower than 13%.

The ion ratio run-to-run precision was also evaluated for toltrazuril and the two metabolites using the two acquisition modes, and relative standard deviations below 10% ($n=6$) were obtained. Additionally, similar standard deviations were obtained for day-to-day precision ($n=6$, 3 days). All the instrumental quality parameters are summarized in Table 3 and the results showed the good performance of both acquisition modes without significant differences between them. Nevertheless, the use of H-SRM could represent a major advantage when dealing with complex matrices since this mode could possibly solve interference problems because of the improvement of the signal-to-noise ratio. For this reason H-SRM was used as the acquisition mode for the LC-MS/MS determination of toltrazuril and its metabolites in food samples.

Sample cleanup

The literature reports extremely laborious and time-consuming methods for the analysis of toltrazuril and its metabolites [1, 11, 12]. These methods are usually based on extractions of the sample with different organic solvents,

Table 3 Instrumental quality parameters

Compound	SRM ^a				H-SRM ^b			
	LOD (pg injected)	MLOD (µg kg ⁻¹)	Run-to-run precision (n=6) (% RSD)	Day-to-day precision (n=6, 3days) (% RSD)	LOD (pg injected)	MLOD (µg kg ⁻¹)	Run-to-run precision (n=6) (% RSD)	Day-to-day precision (n=6, 3days) (% RSD)
			Concentration (µg L ⁻¹)	Concentration (µg L ⁻¹)			Concentration (µg L ⁻¹)	Concentration (µg L ⁻¹)
			Ion ratio	Ion ratio			Ion ratio	Ion ratio
Toltrazuril	0.5	1	1.8	1.9	2.5	5.9	9.0	4.1
Toltrazuril sulfoxide	3	8	1.5	4.3	7.6	10.5	7.5	9.8
Toltrazuril sulfone	0.5	1	1.3	3.6	3.3	11.7	9.8	5.7

H-SRM highly selective reaction monitoring, LOD limit of detection, MLOD method limit of detection, RSD relative standard deviation

^a Quadrupole 0.7 Th, quadrupole 0.7 Th

^b Quadrupole 0.1 Th, quadrupole 0.7 Th

followed by liquid–liquid extractions to change the solvent and SPE to purify the final extract. For this reason, one of the aims of this work was to develop a sample treatment simpler and faster than those already proposed. Blank samples (chicken breast and minced pork meat) spiked with the analytes at 100 µg kg⁻¹ were used for sample treatment optimization. The amount of sample was small enough (0.5 g) to reduce the extraction solvent volume. Acetonitrile (1.5 mL) was chosen since it has been commonly used for determination of veterinary drugs in food samples [6–8] owing to the high solubility of these compounds in this solvent and its ability to remove proteins from the sample. Dilution with water was performed to facilitate the retention of the compounds in the SPE sorbent materials. Two cartridges were evaluated, Oasis HLB and Bond Elute C₁₈. The Oasis HLB cartridge showed slightly lower recovery for all the analytes (from 72 to 77%) so C₁₈ cartridges were proposed for the final method since recoveries between 86 and 94% were obtained. To evaluate matrix effects in the APCI signal, the response of the labeled internal standard added just before the injection into the LC-MS/MS system was compared with that of the standard solution. The matrix effect was only 10–20% depending on the sample matrix.

Table 4 Meat product analysis using liquid chromatography–MS/MS with H-SRM acquisition mode (n=3)

Sample	Toltrazuril (µg kg ⁻¹ ± SD)	Toltrazuril sulfoxide (µg kg ⁻¹ ± SD)	Toltrazuril sulfone (µg kg ⁻¹ ± SD)
Chicken breast	ND	ND	ND
Chicken nuggets	ND	ND	ND
Frankfurter sausage 1	2.2±0.3	ND	2.3±0.2
Frankfurter sausage 2	1.9±0.3	ND	2.2±0.2
Chorizo	ND	ND	<LOQ
Chistorra	ND	ND	<LOQ
Blood sausage	ND	ND	<LOQ
Iberian sausage	ND	ND	ND
Catalan sausage	ND	ND	ND
Minced pork meat	<LOQ	ND	<LOQ
Hamburger (meat mixture)	ND	ND	ND
Bacon	ND	ND	ND
Soft spicy sausage	ND	ND	<LOQ
Pork liver pâté	ND	ND	ND
Boiled ham	ND	ND	ND
Chopped pork	ND	ND	<LOQ
Salami	ND	ND	ND

ND not detected, LOQ limit of quantification

Application

To evaluate the advantage of using the H-SRM acquisition mode in the analysis of toltrazuril and its metabolites in real food samples, chicken breast and minced pork meat were analyzed following the method described in “Experimental.” Once these samples had been proved to be free from the analytes, they were used as blank samples. They were spiked at a low concentration (down to $1 \mu\text{g kg}^{-1}$), subjected to sample cleanup, and analyzed by LC-MS/MS. The low-resolution acquisition method (SRM) and the enhanced-resolution acquisition method (H-SRM) were evaluated for the establishment of the method limits of detection; these were slightly improved ($0.5 \mu\text{g kg}^{-1}$, Table 3) when working in the enhanced-resolution acquisition mode as a result of the improvement of the signal-to-noise ratio. Moreover, the accuracy of the method was evaluated by spiking blank chicken breast samples ($n=3$) at

$50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Low relative errors of 5% were obtained for toltrazuril and toltrazuril sulfone and slightly higher values (14%) were found for toltrazuril sulfoxide.

To assess the suitability of the LC-MS/MS method for the analysis of toltrazuril and its metabolites in food samples several meat products from Spanish local supermarkets were analyzed. These samples covered a representative range of typical Spanish raw and processed meat. Toltrazuril was quantified by isotopic dilution, whereas for the two metabolites matrix-matched calibration was used since deuterated standards were not commercially available. Since no significant matrix effect was found among the different matrices, matrix-matched calibration done with a blank chicken breast sample was used. In all cases toltrazuril- d_3 was used as an internal standard. Samples were prepared as described in “Experimental” and analyzed in triplicate using the fast LC-MS/MS method developed for the determination of the three compounds. Table 4

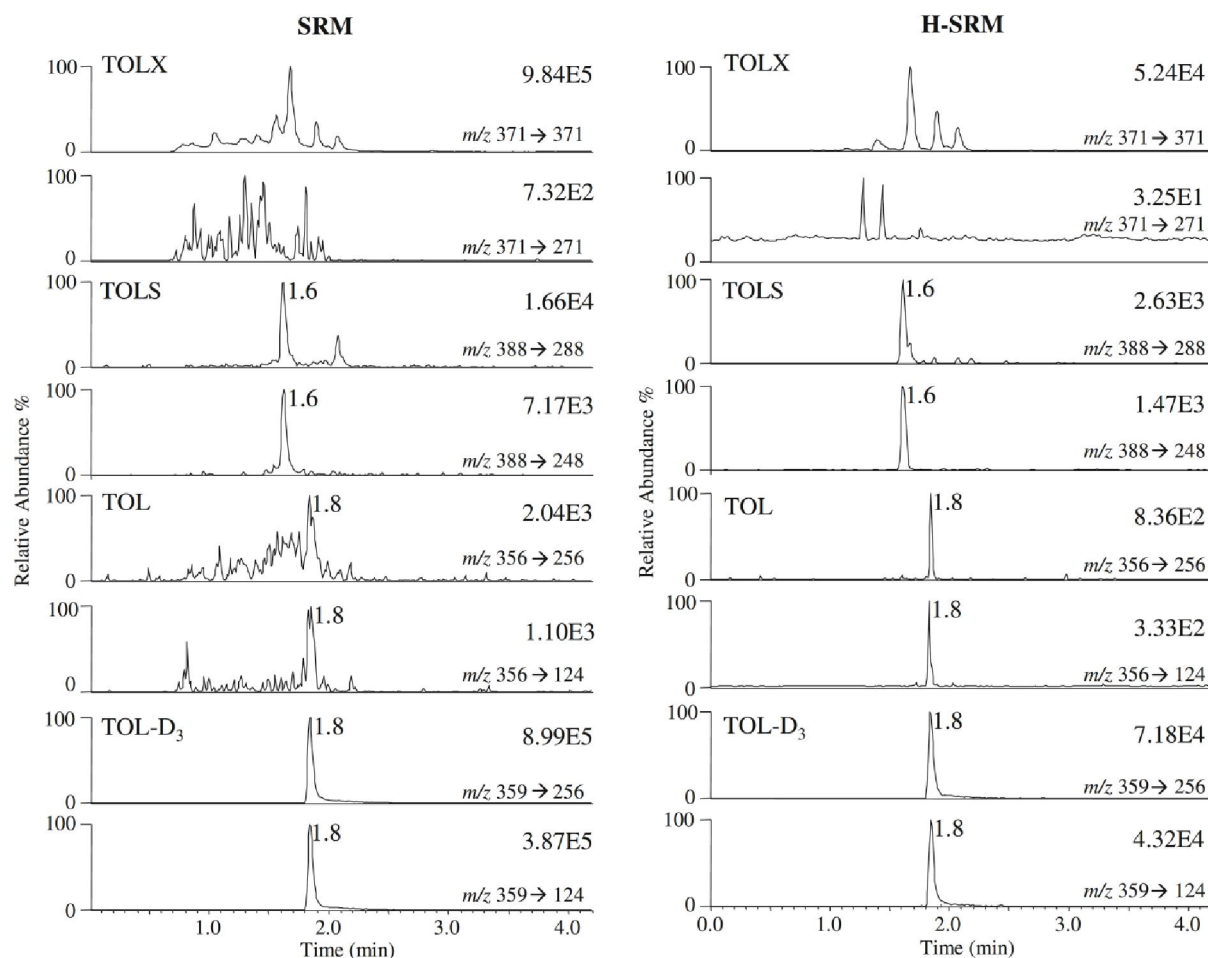


Fig. 5 Frankfurt sausage sample analyzed with the liquid chromatography–tandem mass spectrometry method in the two acquisition modes: selected reaction monitoring (SRM) and highly selective selected reaction monitoring (H-SRM)

summarizes the results of the analysis of food samples. Toltrazuril and toltrazuril sulfone were found in frankfurter sausage at a concentration of $2 \mu\text{g kg}^{-1}$. In minced pork meat both compounds were found at concentrations below the limits of quantitation. Toltrazuril sulfone was also detected in another five samples. As an example, Fig. 5 shows the chromatogram of a frankfurter sausage sample obtained in both acquisition modes: SRM and H-SRM. The improvement of the signal-to-noise ratio in enhanced mass resolution mode allowed not only the detection but also the confirmation of the presence of toltrazuril in this sample. Toltrazuril sulfoxide was not detected in any of the samples analyzed (Table 4). These experimental results agree with the fact that the European legislation considers toltrazuril and toltrazuril sulfone as marker residues for this veterinary drug. Moreover, it must be pointed out that the concentrations found in the samples are far below the MRLs established by the EU ($100\text{--}600 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Conclusions

A comparative study of the ionization of toltrazuril and its metabolites in two API sources (HESI and APCI) was carried out for the first time. In negative APCI an in-source fragmentation by electron-capture dissociation occurred yielding the ions $[\text{M}-\text{CF}_3]^-$ for toltrazuril and toltrazuril sulfone and $[\text{M}-\text{CHF}_3]^-$ for toltrazuril sulfoxide. In the other ionization modes only the deprotonated molecule, with negative HESI, and the protonated molecule, with positive HESI and APCI positive, were obtained. Only the in-source fragment ions provided by negative APCI could be fragmented in MS/MS, so this ionization mode is proposed for the analysis of these compounds by LC-MS/MS, providing four identification points and fulfilling the requirements of Commission Decision 2002/657. The fast LC method developed allows the baseline resolution of toltrazuril compounds in less than 2 min. This method combined with a simple sample treatment enables the high-

throughput analysis of these compounds in food samples. Moreover, the enhanced-resolution mode (H-SRM) proved to be a much more selective acquisition mode for complex sample analysis since it improves significantly the signal-to-noise ratio and could possibly avoid false positives. The applicability of the method has been proved by analyzing a wide range of food meat products at concentrations down to parts per billion levels.

Acknowledgements The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología under project CTQ2009-09253. A.M.-V. wishes to thank the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología for an FPI grant. The authors are also very thankful to the Spanish Society of Mass Spectrometry for awarding this work the second prize at the IV Meeting of the Spanish Society of Mass Spectrometry.

References

1. Dirikolu L, Yohn R, Garret EF, Chakkath T, Ferguson DC (2008) *J Vet Pharmacol Ther* 32:280–288
2. Kim Y, Jung J, Kim M, Park J, Boxall ABA, Choi K (2008) *Environ Toxicol Pharmacol* 26:167–176
3. Boxall ABA, Fogg LA, Kay P, Blackwell PA, Pemberton EJ, Croxford A (2003) *Toxicol Lett* 142:207
4. Gentili A, Perret D, Marchese S (2005) *Trends Anal Chem* 24 (7):704–733
5. European Council (1990) *Off J Eur Communities L* 224:1
6. Stolker AAM, Brinkman UAT (2005) *J Chromatogr A* 1067 (1–2):15–53
7. Toldrá F, Reig M (2006) *Trends Food Sci Technol* 17(9):482–489
8. Balizs G, Hewitt A (2003) *Anal Chim Acta* 492:105–131
9. Kim MS, Lim JH, Hwang YH, Park BK, Song IB, Yun HI (2010) *Vet Parasitol* (in press). doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.011
10. Hormazábal V, Yndestad M, Ostensvik O (2003) *J Liq Chromatogr Relat Technol* 26(5):791–801
11. Mulder PPJ, Balzer-Rutgers P, te Brinke EM, Block YJC, Berendsen BJA, Gerçek H, Schat B, van Rhijn JA (2005) *Anal Chim Acta* 529:331–337
12. Li H, Kijak PJ, Turnipseed SB, Cui W (2006) *J Chromatogr B* 836:22–38
13. Commission E (2002) *Off J Eur Communities L* 221:8–36
14. Salisbury JJ (2008) *J Chromatogr Sci* 46:883–886
15. Cunliffe JM, Maloney TD (2007) *J Sep Sci* 30:3104–3109

2.2.3. ARTICLE CIENTÍFIC III

Analysis of amprolium by hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry

A. Martínez-Villalba, E. Moyano, M.T. Galceran

Journal of Chromatography A (2010) 1217, 5802-5807



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

Analysis of amprolium by hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Anna Martínez-Villalba, Encarnación Moyano*, M. Teresa Galceran

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2010

Received in revised form 8 July 2010

Accepted 14 July 2010

Available online 22 July 2010

Keywords:

HILIC

Hydrophilic interaction

LC–MS/MS

Mass spectrometry

Matrix effect

Matrix ion enhancement

Amprolium

Coccidiostat

ABSTRACT

We present a fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) method for the analysis of the coccidiostat amprolium in food samples. Tandem mass spectrometry in a triple quadrupole was used for quantitative purposes, and the information from multiple-stage mass spectrometry in an ion-trap mass analyzer contributed to fragmentation studies. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in a Fused-Core™ column using isocratic elution (acetonitrile:formic acid/ammonium formate buffer pH 4, 50 mM (60:40)) successfully analyzed this compound in less than 3 min. The HILIC system was coupled to heated electrospray–MS/MS using highly selective–selected reaction monitoring (H–SRM) to improve sensitivity and selectivity for the analysis of amprolium, after a simple sample treatment based on an “extract and shoot” strategy. Accurate mass measurements were performed to identify the interfering compound responsible for causing matrix ion enhancement in the signal of amprolium. The addition of L-carnitine (the interfering compound) ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) to standards and sample extracts allowed the use of the external calibration method for quantitative purposes. The LC–MS/MS (H–SRM) method showed good precision (relative standard deviation, RSD, lower than 13%), accuracy and linearity and allowed the determination of amprolium down to the ppb level (LODs between 0.1 and $0.6 \mu\text{g kg}^{-1}$).

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Veterinary medicines are widely administered to farm animals, owing to the economic benefits that can accrue to livestock producers who keep animals healthy in confined feeding conditions. One disease that is generally controlled is coccidiosis, which is caused by *Eimeria* protozoa. Coccidiosis especially affects poultry, and it can wipe out the entire population of a farm in a matter of days if no control measures are applied. Most of the drugs are usually administered orally, in the water or feed, as a preventive measure. However, continuous administration often leads to the accumulation of drug residues in food products for human consumption [1,2]. This problem has received much attention in recent years because of growing concerns about food safety. As a result the European Commission banned the use of some of these compounds as feed additives. The directive, which came into force in January 2006, allowed the use of some coccidiostats and histomonostats. However, amprolium, which was often used in the prevention of coccidiosis, was not authorized as an anticoccidial drug. Hence, amprolium residues should no longer be found in poultry tissues, eggs or feeding stuffs coming from countries of the European Union. Thus a highly sensitive and selective analytical methodology is

needed for the detection of very low concentrations of this compound in the above-mentioned matrices.

Most of the methods available for determining amprolium are based on ion-pair liquid chromatography, mainly using heptafluorobutyric acid [3–6], and only two free ion-pair reagent methods have been proposed [7–9]. Direct ultraviolet (UV) [3,6] and fluorescence [5] detection after derivatization have been used for amprolium. Nowadays, however, since reliable confirmation is required for the determination of drug residues in food matrices, liquid chromatography coupled to low-resolution mass spectrometry (LC–MS), and especially using tandem mass spectrometry (LC–MS/MS), is the recommended technique [4,6,7,9,10]. Nevertheless, the common use of ion-pair reagents in the mobile phase is a major problem for mass spectrometric detection since ion suppression and contamination occur. To solve this problem, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) can be used instead of ion-pair reagents as a good alternative to normal phase and ion-pair chromatography [11].

We developed a sensitive, selective and fast LC–MS/MS method for the determination of amprolium residues in food matrices. A HILIC Fused-Core™ column was used as an alternative to ion-pair reagents. Moreover, the low backpressure obtained with this particle technology allowed for short retention times [12,13]. To improve both selectivity and sensitivity, electrospray was chosen for the ionization step, and the applicability of enhanced mass resolution in a triple quadrupole analyzer was evaluated.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 1286; fax: +34 93 402 1233.
E-mail address: encarna.moyano@ub.edu (E. Moyano).

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Amprolium hydrochloride (5-[(2-methylpyridin-1-ium-1-yl)methyl]-2-propyl-pyrimidin-4-amine chloride) (99%) was purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Chlormequat-*d*₄ (2-chloroethyl-*d*₄-trimethylammonium ion, CQ-*d*₄, 100 mg L⁻¹) was obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) and used as internal standard. Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN) and water LC–MS grade were supplied by Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Ammonium formate (≥99.0%) was obtained from Fluka (Steinheim, Sweden) and formic acid (98–100%) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions (1 mg mL⁻¹) were prepared in MeOH and stored at 4 °C while 1 μg mL⁻¹ working standard solutions were prepared weekly by dilution in acetonitrile (ACN). Standards and samples were filtered before injection into the LC–MS system using Nylon syringe filters (0.22 μm) purchased from Tracer Tecnologías Analíticas (Madrid, Spain).

Nitrogen (99.8% pure) supplied by Claind Nitrogen Generator N2 FLO (Lenno, Italy) was used for the atmospheric pressure ionization (API) source. High-purity argon (Ar₁) and helium, purchased from Air Liquide (Madrid, Spain), were used as fragmentation gas in the Collision Induced Dissociation (CID) cell of the QqQ and as damper gas in the ion trap.

2.2. Instrumentation

A liquid chromatograph ACCELA (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler and a column oven was used. The chromatographic separation was performed on a Fused-Core™ Ascendis Express HILIC column (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.7 μm particle size) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Isocratic elution was performed with ACN:50 mM formic acid–ammonium formate buffer (pH 4) (60:40) as mobile phase. The flow rate was set at 600 μL min⁻¹, the column temperature was 25 °C, and the sample volume injected was 10 μL. In order to preserve the column a backflush washing protocol using ACN:water (40:60) once a week was used.

The liquid chromatography system was coupled to a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) a triple quadrupole mass spectrometer instrument equipped with the heated electrospray ionization source (H-ESI I) and the hyperbolic quadrupoles. Nitrogen (purity >99.98%) was used as sheath gas and auxiliary gas at flow rates of 60 and 40 a.u. (arbitrary units), respectively. Ion-transfer tube temperature was set at 350 °C; spray voltage at 1.5 kV, and vaporizer temperature, 300 °C. Data were acquired in MS/MS using highly selective-selected reaction monitoring (H-SRM) mode operating in enhanced mass resolution (Q1: 0.1 *m/z* units at full width half maximum, FWHM) and Q3: 0.7 *m/z* units FWHM. Argon was used as collision gas at 1.5 mTorr and the optimum collision energy (CE) for each transition was applied. Two transitions for each compound (analyte and internal standard) were monitored using a dwell time of 50 ms and 1 averaged μscan/scan: *m/z* 243 → 150 (quantification, CE: 13 eV) and *m/z* 243 → 94 (confirmation, CE: 14 eV) for amprolium and *m/z* 126 → 58 (quantification, CE: 24 eV) and *m/z* 126 → 67 (confirmation, CE: 23 eV) for CQ-*d*₄, the internal standard. The Xcalibur software version 2.0 (Thermo Fisher Scientific) was used to control the LC/MS system and to process data.

For fragmentation studies, a LCQ Classic instrument (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with a low-resolution ion-trap mass analyzer and electrospray (ESI) source was used. The ESI working conditions were: sheath gas and auxiliary gas (N₂) flow rates at 86 and 20 a.u. (arbitrary units), respectively, heated cap-

illary temperature, 250 °C and electrospray needle voltage, 4 kV. Product ion spectra from multi-stage mass spectrometry (MS^{*n*}) experiments were acquired (*m/z* 50–300) in profile mode. For tandem mass spectrometry experiments an isolation width of 1.5 *m/z* units was required to obtain the maximum trapping efficiency and 3 μscans/scan were acquired. The maximum injection time and activation time were 200 and 30 ms, respectively. The trapping radio-frequency voltage (AQ) was set at 0.3 and the normalized collision energy (NCE) was 23% for MS² and 31% for MS³.

Tuning and multi-stage mass spectrometry experiments were performed by infusing standard solutions of each compound (1 μg mL⁻¹) using a built-in syringe pump at a flow rate of 10 μL min⁻¹ in an LC flow of 200 μL min⁻¹ using a Valco zero dead volume tee piece (Supelco, Alcobendas, Spain).

2.3. Sample treatment

Chicken muscle and egg samples were purchased from local markets in Barcelona (Spain) and animal feed was obtained from a local supplier. Samples were ground and homogenized using an Ultraturrax T25 basic (IKA-Werke, Staufen, Germany) and chicken muscle and egg samples were stored at –18 °C until analysis. Sub-samples of 1 g, weighed into individual 15 mL centrifuge tubes, were mixed with 10 mL of ACN and extracted using an ultrasonic bath Sonorex RK100 (Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin, Germany) for 20 min and finally shaken for 20 min on a rotating shaker (Rotatory Mixer 34526; Breda Scientific, Breda, The Netherlands). Samples were then centrifuged at 4000 rpm for 15 min on a Selecta Centronic centrifuge (Selecta, Barcelona, Spain). Only 1 mL of the supernatant solution was introduced into a 2 mL injection vial and 25 μL of an L-carnitine standard solution (40 μg mL⁻¹) were added prior to injection into the LC–MS/MS system.

3. Results and discussion

3.1. Liquid chromatography–mass spectrometry

Recently, our research group has proposed a method based on hydrophilic interaction chromatography (HILIC) for the determination of quaternary ammonium compounds [14] as an alternative to ion-pair reversed phase chromatography [15]. These compounds were efficiently retained using HILIC and a high content of ACN in the mobile phase. In this study the same strategy was applied to retain amprolium, a quaternary ammonium salt, using an Ascendis Express HILIC column based on Fused-Core™ technology to take advantage of excellent peak efficiency and the possibility to perform fast chromatography. Several parameters affecting the retention of amprolium such as the ionic strength, the pH and the percentage of organic solvent in the mobile phase were optimized. Moreover, since no labelled standard is available, another deuterated quaternary ammonium salt (CQ-*d*₄) was used as internal standard. The formic acid/ammonium formate buffer concentration was varied between 5 and 50 mM (pH 3.75) to study the effect of the ionic strength on the retention; the peak shape improved when increasing the ionic strength and shorter retention times were obtained. Nevertheless, since a relatively high buffer concentration is not recommended when coupling the chromatographic system to a mass spectrometer, values over 50 mM were not tested and this maximum concentration was chosen for further studies. To evaluate the effect of the pH on the chromatographic performance, different aqueous buffer solutions at pH between 3 and 5 were tested. The best peak shape and the best separation were observed at pH 4. At pH above this value the internal standard (CQ-*d*₄) eluted too close to the elution front where non-retained matrix components elute. In contrast, at pH below 4, longer reten-

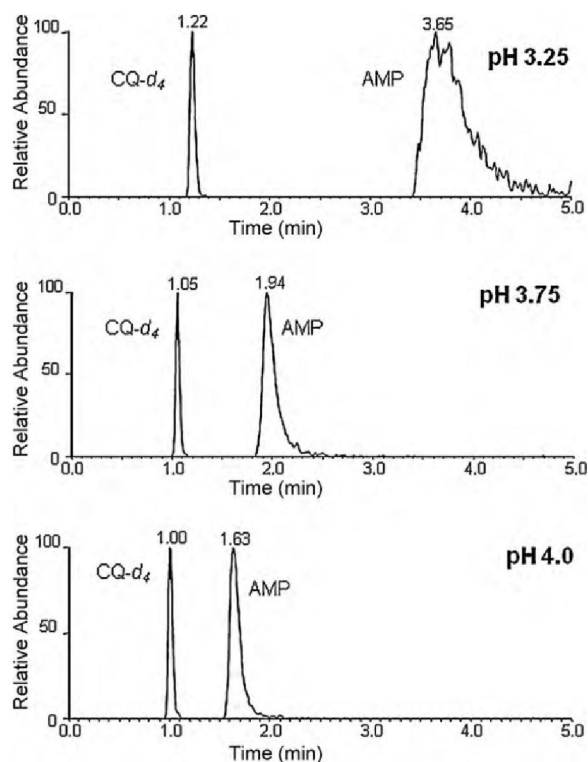


Fig. 1. Effect of pH on amprolium retention. Ascentis Express HILIC Column (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.7 μm particle size), mobile phase acetonitrile:ammonium formate buffer (50 mM) (60:40).

tion times and stronger peak broadening were observed due to the lower ionic strength of the mobile phase at these pH values in agreement with the behaviour observed for cationic compounds in HILIC separations [16]. This effect can be seen in Fig. 1, where the LC–MS chromatograms obtained using mobile phases at different pH val-

ues are shown. Under isocratic conditions the best separation was achieved using 60% ACN and 40% formic acid/ammonium formate (50 mM, pH 4.0) aqueous buffer solution. The internal standard (CQ-*d*₄) eluted first at a retention volume that was more than double the dead volume (0.4 min). A range of gradient elution programmes were tested in order to enhance peak shape; however, no significant improvement was obtained and the column re-conditioning time needed resulted in a longer total cycle analysis time compared with the isocratic mode.

Electrospray (ESI) in positive mode was used to generate ions in gas phase when coupling HILIC system to the mass spectrometer since amprolium is permanently charged in the hydro-organic phase and is easily transferred to the gas phase. As to the mass analyzer, triple quadrupole mass spectrometer was used for quantitative analysis to take advantage of its high sensitivity and selectivity in complex matrices. Moreover, to help in the structural elucidation and in the correct assignment of product ions, the information provided by an ion-trap mass analyzer was also used as a complementary tool. The full-scan mass spectrum of amprolium obtained in a triple quadrupole was dominated by the molecular ion [M]⁺ (*m/z* 243), and only one other ion at *m/z* 150 was observed, with a relative abundance of 40%, probably due to in-source CID (collision induced dissociation) fragmentation. The MS/MS spectrum obtained with this instrument showed two intense product ions, one at *m/z* 150 (base peak) and the other at *m/z* 94 (40%). Moreover, other ions with lower relative abundances (<20%) were also present in this spectrum (*m/z* 135, 122 and 108) (Fig. 2A). Collision energy was varied between 0 and 72 eV and the corresponding curves for the different product ions were obtained (Fig. 2A). As can be seen from the collision energy curves, ions at *m/z* 150 and 94 were generated at relatively low collision energies. The other ions appeared at higher collision energies, indicating that they might have been originated as a result of multiple collisions in the collision cell. In order to assign these product ions and to identify the corresponding precursor ions, multiple-stage mass spectra (MS^{*n*}) were obtained in an ion trap. In this analyzer the MS spectrum of amprolium only showed the molecular ion due to the soft ionization conditions used in this case. Only two product ions, *m/z* 150 and *m/z* 94, with similar ion ratios to those obtained in the

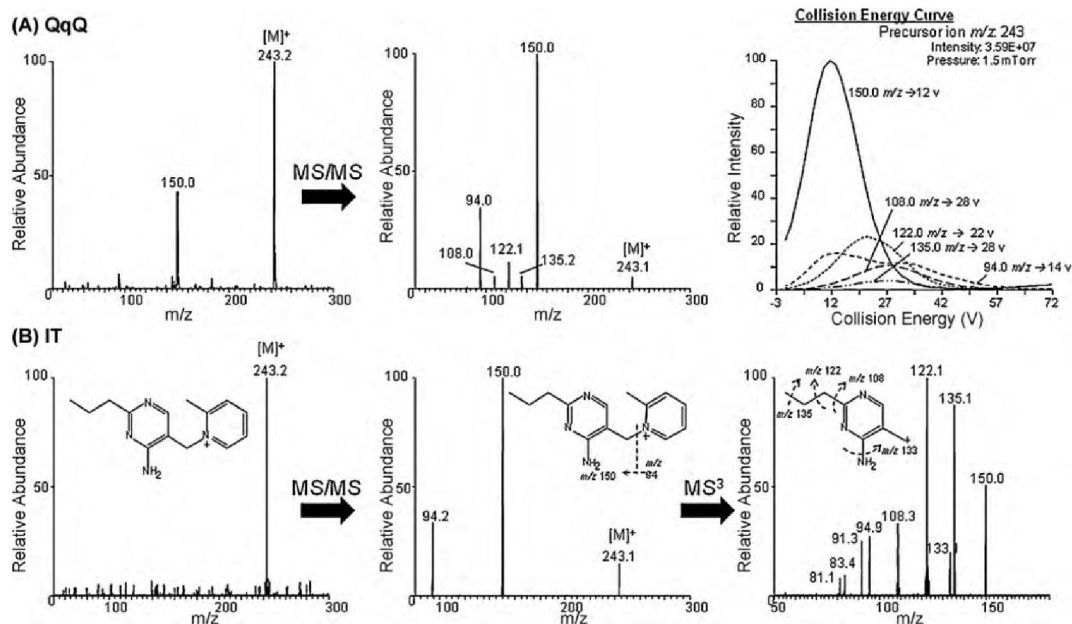


Fig. 2. (A) MS, MS/MS spectra and collision energy curves obtained in a triple quadrupole instrument. (B) MS, MS/MS and MS³ spectra obtained in an ion-trap instrument.

Table 1
Instrumental and method quality parameters.

Quality parameters	Instrumental			Method			
		SRM	H-SRM		Egg	Feed	Chicken muscle
LOD	pg inj	0.2	0.2	$\mu\text{g kg}^{-1}$	0.1	0.2	0.2
LOQ	pg inj	0.6	0.6	$\mu\text{g kg}^{-1}$	0.3	0.6	0.6
Run-to-run (%RSD) $n=6$							
Low concentration	50 ng L^{-1}	3.8	8.6	0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	4.3	12.9	4.0
Medium concentration	250 ng L^{-1}	0.8	3.1	5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	8.9	8.8	8.9
Ion ratio (RSD %)		5.8 (7.1)	5.9 \pm (6.7)		5.9 (8.1)	5.8 (7.5)	5.8 (8.3)
Day-to-day (%RSD) (3 days, $n=6$)							
Low concentration	50 ng L^{-1}	7	12.8				
Medium concentration	250 ng L^{-1}	1.3	3.8				
Ion ratio (RSD %)		5.9 (12.9)	5.9 (14.3)				

triple quadrupole, were observed in the MS/MS spectrum of the precursor ion m/z 243 (Fig. 2B). These ions were generated by the α -cleavage of the quaternary nitrogen, thus the ion at m/z 150 can be assigned to $[\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_3]^+$ keeping the aminopyrimidinyl moiety, while the ion at m/z 94 kept the quaternary ammonium in its structure ($[\text{C}_6\text{H}_8\text{N}]^+$). The MS³ spectrum obtained from the product ion at m/z 150 provided the additional ions observed in the triple quadrupole MS/MS spectrum. All these ions (m/z 135, 122 and 108) were related to the C–C bond cleavage on the alkyl chain of the aminopyrimidinyl moiety. Additional ions (m/z 133, 95 and 91) observed in the ion trap and not present in the MS/MS spectrum of the triple quadrupole may have been related to fragmentations involving the cleavage of the aminopyrimidinyl ring.

3.2. Method performance

For the analysis of amprolium transitions m/z 243 > 150 for quantitation and m/z 243 > 94 for confirmation were used under the experimental conditions described above. To test the LC–MS/MS method performance, quality parameters such as limit of detection (LOD), precision and linearity were studied using two different acquisition modes: low-resolution selected reaction monitoring (SRM) and highly selective-selected reaction monitoring (H-SRM). When working in SRM, both quadrupoles (Q1 and Q3) were set at 0.7 m/z units FWHM, while for the H-SRM mode the Q1 operated at 0.1 m/z units FWHM and Q3 at low resolution (0.7 m/z units FWHM). Instrumental limit of detection (LOD) based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 3:1 and limit of quantitation (LOQ) based on S/N of 10:1 were estimated by injecting 10 μL of standard solutions of low concentrations. Similar values in the sub-pg range were obtained for the two acquisition modes (0.2 pg for SRM and 0.6 pg for H-SRM). Standard solutions ranging from 75 ng L^{-1} to 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ provided calibration curves based on the peak area ratio between amprolium and internal standard. These curves showed good linearity (>0.999) for both acquisition modes in the working range. The run-to-run ($n=6$) and day-to-day ($n=6$, 3 days) precisions were evaluated at two concentration levels (75 and 500 ng L^{-1}) and % the RSD values were always lower than 13%.

The ion ratio and its corresponding run-to-run precision were evaluated for amprolium using the two acquisition modes. Ion ratios of 5.8 for SRM and of 5.9 for H-SRM with a relative standard deviation below 7.1% ($n=6$) were observed. This is consistent with recommended values that should be lower than 20% [17]. Additionally, similar ion ratios and higher standard deviations below 14.3% were obtained for day-to-day precision ($n=6$, 3 days). The instrumental quality parameters are summarized in Table 1 and these results showed the satisfactory performance of both acquisition modes without significant differences between them. Since the H-SRM mode could filter background noise more efficiently than SRM it may eventually solve interference problems. So, H-SRM was

selected as acquisition mode for the LC–MS/MS determination of amprolium in food samples.

3.3. Application

To assess the applicability of the newly developed LC–MS/MS method, amprolium was analyzed in various samples such as eggs, chicken muscle and animal feed. In order to reduce analysis time a simple and a fast sample treatment based on an “extract and shoot” strategy was used. ACN was the extraction solvent chosen since it has been recommended for the analysis of food samples [18]. Despite this sample treatment, dirty extracts were obtained that could seriously affect the efficiency of the electrospray ionization, so matrix effects had to be evaluated. For this purpose eggs, chicken muscle and feeding stuff samples purchased from ecological farms were submitted to the sample treatment described in Section 2 and to LC–MS/MS analysis in order to check the absence of amprolium and the possibility of using these samples as blank samples for further studies. No signal higher than the background noise was observed in the elution zone for either quantitation or confirmation transitions, indicating that the samples did not contain amprolium. The corresponding extracts were used for the evaluation of matrix effects by spiking them at the same concentration as standards (0.05–5 ng mL^{-1}) and comparing their responses. In all the matrices studied there was an increase in the amprolium signal when the extracts were spiked. For example, Fig. 3 shows the chromatograms obtained for a blank egg extract spiked with amprolium and for a standard prepared in mobile phase. The height of the amprolium peak in the egg-spiked sample is more than twice the standard height. In order to identify the interfering compound responsible for this matrix enhancement, the blank spiked samples were re-injected and acquired in full-scan mode (m/z 30–500). Amprolium eluted in the tail of a large chromatographic peak. The spectrum of this peak showed a base peak at m/z 162. When this ion was submitted to MS/MS, the corresponding product ion spectrum showed intense ions at m/z 103, 102, 85 and 60. Since on an HILIC column the non-polar compounds elute in the chromatogram front and the polar ones are retained, the interfering compound that coelutes with amprolium is probably a cationic compound. The masses of the parent ion and the most intense product ions were measured. The H-SIM acquisition mode in Q3 (0.04 m/z units FWHM and ± 5 mDa mass accuracy) provided an accurate mass value of m/z 162.117. Only three elemental compositions were possible for this m/z value within an error lower than 5 mDa, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2$ (2 mDa), $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{NO}_3$ (4 mDa), $\text{C}_2\text{H}_{12}\text{N}_9$ (–4 mDa). Additionally, the accurate mass for the more abundant product ions (m/z 103 and m/z 85) was measured, obtaining the values of 103.037 and 85.033 Da, respectively. A chemical structures database (Chemspider) [19] was used to identify possible chemical structures for each proposed elemental composition. Since we were working in ESI in positive mode

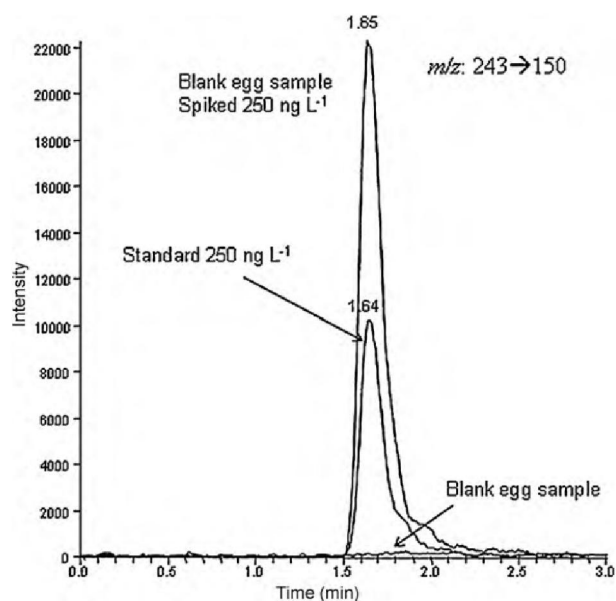


Fig. 3. Comparison of the signal obtained for a 250 ng L⁻¹ standard and a blank egg extract spiked at 250 ng L⁻¹. Ascentis Express HILIC Column (100 mm × 2.1 mm i.d., 2.7 μm particle size), mobile phase acetonitrile:ammonium formate buffer pH 4.0 (50 mM) (60:40).

the elemental compositions obtained must belong to cations or protonated molecules. In this last case the elemental composition to be introduced in the database should contain one less proton. For C₂H₁₂N₉ no structure was found, while for C₁₀H₁₄N₂ 666 different structures were obtained but none of them was a cation. For a protonated molecule (C₁₀H₁₃N₂), 106 structures were found, all of which correspond to cationic compounds. So this elemental composition was discarded. Finally, for the elemental composition

C₇H₁₆NO₃ only chemical structures containing quaternary amines were found. Moreover, this molecular formula was the only one that could yield elemental compositions that matched the product ions within an error lower than 5 mDa, C₄H₇O₃ (2 mDa) for *m/z* 103 and C₄H₅O₂ (4 mDa) for *m/z* 85. The first candidate on the list provided by the database corresponded to L-carnitine. According to the literature, the tandem mass spectrum of this compound shows the product ions *m/z* 103, 102, 85 and 60 [20–22], which match the fragmentation pattern of the interfering compound. To confirm the identity of this interfering compound, the MS and MS/MS spectra as well as accurate mass measurements were obtained using a standard solution of L-carnitine. The results were compared with those observed for the interfering substance in the extracts. The product ion scan obtained from the interfering peak in the blank sample matched that from the L-carnitine standard solution (Fig. 4.), as occurred with the corresponding retention times on the HILIC column.

These results indicated that L-carnitine was the interfering compound in these food samples. In order to demonstrate the enhancing effect of L-carnitine on the amprolium signal, a series of standards were prepared containing a constant concentration of amprolium and increasing amounts of L-carnitine. The amprolium signal increased when the L-carnitine concentration increased, showing a linear relationship between L-carnitine concentration and the amprolium response up to 700 ng mL⁻¹ of L-carnitine, but at concentrations over this value the amprolium response was independent of L-carnitine concentration. Matrix effect seems to be originated from the competition between the analyte and co-eluting interfering species in terms of equilibrium, both inside and on the surface of the charged droplets [23,24]. The lower amprolium responses in standards (Fig. 3) can be due to the formation of ion-pairs with the mobile phase components remaining as neutral inside of the droplets. When high amounts of L-carnitine (above 700 μg L⁻¹) are present this compound can compete with amprolium in the ion-pair equilibrium favouring its enrichment on the droplet surface.

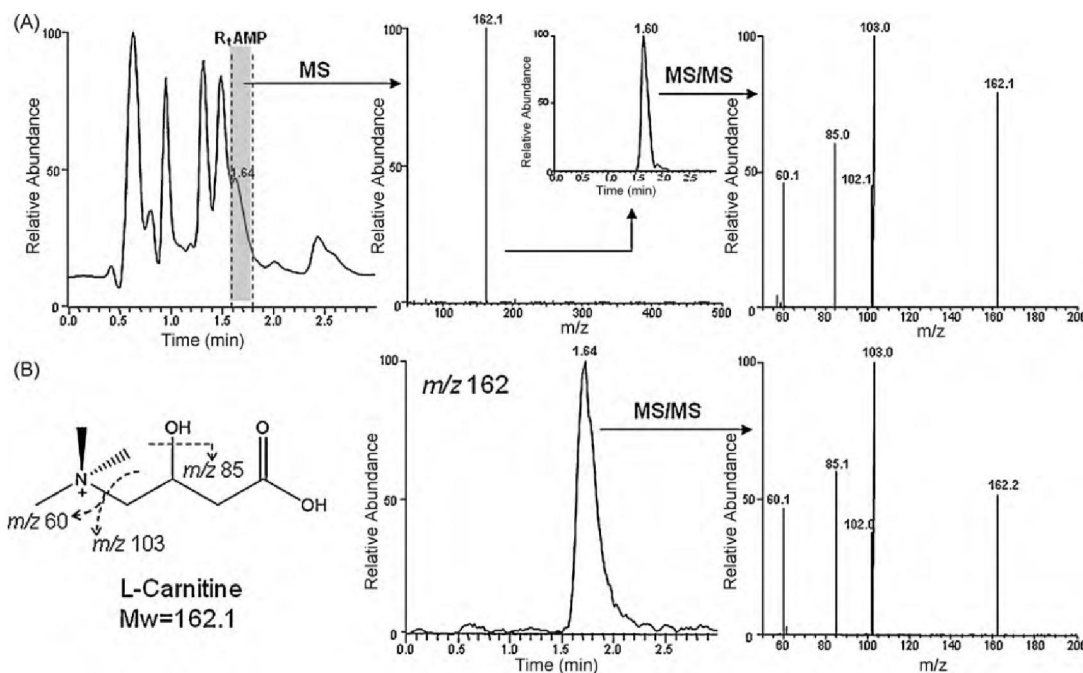


Fig. 4. Identification of matrix interference at amprolium retention time. (A) Total ion chromatogram (TIC) of an egg sample and spectrum obtained at amprolium retention time. Extracted ion chromatogram (XIC) at *m/z* 162.1 and its product ion scan spectrum. (B) L-carnitine structure. Chromatogram and MS/MS spectrum obtained for an L-carnitine standard.

We evaluated the effect of adding L-carnitine to amprolium standard solutions. We prepared calibration standards at concentrations between 50 and 2000 pg mL⁻¹ with 1 µg mL⁻¹ of L-carnitine and 200 ng mL⁻¹ of internal standard (CQ-d₄). The calibration curve calculated based on the relative response of amprolium to internal standard was compared with that obtained by matrix-matched calibration using the different matrices studied (eggs, chicken meat and animal feed). The matrix-matched curves were similar for the three matrices but showed a higher slope than the external calibration curve. However, if the absolute amprolium response was considered instead of the ratio to the internal standard, the slopes matched. This indicated that the internal standard, CQ-d₄, could also suffer a significant matrix effect. In this case, strong signal suppression (46–68%) was observed. So, calibration with amprolium standard solutions without the internal standard but with a constant concentration of L-carnitine (1 µg L⁻¹) can be proposed for quantitation which is an advantage in front of other methods published in the literature [4,6–9].

Finally, several quality parameters of the method were evaluated. The method detection limit (MDL) was estimated from blank samples spiked with amprolium at low concentrations and submitted to the sample treatment before their analysis by LC–MS/MS (H-SRM). The MDL was calculated based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 3, and ranged from 0.1 to 0.2 µg kg⁻¹ for the various matrices (Table 1). MDLs (0.1 pg injected) were slightly better than the instrumental LOD due to the matrix effect that produced the signal enhancement in the amprolium ESI response. These values were best or similar than those reported in the literature and were low enough to fulfil the legislation requirements in those countries that have set MRLs values which are usually between 0.2 and 5 mg kg⁻¹. Run-to-run precision was evaluated using six replicates for each matrix (egg, chicken muscle and feed) spiked at two concentration levels (1 and 10 µg kg⁻¹) and adding the L-carnitine to both samples and standards. The relative standard deviations based on concentration ranged from 4% to 13% for the low concentration level and were 9% for the medium level (Table 1). Recoveries were estimated for each matrix taking into account the sample treatment procedure. For this estimation peak areas of blank samples spiked at different concentration levels before and after sample treatment were compared. Recovery values ranged from 80% to 90% for the different matrices, and the lowest recovery was obtained for chicken and the highest for eggs. Taking these recovery values into account, the bias of the method for both concentration levels was 93% to 99% showing that the quantification using the external calibration with L-carnitine method could be proposed. This would solve the problem of the signal enhancement observed in the samples. Ion ratios obtained for samples agreed with those obtained for the standards providing a RSD value lower than 9%. Samples bought from local markets in Barcelona were analyzed with this method and amprolium was always below the detection limit, indicating that producers follow the European directive banning the use of this drug as feed additive.

4. Conclusions

A sensitive, selective and fast LC–ESI-MS/MS method and a simple sample treatment are proposed for the analysis of amprolium

in food samples. Hydrophilic interaction liquid chromatography allowed the retention of this cationic coccidiostat and in combination with Fused-Core™ technology columns the method provided an efficient chromatographic analysis in less than 3 min using isocratic elution and achieving extremely low MDLs in the studied matrices. Multiple-stage (ion trap) mass spectrometry information has been combined with that obtained in a triple quadrupole for the correct assignment of fragment ions used in quantitation and confirmation purposes. Moreover, an extensive study of the matrix effects suffered by amprolium in the studied samples was carried out and accurate mass measurements helped in the identification of L-carnitine as the interfering compound that enhanced the amprolium signal. As the most cutting-edge aspect, the LC–MS/MS (H-SRM) method proposed takes advantage of this signal enhancement to improve the limit of detection (down to 0.2 µg kg⁻¹). External calibration, by adding a constant amount of L-carnitine (1 µg mL⁻¹) to both samples and standards, is proposed for a fast, routine and reliable quantitation of amprolium in food samples.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministry of Science and Technology under the project CTQ2009-09253. Anna Martínez-Villalba thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for an FPI grant.

References

- [1] M. Reig, F. Toldrà, *Meat Sci.* 78 (2008) 60.
- [2] C. Girardi, R. Odore, *Vet. Res. Commun.* 32 (2008) S11.
- [3] H.S.L. Tan, P. Ramachandran, W. Caccini, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 15 (1996) 259.
- [4] W. Song, M. Huang, W. Rombeih, H. Li, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 1944.
- [5] K. Hamamoto, R. Koike, A. Shirakura, N. Sasaki, Y. Machida, *J. Chromatogr. B* 693 (1997) 489.
- [6] N. Furusawa, *J. Chromatogr. Sci.* 40 (2002) 355.
- [7] B. Shao, X. Wu, J. Zhang, H. Duan, X. Chu, Y. Wu, *Chromatographia* 69 (2009) 1083.
- [8] V. Hormazábal, M. Yndestad, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 23 (2000) 1585.
- [9] V. Hormazábal, M. Yndestad, O. Ostensvik, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25 (2002) 2655.
- [10] S. Squadrone, C. Mauro, G.L. Ferro, G. Amato, M.C. Abete, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 1457.
- [11] A.J. Alpert, *J. Chromatogr.* 499 (1990) 177.
- [12] J.J. Salisbury, *J. Chromatogr. Sci.* 46 (2008) 883.
- [13] J.M. Cunliffe, T.D. Maloney, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 3104.
- [14] X. Esparza, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4402.
- [15] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 145.
- [16] P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 1784.
- [17] Commission Decision 2002/657/EC, *OJ L* 221, 17.08.2002B.
- [18] Kinsella, J. O'Mahony, E. Malone, M. Moloney, H. Cantwell, A. Furey, M. Danaher, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7977.
- [19] <http://www.chemspider.com/> Update; 15/01/2010.
- [20] Y. Deng, J. Henion, J. Li, P. Thibault, C. Wang, J. Harrison, *Anal. Chem.* 73 (2001) 639.
- [21] C. Tallarico, S. Pace, A. Longo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 403.
- [22] C. Desiderio, A. Mancinelli, A. De Rossi, D.V. Rossetti, R. Inzitari, I. Messina, B. Giardina, M. Castagnola, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 320.
- [23] C.G. Enke, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4885.
- [24] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929.

2.2.4. ARTICLE CIENTÍFIC IV

Field amplified sample injection-capillary zone electrophoresis for the analysis of amprolium in eggs

A. Martínez-Villalba, O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran
Electrophoresis (2013) 34, 870-876

Anna Martínez-Villalba
Oscar Núñez
Encarnación Moyano
M. Teresa Galceran

Department of Analytical
Chemistry, University of
Barcelona, Barcelona, Spain

Received July 23, 2012
Revised October 23, 2012
Accepted November 13, 2012

Research Article

Field amplified sample injection-capillary zone electrophoresis for the analysis of amprolium in eggs

Veterinary medicines are widely administered to farm animals since they keep animals healthy at overcrowded conditions. Nevertheless the continuous administration of medicines to farm animals can frequently lead to the presence of residues of veterinary drugs in consumption products. Amprolium is a quaternary ammonium compound used in the treatment of coccidiosis. In this paper, a method based on CZE to analyze residues of amprolium in eggs was developed and validated for the first time. Parameters such as electrolyte type, concentration, and pH were optimized. In order to improve sensitivity, field-amplified sample injection (FASI) was used for in-line pre-concentration after a quick and simple sample treatment based on SPE (Envi-Carb). During method-validation studies using egg samples, a matrix interference was found at the migration time of amprolium. This compound was identified as thiamine and confirmed by MSⁿ experiments using CE coupled to MS (CE-MS) with an ion-trap mass analyzer. CZE conditions were reoptimized to separate thiamine from amprolium allowing the quantification of amprolium in eggs at concentrations down to 75 µg/kg, which are far below the MRL-legislated values.

Keywords:

Amprolium / Coccidiostats / CZE / FASI / Food analysis

DOI 10.1002/elps.201200579

1 Introduction

On modern farms, animals are raised under confined-feeding conditions at high temperature and humidity that can easily lead to the proliferation of microorganisms causing many diseases. Veterinary medicine is in charge of the prevention and treatment of these illnesses via the administration of a varied number of veterinary drugs. One of these diseases that must be controlled is coccidiosis, an infectious disease caused by protozoa of the genus *Eimeria*, which affects the intestinal tract provoking weight loss and even death of the infected animal. It affects all farm animals in general but especially poultry, so routine prophylactic treatments are performed by adding to water or feeds veterinary medicines in order to prevent the apparition of the illness. Amprolium is a quaternary-ammonium compound used since the 1950s for the treatment of coccidiosis. Although it has been employed successfully against the disease, its use has some drawbacks. On one hand, it can produce thiamine deficiency

as it is a thiamine analog and an abusive intake of the drug can lead to a poor absorption of this vitamin [1]. On the other hand, after long periods of administration it can become ineffective because of the appearance of resistant strains. Moreover, residues of the drug can remain in eggs and tissues; hence, the drug can arrive to consumers if withdrawal periods are not fully accomplished. Due to the growing concern about the amount of veterinary drugs reaching the food, European governments have restricted the use of veterinary medicines establishing maximum residue limits (MRLs) in different tissues, however for amprolium no MRLs have been set [2, 3]. Meanwhile, in non European countries where this drug is still authorized, MRLs have been established at values ranging from 0.03 to 1 mg/kg in tissues and from 0.1 to 8 mg/kg in eggs (<http://www.mrldatabase.com/default.cfm?selectvetdrug=1> [18/07/12]), while the concentration added to feeds usually ranges from 80 to 130 mg/kg.

Very few analytical methodologies are available in the literature for the analysis of this compound in matrices such as feed, tissues and plasma are mainly based on ion-pair LC [4–6]. Earlier studies used direct ultraviolet (UV) detection [5, 6] or fluorescence detection after post column derivatization [4]. However, nowadays there is a trend toward the use of MS [7, 8], since it is a more reliable detection method and can provide lower detection limits. Nevertheless the purchase of a mass spectrometer is not always an affordable expense for some laboratories, so alternative sensitive methods must be available. Additionally, moving toward green chemistry,

Correspondence: Dr. Oscar Núñez, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona. Martí i Franquès 1-11, E-08028, Barcelona, Spain
E-mail: oscar.nunez@ub.edu
Fax: +34-93-402-1233

Abbreviations: FASI, Field amplified sample injection; MLOQ, method limit of quantitation; MRL, maximum residue limit

it is always important to reduce the use of solvents such as methanol or ACN that are commonly used as mobile phases in LC. In this context, it is well known that CE can represent an alternative to the current methods since it is an affordable technique that requires a minimum amount of solvents besides the high separation efficiency that it provides among other advantages. Despite its high efficiency, CE presents relatively low sensitivity because of the small volume of injected sample (2–10 nL) and the short optical-path length (25–100 μm). This problem can be overcome by in-column preconcentration techniques such as field-amplified sample injection (FASI), stacking, and sweeping [9–11]. These techniques combined with off-line preconcentration procedures provide LODs capable of fulfilling current legislation.

To the best of our knowledge, for the analysis of amprolium only an electrophoretic method based on isotachopheresis has been reported in the literature [12]. The purpose of the work presented here was to develop and validate an easy and cheap CZE method for the determination of amprolium. The present paper reports the optimization of the experimental conditions. The influence of different parameters such as the concentration and pH of the aqueous buffer on the analysis was studied and the applicability of FASI was evaluated. Additionally, the challenge that represents dealing with difficult matrices is hereafter commented since an interfering compound was identified as thiamine and separated. Finally, the FASI-CZE method was validated for the analysis of amprolium in egg samples.

2 Materials and methods

2.1 Chemicals and consumables

All the reagents used in this work were of analytical grade. Amprolium hydrochloride was provided by Riedel-de-Haën (Seelze, Germany). Methanol and ACN were supplied by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Formic acid (98–100%), acetic acid (100%), ammonium acetate, hydrochloric acid (25%), and sodium hydroxide were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), and ammonium formate from Fluka (Buchs SG, Switzerland). A stock solution of amprolium (1 mg/mL) was prepared in Milli-Q water and was stored at 4°C for a maximum of 4 weeks.

SPE cartridges ENVI-Carb (500 mg, 3 mL) were provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Nylon-syringe filters 0.45 μm were obtained from Tecknokra (Barcelona, Spain). Water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2 Instrumentation

CZE experiments were performed on a Beckman P/ACE MDQ CE instrument (Fullerton, CA, USA) equipped with a diode array detection system. Uncoated fused-silica capil-

laries (Beckman) with a total length of 57 cm (effective length 50 cm) \times 50 μm id and a 150 mM acetic acid-ammonium acetate buffer (pH 4.5): methanol (60:40 v/v) solution as BGE was used. Capillary temperature was held at 25°C. The buffer was filtered through a 0.45 μm membrane filter, and degassed by sonication before use. Samples were loaded by using electrokinetic injection (+10 kV, 35 s), and FASI as in-line preconcentration was used. FASI was performed as follows: the capillary was filled with the BGE and a water plug (40 s, 3.5 kPa) was hydrodynamically introduced, then the samples were electrokinetically injected (+10 kV during 50 s) into the capillary. The electrophoretic separation was performed by applying +30 kV through the capillary. Direct UV detection was carried out at 234 nm. The CE instrument was controlled using a Beckman P/ACE station software version 1.2.

New capillaries were pretreated using 0.1 M hydrochloric acid for 30 min, water for 30 min, 1 M sodium hydroxide for 30 min, and finally were washed with water for 30 min. At the beginning of each session, the capillary was rinsed with sodium hydroxide, water, and with the carrier electrolyte for 30 min each. The capillary was rinsed with carrier electrolyte for 5 min between runs and stored after rinsing with water at the end of each session.

For MS experiments, the CE instrument was coupled to an LCQ Classic mass spectrometer (Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with a triaxial pneumatically assisted ESI source and with an ion-trap mass analyzer. A standard solution of 10 $\mu\text{g/mL}$ of amprolium was used to optimize CE-MS coupling parameters. This solution was infused into the ESI source applying simultaneously an electrophoretic voltage of +20 kV and an over-imposed pressure of 5 kPa on the CE inlet vial and +4 kV as electrospray needle voltage. A solution of methanol:BGE (80:20 v/v) at a flow rate of 10 $\mu\text{L/min}$ was used as sheath liquid. The ESI was pneumatically assisted using nitrogen as sheath gas at a flow rate of 8 arbitrary units (a.u.) The heated capillary temperature was held at 25°C. The CE capillary protrudes 0.1 mm from the electrospray needle, and the distance to the heated capillary was 1.5 cm.

CE-MS data acquisition was carried out in positive full-scan mode from m/z 50 to 300 in centroid mode using a maximum injection time of 50 ms and performing 1 μscan . For the product ion-scan experiments, an isolation width of m/z 1.5 was applied and the trapping ratio frequency voltage (AQ) was set at 0.300 while the activation time (AT) was 30 ms. MS data were processed with an Xcalibur 2.1 software version.

2.3 Sample preparation and clean-up procedure

Whole egg samples were homogenized using an Ultraturax T25 basic (IKA-Werke, Staufen, Germany) and stored at -18°C until analysis. Subsamples of 0.5 g were weighted into 2 mL eppendorfs and 1.5 mL of ACN was added. The samples were first vortex mixed for 1 min and then they were set in a Sonorex RK100 ultrasonic bath (Bandelin Electronic,

Berlin, Germany) for 20 min; finally they were vortex mixed again for 1 min. After that, they were centrifuged at 4000 rpm for 5 min using a Selecta Centronic centrifuge (Selecta, Barcelona, Spain). A 1 mL portion of the supernatant liquid was transferred into a 15 mL Falcon tube and 9 mL of water was added. For cleanup, ENVI-Carb cartridges were conditioned with 3 mL of methanol followed by 3 mL of water:ACN (90:10) using a Supelco Visiprep vacuum manifold (Supelco, Gland, Switzerland). Then the extract was passed through the sorbent material, washed with 3 mL of water, and finally eluted with 1 mL of methanol. The methanol solution was evaporated to dryness and finally reconstituted in 500 μ L of water. Each extract was filtered through 0.22 μ m pore size Ultrafree-MC Centrifugal Filters (Millipore, Bedford, USA) before injection into the CE system using the FASI procedure.

3 Results and discussion

3.1 Electrophoretic conditions

To determine the optimum conditions for the analysis of amprolium by CZE, two acidic buffers were tested as BGE. Formic acid-ammonium formate ($3.0 \leq \text{pH} \leq 4.5$) and acetic acid-ammonium acetate ($4 \leq \text{pH} \leq 5.5$) were selected and the effect of their concentration from 25 to 200 mM as well as the pH were studied. For these tests, hydrodynamic injection (15 s, 3.5 kPa) of a 20 μ g/mL standard solution prepared in water was used and a capillary voltage of +20 kV was applied to perform the electrophoretic run. This systematic optimization provided very similar results for both electrolytes showing the worst sensitivity at low pHs and concentrations and the best results at higher values of both studied parameters. As an example of the effect of the buffer concentration on the amprolium response Fig. 1A shows the electropherograms obtained when using the acetic acid-ammonium acetate buffer at pH 5.0 at increasing concentrations. As can be seen, the amprolium signal improved considerably with the buffer concentration despite an increase in the analysis time. The increase in the analysis time is easily explained by the rise in the ionic strength that lowers the effective electric field and hence the ion velocity, while the improvement of the amprolium signal is due to a higher stacking effect at this buffer concentration since the injected sample is prepared in pure water giving as a result a narrowing of the peak. Since signal improvement at concentrations higher than 150 mM was not noteworthy, this value was chosen as the optimum in order to avoid high capillary currents. The effect of pH was then studied from 3.0 to 5.5 with formic/formate and/or acetic/acetate buffers at a concentration of 150 mM. The electropherograms obtained at each tested pH condition for the acetic acid-ammonium acetate buffer are shown in Fig. 1B where it can be observed an important increase in the amprolium signal and also a slight increase in migration time when pH raised up to 5.0. Since a pH value over 5 did not significantly improve the response of amprolium and yielded

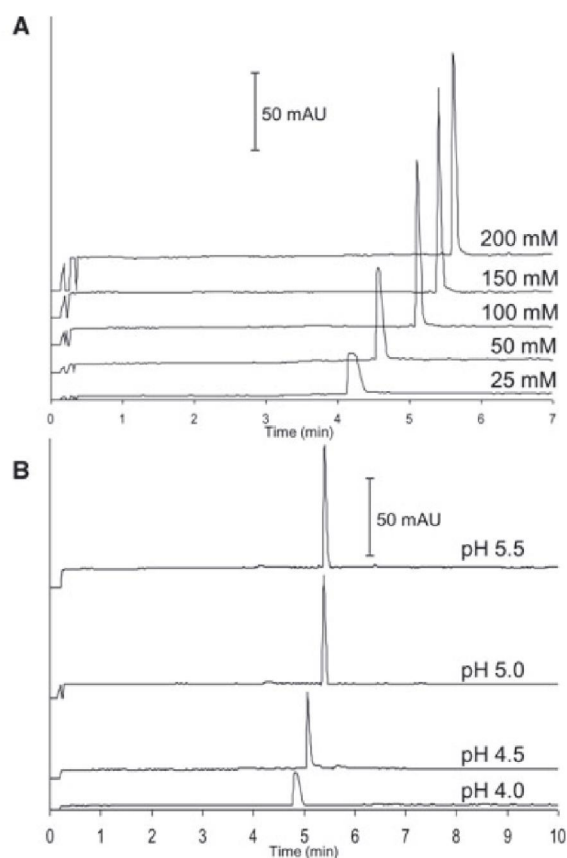


Figure 1. (A) Buffer concentration optimization (ammonium acetate/acetic acid pH = 5.0). (B) Buffer pH optimization (150 mM ammonium acetate/acetic acid).

to high capillary current values, pH 5.0 was chosen as the optimum. In general, slightly better peak shapes, signal intensity and lower current values were obtained when using acetic acid-ammonium acetate, so, this buffer, (150 mM, pH 5.0) was selected as optimum BGE for the CZE determination of amprolium. Finally, injection time for electrokinetic injection was evaluated and as expected, an increase in the injection time yielded to higher responses up to a certain value from which peak broadening was observed. The optimum value was then established at 35 s for electrokinetic injection mode.

To increase sensitivity, the use of an in-line preconcentration method, FASI, was investigated. This technique takes advantage of the difference in mobility and conductivity between the sample matrix and the BGE to preconcentrate the analyte. The effect of two high-resistivity solvents, water, and methanol was studied. To perform these tests, a 100 ng/mL amprolium standard solution prepared in water was used. Although a significant increase in the response of amprolium was observed for both solvents, methanol caused the electrophoretic voltage to frequently fail, probably due to the formation of bubbles in the capillary. For this reason, a plug

Table 1. Instrumental quality parameters

	CZE Electrokinetic injection	FASI-CZE
LOD ($\mu\text{g/L}$)	1	0.25
Sensitive enhancement	–	4
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	3	0.75
Run-to-run precision (%RSD, $n = 6$)		
Migration time	0.4	0.5
Concentration		
Low level (LOQ)	12	11
Medium level	7 ^{a)}	7 ^{b)}
Day-to-day precision (% RSD, $n = 3 \times 6$)		
Migration time	1.6	3.0
Concentration		
Low level (LOQ)	18	13
Medium level	14 ^{a)}	10 ^{b)}
Working range ($\mu\text{g/L}$)	3.2–480	0.9–470
Correlation coefficient (r^2)	≥ 0.999	≥ 0.999

a) 55 $\mu\text{g/L}$.b) 27 $\mu\text{g/L}$.

of water was used. Injection times for both the plug of water (hydrodynamic mode) and the sample (electrokinetic mode) were simultaneously optimized. Hydrodynamic injection (3.5 kPa) of a water plug from 5 to 40 s, and electrokinetic sample injection (10 kV) from 5 to 60 s were tested. The best results were obtained with a water plug hydrodynamic injection time of 40 s and a sample electrokinetic injection time of 50 s. Under these conditions, an instrumental sensitive enhancement of 1600-fold with respect to hydrodynamic injection was achieved. Obviously, when increasing injection time an enhancement of the response was observed; however, peak broadening occurred at sample injection times higher than the selected value.

3.2 Instrumental quality parameters

Instrumental quality parameters using electrokinetic injection and FASI under optimal conditions were calculated and the figures of merit are given in Table 1. The LOD and the LOQ, based on an S/N of 3:1 and 10:1, respectively, were calculated using standard solutions at low concentration levels. The use of CZE with electrokinetic injection provided a LOD of 1 $\mu\text{g/L}$. When FASI-CZE was applied, a four-fold enhancement was achieved obtaining a LOD of 0.25 $\mu\text{g L}^{-1}$. The low LODs achieved with both electrokinetic injection and FASI would allow the analysis of amprolium at the levels required by the current legislation.

Run-to-run and day-to-day precisions for amprolium quantification were calculated at two concentration levels, a low level (LOQ) and medium level (55 $\mu\text{g L}^{-1}$ for electrokinetic injection, and 27 $\mu\text{g L}^{-1}$ for FASI). In order to obtain the run-to-run precision, six replicate determinations for each

concentration level were carried out using the two injection modes under optimal conditions. On the other hand, day-to-day precision was calculated by performing 18 replicate determinations of each concentration level on 3 nonconsecutive days (six replicates each day). The RSDs obtained for run-to-run and day-to-day precisions with CZE using injection were 7.6 and 14.9%, respectively, at the medium concentration level. The values increased to 12.8 and 18.8% when the low concentration level was evaluated, as expected, being RSDs values quite acceptable for CZE methodologies. For both, electrokinetic and FASI injection modes, the RSDs obtained for run-to-run and day-to-day precisions were quite similar. This is explained by the great dependence of the electrokinetic injection mode on the EOF and the electrophoretic mobility of the solute [13]. In terms of migration times good run-to-run and day-to-day precisions were obtained in all cases (Table 1) with RSDs values from 0.4 to 3%.

Calibration curves based on amprolium peak area at the working ranges indicated in Table 1 were obtained showing good linearity, with correlation coefficients (r^2) higher than 0.999.

3.3 Sample treatment and clean-up procedure

In a previous study carried out in our research group, amprolium was extracted from egg samples using 10 mL of ACN and the extracts were directly analyzed by LC-MS/MS [7]. The same procedure was tested for the FASI-CZE method, however the direct injection of the ACN-based extract did not provide good results since current leakage occurred when electrokinetic injection was being performed. Another approach, evaporation of the extract to dryness and subsequent reconstitution in water was neither effective, probably due to the presence of other cationic species such as sodium or calcium in the final extract that prevented the appropriate preconcentration of the analyte under FASI conditions. These facts highlighted the need of a proper clean-up procedure in order to obtain extracts clean enough to be submitted to the FASI-CZE method. For this purpose SPE was used, however, most of the sorbent materials require the loading of a water-based solvent to retain the analytes, which means that the solvent extract must be changed before the loading step. This was performed by the addition of water (9 mL) up to a 90% in the final extract. Two different cartridges were tested; a graphitized carbon material, ENVI-Carb (Supelco) that presents quite important retention for aromatic compounds due to π - π interactions, and a polymeric column, Oasis MCX (Waters) (mixed mode cation exchange). In the first stage of the optimization, standard solutions prepared in ACN:H₂O (10:90) were used. For the elution of amprolium from the ENVI-Carb cartridge just 1 mL of methanol was necessary to obtain a recovery over 90%. However, Oasis MCX could not be used for the analysis of amprolium since ammonium hydroxide must be used to release this compound from the cationic exchanger, remaining in the final extract and preventing the entrance of amprolium into the capillary by electrokinetic injection. So, the Envi-Carb

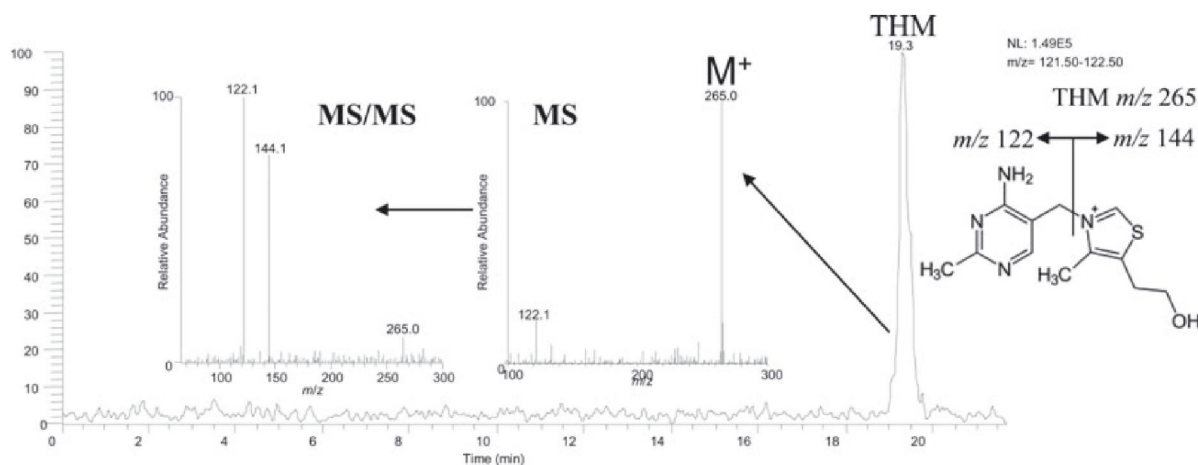


Figure 2. Electropherogram of thiamine and its MS and MS/MS spectra.

cartridges were selected for the off-line preconcentration of egg samples.

3.4 Validation

Blank egg samples previously analyzed by LC-MS/MS in our laboratory [7] were used in order to evaluate the applicability of the FASI-CZE method for the determination of amprolium. Sample treatment was performed following the procedure described in Section 2.4. However, in the electropherograms corresponding to the nonspiked blank samples a peak with a very similar UV spectrum appeared at the migration time of amprolium that indicated the presence of a matrix interference with characteristics similar to amprolium that must be separated from our analyte in order to avoid false positives and errors in the quantification. In the literature, it is described that amprolium is actually a thiamine (Vitamin B1) analogue that blocks the transport of this vitamin preventing the carbohydrate synthesis in the coccidia. Concentration values of thiamine in eggs around 0.1 mg/100 g product have been reported (<http://nutritiondata.self.com/facts/dairy-and-egg-products/111/2>, 18/07/12), so, in a first attempt to identify the observed interference, thiamine was considered as a candidate. A standard solution of this product as well as a mixture of thiamine and amprolium were prepared and injected in the electrophoretic system. In both cases only one peak was observed at the migration time of amprolium and identical UV spectra were obtained that were consistent with the formulated hypothesis. However, in order to conclude unequivocally that the interference of the egg matrix was thiamine some more evidence of identity was necessary. For this purpose, the electrophoresis was coupled to a mass spectrometer provided with an IT mass analyzer. ESI-MS instrumental parameters such as sheath liquid and sheath gas flow rates, sheath liquid composition, and electrospray voltage were optimized in order to obtain the highest response

for thiamine and are indicated in the experimental section. To check the optimum operation of the CE-MS system, a standard solution of thiamine was injected and data were acquired in both, full scan and product ion scan modes. The full scan spectrum showed as base peak the ion at m/z 265 that corresponds to the thiamine cation and in the product ion scan spectrum, two fragment ions at m/z 144 and 122 (Figure 2) corresponding to each of the moieties resulting from the cleavage of the N-C bond were present [14, 15]. Under these conditions, a blank egg sample extract was also injected and both full scan and product ion-scan spectra were acquired. Although the signal intensity of the interference was quite low, its full-scan spectrum showed as base peak an ion at m/z 265 while the product ion scan spectrum of this ion provided the same two fragments observed before for the thiamine standard (m/z 144 and 122). Considering the cationic nature of the compounds analyzed by CZE, the data provided by the mass spectrometric analysis and the information available in the literature this interference was identified as thiamine (Vitamin B1).

Once the interference was identified, CZE conditions were reoptimized to achieve the separation of both amprolium and thiamine. For this purpose, the addition of an organic solvent into the BGE was evaluated to achieve the complete separation of amprolium and thiamine. Methanol was added to the BGE from 10% to 40%. The addition of methanol had direct consequences on the separation, on one hand it allowed the baseline separation of amprolium from thiamine, but on the other, a substantial increase in the analysis time was observed. In order to reduce analysis time the separation was then performed at a higher voltage (+30 kV) without losing the separation previously achieved while the sensitivity was improved because of the narrowing of the amprolium peak (Fig. 3A).

In order to evaluate the method-quality parameters, blank egg samples were spiked at different known concentrations of amprolium, they were homogenized, and left to

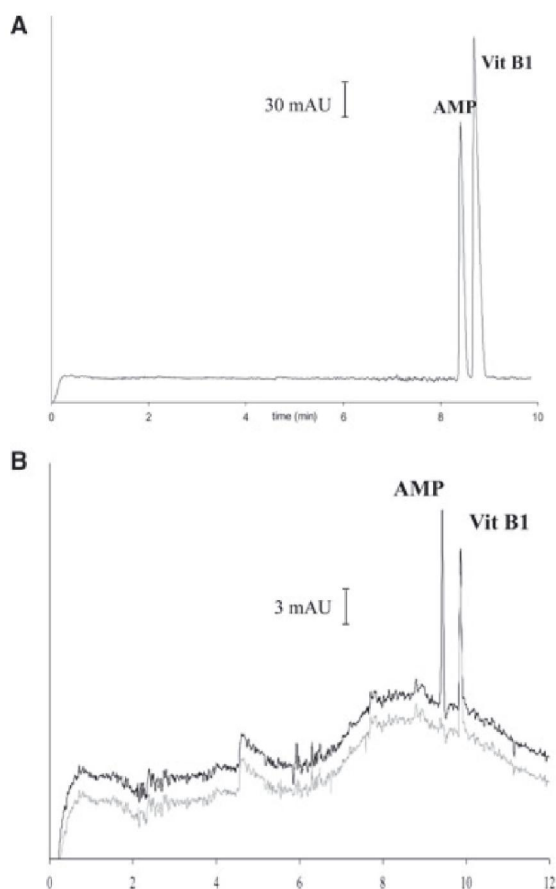


Figure 3. (A) Separation of Amprolium and Thiamine with 150 mM acetic acid-ammonium acetate pH 5.0: 40% MeOH buffer at 30 kV separation voltage. (B) Blank egg sample spiked at 100 µg/kg overlaid to a blank egg sample.

stand for an hour before they were submitted to the sample treatment. Following this procedure, a method limit of quantitation (MLOQ), based on an S/N ratio of 10, of 75 µg/kg was obtained. This MLOQ would make this method suitable for the determination of amprolium in egg samples in all the countries with established MRLs considering that these values are well over the obtained MLOQ. Figure 3B shows an electropherogram of a blank egg sample spiked at 100 µg/kg. To assess the recovery of the method as well, blank extracts were spiked at the same concentrations as before and an overall recovery value of 85% was obtained. Since amprolium was not detected in any of the commercial egg samples analyzed, in order to check the precision and accuracy of the proposed method a blank egg sample was spiked at two concentration levels, low and medium (75 µg/kg and 1000 µg/kg), and quantified using matrix-matched calibration. This quantitation method was preferred since the slopes of external calibration and matrix-matched calibration curves were significantly different mainly due to the variability of the amount of sample injected when using electrokinetic injection.

tion. Considerably low relative errors were obtained for the quantification of both concentration levels, 13.1% for the low level and 4.3% for the medium, while for run-to-run precision, of 14.2 and 9.5% were achieved, respectively. From these results, we can conclude that the FASI-CZE method showed good accuracy and precision, and it can be proposed as a suitable methodology for the screening and determination of amprolium in egg samples below the levels established by the different countries that have set an MRL for this compound in hen eggs.

4 Concluding remarks

In this study, it is demonstrated that FASI-CZE can be used for the determination of amprolium in egg samples. A quick and efficient sample treatment based on SPE using ENVI-Carb cartridges is proposed providing extracts suitable for the analysis of eggs by CE. However, an interference from the matrix eluting at the same migration time as amprolium prevented quantification. This compound was identified as thiamine (Vitamin B1) by coupling CZE to MS. The addition of MeOH to the BGE up to a 40% allowed the separation of the two compounds and to propose the method as a simple and cheap procedure for the determination of amprolium in egg samples. Under these new conditions, we were able to quantify amprolium in egg samples at concentrations above 75 µg/kg, which would fulfil the current legislation of non European countries. Good results in terms of run-to-run precision (%RSD <14) and accuracy (<13%) were also obtained.

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología under the project CTQ2009-09253. Anna Martínez Villalba wishes to thank the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología for an FPI grant.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Polin, D., Wynosky, E. R., Porter, N. J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1963, 114, 273.
- [2] Commission Recommendation 2005/187/CE, *Off. J. Eur. Commun. L229/7* (2005).
- [3] Commission Recommendation 2005/925/EC, *Off. J. Eur. Commun. L337/51* (2005).
- [4] Hamamoto, K., Koike, R., Shirakura, A., Sasaki, N., Machida, Y., *J. Chromatogr. B* 1997, 693, 489.
- [5] Furusawa, N., *J. Chromatogr. Sci.* 2002, 40, 355.
- [6] Tan, H. S. I., Ramachandran, P., Cacini, W., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1996, 15, 259.
- [7] Martínez-Villalba, A., Moyano, E., Galceran, M. T., *J. Chromatogr. A* 2010, 1217, 5802.
- [8] Squadrone, S., Mauro, C., Ferro, G. L., Amato, G., Abete, M. C., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008, 48, 1457.

- [9] Shihabi, Z. K., *Electrophoresis* 1998, 19, 3008.
- [10] Aturki, Z., Desiderio, C., Polcaro, C. M., *Chromatographia* 2001, 54, 489.
- [11] Quirino, J. P., Terabe, S., *Anal.Chem.* 1998, 70, 1983.
- [12] Kivánková, L., Boek, P., *Electrophoresis* 1985, 6, 143.
- [13] Schaeper, J. P., Sepaniak, M. J., *Electrophoresis* 2000, 21, 1421.
- [14] Viñas, P., López-Erroz, C., KBalsalobre, N., Hernández-Córdoba, M., *J. Chromatogr. B* 2001, 757, 301.
- [15] Leporati, A., Catellani, D., Suman, M., Andreoli, R., Manini, P., Niessen, W. M. A., *Anal. Chim. Acta* 2005, 531, 87.

2.2.5. ARTICLE CIENTÍFIC V

Ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples

A. Martínez-Villalba, E. Moyano, M.T. Galceran
Journal of Chromatography A (2013) 1313, 119-131



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

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

Ultra-high performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization–tandem mass spectrometry for the analysis of benzimidazole compounds in milk samples

Anna Martínez-Villalba, Encarnación Moyano*, Maria Teresa Galceran

Analytical Chemistry Department, Chemistry Faculty, University of Barcelona, Av Diagonal 647, Barcelona 08028, Spain¹

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2013

Received in revised form 19 August 2013

Accepted 19 August 2013

Keywords:

Benzimidazoles

Veterinary drugs

Milk

UHPLC–MS/MS

Mass spectrometry

APCI

ABSTRACT

In this work the atmospheric pressure ionization behavior and the tandem mass spectrometry fragmentation of 19 benzimidazoles was studied. Several atmospheric pressure ionization (API) sources (ESI, APCI and APPI) were evaluated showing that APCI was the best option, mainly for KETO-TCB that provided a 20 times improvement versus ESI. From the studies of tandem mass spectrometry, fragmentation pathways were proposed thus characterizing the most abundant and interesting product ions and selecting the most abundant and selective ones for the confirmatory quantitative method performed in SRM mode in a triple quadrupole mass analyzer. For quantitative analysis, the 19 benzimidazoles were separated in less than 7 min using a C₁₈ column packed with superficially porous particles providing high efficiency within the range of UHPLC. A QuEChERS-like sample treatment was applied to milk samples before the UHPLC–APCI–MS/MS determination providing method limits of quantitation that ranged from 0.6 to 3 μg kg⁻¹ and showing good repeatability (RSD: 2–18%) and accuracy (relative errors: 1–23%) suitable for using this method for routine analysis.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Helminthic parasites are considered one of the most economically important constraints in rearing livestock since the infections they provoke result in reductions in milk yields and weight gain [1]. Confined and pasture based animals are generally exposed to worms at some point of their lifetime, so they are regularly dewormed with commercial anthelmintics [2]. Benzimidazole compounds are one of the most common drugs used for the treatment and prevention of helminthic parasites and are administered orally to farm animals at relatively high concentrations (milligrams per kg of body weight). These drugs undergo extensive metabolism [3] and as a result several metabolites, in addition to the parent compound, can be found in animal tissues for human consumption. To protect consumers from risks related to continuous exposure to benzimidazole residues, which may involve teratogenicity or congenic malformations, maximum residue limits (MRLs) have been set for marker residue (the sum of a parent drug and/or their metabolites) in animal products [4,5].

Serving this purpose, several analytical methods have been published for the determination of one or several benzimidazoles in

different food matrices [6–34]. Most of these methods are based on liquid chromatography [6–23] although capillary electrophoresis methods [25–28] have also been developed for the determination of thiabendazole as fungicide in fruits and vegetables [25–27] and more recently for the determination of ten benzimidazoles in egg samples [28]. The ELISA test [24] has been also proposed in the literature for qualitative analysis only. However, due to the spread of ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC), this is becoming the most extended technique [22,31–34], that produces narrower peaks than the classical UHPLC, thus increasing sensitivity and reducing chromatographic run time [35] which are definitely great advantages. Regarding detection systems, UV was the detector used in the early years [6–10] but mass spectrometry is gradually becoming the technique of choice [12–23,30–36], especially for multi-residue analysis of veterinary drugs, including some benzimidazoles. The vast majority of the published methods commonly used tandem mass spectrometry (MS/MS) with triple quadrupole (QqQ) mass analyzers [12–16,36] that operated in selected reaction monitoring (SRM) mode, thus providing high sensitivity and selectivity for quantitative confirmatory analysis, as it is required to fulfill the current legislation that calls for at least three identification points when analyzing these substances in food matrices [37]. However, some authors applied high-resolution MS using time of flight (TOF) analyzers, mainly for screening purposes [31–33]. Regarding ionization sources, electrospray (ESI) is the most frequently chosen since it is considered as the most efficient

* Corresponding author. Tel.: +34 934039277; fax: +34 934021233.
E-mail address: encarna.moyano@ub.edu (E. Moyano).

¹ Tel: +34 934039277; fax: +34 934021233.

for the ionization of these compounds with both, positive and negative ionization modes, although some authors observed significant ion suppression problems in the analysis of real samples [13,30,34]. Only one reference has been found in the literature, comparing thermospray and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) for the analysis of thiabendazole and its major metabolite, 5-hydroxythiabendazole [23]. In relation to sample treatment, different strategies were followed depending on the sample matrix (liver, muscle, eggs, feed, plasma or milk) and the detection system to be used (MS or UV). The spectrophotometric detection is usually more demanding in terms of extract cleanliness, requiring multi-stage extractions with several organic solvents and extensive clean-up steps [8,10]. For instance, for the analysis of milk samples by HPLC-UV, De Ruyck et al. [10] performed sequential liquid–liquid extractions using acetonitrile, ethyl acetate, iso-octane, methylene chloride, di-sodium hydrogen phosphate and sodium 1-octanesulphonate solutions. In contrast, due to the high selectivity of the MS/MS methods, more simple strategies based on solid phase extraction (SPE) [7–9,12,14,16,18] or QuEChERS [14,22,28] were followed when LC–MS was used, making the analysis more reliable and less time-consuming. Recently, an on-line sample preparation system coupled to HPLC has also been applied for the analysis of eleven benzimidazoles in milk samples [36], offering the advantage of minimum sample handling prior to the analysis, although the use of conventional HPLC leads to long chromatographic run time (>30 min).

Among the different target tissues and samples in which benzimidazoles are regulated, milk is one of the most important commodities that must be controlled. Milk is widely consumed during the childhood and it is also used as raw material for many other processed products, what makes milk one of the most consumed farmer commodities around the world. Taking these facts into account, quality control of this product is an issue of concern for authorities, so reliable analytical methodology must be available in order to guarantee product safety. Until now, few methods were available for the analysis of these compounds in milk [13,14,19,22,36], and very few of them were fast, provided the confirmatory information required nowadays, and included the whole set of compounds of this family of veterinary drugs.

In this work the ionization of 10 benzimidazoles and 9 metabolites with different API sources (ESI, APCI and APPI) have been evaluated to select the most sensitive one for the analysis of the whole set of compounds by UHPLC–MS. Tandem mass spectrometric behavior of the benzimidazole family has been also studied to characterize the product ions and to select the most abundant and selective ones that can be used for the quantitative confirmatory method. The final objective of the work has been to propose an UHPLC–MS/MS method selective and sensitive enough to analyze these compounds in milk samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Thiabendazole (TBZ), oxfendazole (OFZ), oxbendazole (OXI), fenbendazole (FBZ), febantel (FEB), triclabendazole (TCB), mebendazole (MBZ) and mebendazole- d_3 (MBZ- d_3) were purchased from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany). Albendazole (ABZ), albendazole 2-aminosulfone (ABZ-NH₂-SO₂) and cambendazole (CAM) were supplied by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Flubendazole (FLU), 5-hydroxythiabendazole (TBZ-OH), albendazole sulfone (ABZ-SO₂), albendazole sulfoxide (ABZ-SO), 5-hydroxymebendazole (MBZ-OH), fenbendazole sulfone (FBZ-SO₂), aminoflubenbendazole (FLU-NH₂), keto-triclabendazole (KETO-TCB), mebendazole amino (MBZ-NH₂) were obtained from WITEGA

Laboratorien Berlin-Adlershof GMBH (Berlin, Germany). Chemical structures, acronyms and some physicochemical properties are given in Table 1.

LC–MS grade water, methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN) and HPLC-grade N,N-dimethylformamide, acetone, toluene, chlorobenzene, anisole, and tetrahydrofuran were purchased from Riedel–de-Haën. Formic acid (98–100%) and acetic acid (99%) as well as ammonium hydroxide solution (25%, w/w), ammonium formate and ammonium acetate ($\geq 99.0\%$) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride (NaCl) and anhydrous magnesium sulfate (MgSO₄) ($\geq 99.0\%$) were obtained from Sigma–Aldrich (Steinheim, Germany) while Primary Secondary Amine (PSA) and octadecylsilane (C₁₈) sorbents were provided by Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Stock standard solutions (1 mg mL⁻¹) were prepared in N,N-dimethylformamide and stored at 4 °C while 1 μ g mL⁻¹ working standard solutions were prepared weekly by dilution in acetonitrile:water (5:95, v/v).

Nitrogen (99.8%) supplied by Claind Nitrogen Generator N₂ FLO (Lenno, Italy) was used for the atmospheric pressure ionization (API) source. High-purity argon (Ar₁) (>99.999%) were used as fragmentation gas in the Collision Induced Dissociation (CID) cell of the QqQ instrument and helium (>99.999%) was the damper gas in the ion trap analyzer. Both gases were purchased from Air Liquide (Madrid, Spain).

2.2. Instrumentation

An ultra-high liquid chromatograph Accela (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a quaternary pump, a Photo Diode Array (PDA) detector, an autosampler and a column oven was used. Reversed-phase separation of analytes was performed on an Ascentis Express C18 column (150 mm \times 2.1 mm i.d., 2.7 μ m particle size, superficially porous particles) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The mobile phase consisted on solvent A 0.1% formic acid and solvent B acetonitrile working in gradient elution mode. The gradient program was as follows: first an isocratic step at 5% solvent B was held for 0.7 min and then the organic modifier percentage increased to 25% during 1.3 min, in a third stage solvent B was raised to 40% in 2 min and to 100% in 4 min more and held for 1 min at this percentage before returning to the initial settings. The flow rate was set at 500 μ L min⁻¹, the column temperature was 25 °C, and the sample volume injected was 10 μ L.

The ultra-high liquid chromatography system was coupled to a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) mass spectrometer equipped with electrospray (ESI), atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photoionization (APPI) and a triple quadrupole as mass analyzer. Nitrogen (purity >99.98%) was used as sheath gas, auxiliary gas and sweep gas at flow rates of 20, 10 and 6 a.u. (arbitrary units) respectively. Ion-transfer tube temperature was set at 200 °C; APCI current discharge and vaporizer temperature were set at 15 μ A and 300 °C, respectively; ESI voltage was 4 kV while a krypton lamp (10 eV) was used for APPI. Data were acquired in MS/MS using selected reaction monitoring (SRM). Two transitions were monitored for each compound using 50 ms of dwell time and 1 μ scan/scan and argon as collision gas at 1.5 mTorr. Collision energy (CE) was ranged between 5 and 35 eV to select the optimum value for each transition. The chromatogram was segmented into four time windows and polarity switching was applied between the two last ones. The Xcalibur software version 2.0 (Thermo Fisher Scientific) was used to control the UHPLC/MS system and to process data.

For fragmentation studies, a LCQ Classic instrument (ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ion trap mass analyzer and APCI source was also used. The APCI working

Table 1
Names, acronyms and physicochemical properties of the studied benzimidazoles.

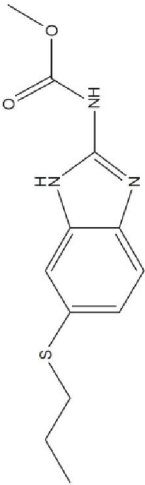
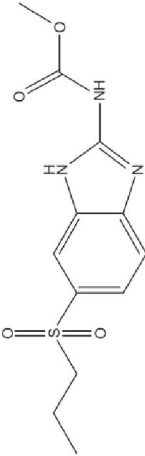
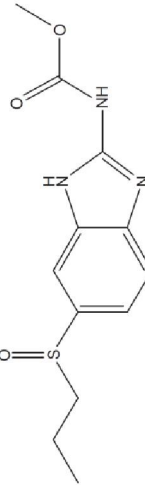
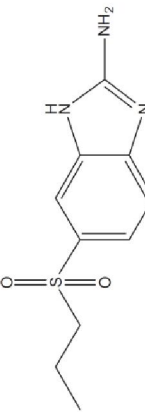
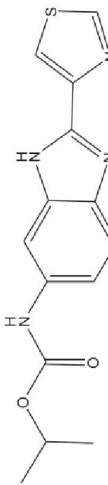
Name (acronym)	Chemical Structure	Molecular formula	Monoisotopic mass	pK _a ^a
Albendazole (ABZ)		C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	265.1	4.75
Albendazole sulfone (ABZ-SO ₂)		C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₄ S	297.1	3.38
Albendazole sulfoxide (ABZ-SO)		C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	281.1	3.65
Albendazole 2-aminosulfone (ABZ-NH ₂ -SO ₂)		C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	239.1	6.23
Cambendazole (CAM)		C ₁₄ H ₁₅ N ₄ O ₂ S	302.1	2.98 4.94

Table 1 (Continued)

Name (acronym)	Chemical Structure	Molecular formula	Monoisotopic mass	pK _a ^a
Febantel (FEB)		C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S	446.1	5.83
Fenbendazole (FBZ)		C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	299.1	4.35
Fenbendazole sulfone (FBZ-SO ₂)		C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	331.1	3.61
Flubendazole (FLU)		C ₁₆ H ₁₂ N ₃ O ₃ F	313.1	4.37
Flubendazole amino (FLU-NH ₂)		C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O ₃ F	255.1	7.23

Mebendazole (MBZ)		$C_{16}H_{13}N_3O_3$	295.1	4.38
5-Hydroxymebendazole (MBZ-OH)		$C_{16}H_{13}N_3O_3$	297.1	4.93
Mebendazole amino (MBZ-NH ₂)		$C_{14}H_{11}N_3O$	237.1	7.23
Oxfendazole (OFZ)		$C_{15}H_{13}N_3O_3S$	315.1	4.08
Oxibendazole (OXI)		$C_{12}H_{15}N_3O_3$	249.1	4.99
Thiabendazole (TBZ)		$C_{10}H_7N_3S$	201.0	2.83 5.69
5-Hydroxythiabendazole (TBZ-OH)		$C_{10}H_7N_3OS$	217.0	2.93 5.63

Table 1 (Continued).

Name (acronym)	Chemical Structure	Molecular formula	Monoisotopic mass	p <i>K_a</i> ^a
Triclabendazole (TCB)		C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₂ Cl ₃	358.0	2.95
Keto-Triclabendazole (KETO-TCB)		C ₁₃ H ₇ N ₂ O ₂ Cl ₃	328.0	11.84

^a p*K_a* values were obtained from SPARC v4.6 (<http://fbmic2.chem.uga.edu/sparc>).

conditions were: sheath gas and auxiliary gas (N₂) flow rates at 40 and 12 a.u. (arbitrary units) respectively, heated capillary temperature, 200 °C, current discharge, 8 μA and vaporizer temperature 300 °C. Product ion spectra for multi-stage mass spectrometry (MSⁿ) experiments were acquired (*m/z* 50–500) in profile mode using an isolation width of 1.5 *m/z* units and 3 μscans/scan. The maximum injection time and activation time were 200 ms and 30 ms, respectively. The trapping radio-frequency voltage (AQ) as well as the normalized collision energy (NCE) was adjusted for each compound and for every MS stage.

Tuning and multi-stage mass spectrometry experiments were performed by infusing 1 μg mL⁻¹ individual standard solutions of each compound using a built-in syringe pump at a flow rate of 10 μL min⁻¹ in an LC flow of 200 μL min⁻¹ using a Valco zero dead volume tee piece (Supelco, Alcobendas, Spain).

2.3. Sample analysis

A sample treatment, previously developed in our laboratory, was applied to the analysis of milk samples [38]. Milk samples of different fat content were purchased in local supermarkets in Barcelona (Spain). Sub-samples of 10 g were weighted into 50 mL tubes, fortified with analytes and/or internal standard (MBZ-*d*₃, 20 μL, 10 μg mL⁻¹) and let to stand for 15 min. Extraction was performed by adding 10 mL of acetonitrile with 0.1% NH₃ followed by 5 g of MgSO₄·NaCl (4:1,w/w). Samples were immediately shaken for 1 min in order to prevent the formation of agglomerates during MgSO₄ hydration and centrifuged at 5000 rpm for 5 min on a Selecta Centronic centrifuge (Selecta, Barcelona, Spain). For sample clean-up, 1 mL of supernatant was transferred into a 2 mL eppendorf containing MgSO₄ (150 mg), C₁₈ (50 mg) and PSA (50 mg). The sample extract was vortex mixed for 1 min and centrifuged at 3000 rpm for 2 min. An aliquot of the supernatant (500 μL) was evaporated to dryness under a nitrogen stream and reconstituted in acetonitrile:water (5:95). Each extract was filtered through 0.22 μm pore size Ultrafree-MC Centrifugal Filters (Millipore, Bedford, USA) before injection into the UHPLC–MS/MS system.

Internal standard matrix-matched calibration was used to quantify samples. Matrix-matched calibration standards were prepared by spiking blank whole milk samples at 6 concentration levels (1–500 μg L⁻¹), adding mebendazole-*d*₃ as internal standard (25 μg L⁻¹). These blank spiked samples were analyzed by UHPLC–MS/MS after applying the above described sample treatment.

3. Results and discussion

3.1. Mass spectrometry

Mass spectrometry behavior of benzimidazoles under atmospheric pressure ionization was studied. Three different ionization sources (ESI, APCI and APPI) were tested along this study using acetonitrile:water (0.1% formic acid) (50:50, v/v). When working with ESI and APCI in positive ionization mode, all the compounds gave as base peak the protonated molecule [M+H]⁺ with the exception of KETO-TCB which did not provide any stable ion. When switching to negative ionization mode the whole set of compounds, including KETO-TCB, showed the deprotonated molecule [M–H]⁻ as the most intense ion of the spectrum. In general, a similar behavior was observed for benzimidazoles in both ESI and APCI, but with slightly higher responses in APCI (up to 10% increase), except for KETO-TCB that showed an important signal improvement in APCI, providing signal intensity 20 times higher than in ESI without a significant increase in the background noise. In positive mode higher signal intensity was obtained for most of the compounds except

for those with chlorine atoms in their structure, TCB and KETO-TCB, for which negative ionization provided better sensitivity due to the electronegativity of the chlorine that stabilized the negative charge. FEB provided very similar ion intensities in both positive and negative modes, so the polarity for this compound could be chosen depending on the chromatographic separation. APPI was also evaluated for the ionization of this family of compounds. The 10% post-column addition of several dopants (toluene, acetone, tetrahydrofuran, anisole and chlorobenzene) was evaluated to improve the ionization. The best results were obtained with anisole, although the responses were always lower than those found with APCI. In addition to a low response, in some cases the ion signal, $[M+H]^+$ or $[M-H]^-$, decreased because of the additional generation of radical molecular ions ($[M]^{\bullet+}$, $[M]^{\bullet-}$) (relative abundances up to 40–100%). So, the use of APPI was discarded. Since, among the three ionization sources tested, APCI provided the best signal intensity and it was the only one that allowed the analysis of all benzimidazoles, including the metabolite KETO-TCB, APCI was selected for the determination of benzimidazoles by UHPLC–MS/MS.

With the aim of characterizing the product ions obtained in tandem mass spectrometry and selecting the most abundant and selective ones for quantitation and confirmation purposes, experiments were performed using two mass analyzers, an ion trap and a triple quadrupole. The ion trap provided the progeny of product ions by studying the multiple-stage mass spectra (MS^n) through the sequential isolation of the most abundant ions, and this information was used to assign product ions observed in the triple quadrupole system that can be generated by multiple collisions. Table 2 summarizes the most important product ions observed in the ion trap up to MS^3 . The spectra of the compounds were obtained in positive mode except for FEB, TCB and KETO-TCB that were acquired in negative mode. In positive mode, the MS/MS spectrum of benzimidazoles with a methyl carbamate group in the imidazole ring was dominated by the product ion generated by the loss of CH_3OH (32 Da) due to the carbonyl α -cleavage of the carbamate group. The third generation ions (MS^3) of this group of compounds can be explained by the characteristic fragmentations of the functional groups on the phenyl ring, for instance propylthio $[M+H-CH_3OH-C_3H_6S]^+$, and propylsulfone $[M+H-CH_3OH-C_3H_6SO_2]^+$. When the carbamate group is bound to the phenyl ring, the main MS/MS fragmentation follows another pathway, as can be seen in the spectrum of CAM, which has an isopropyl carbamate group. In this case the loss of the isopropyl $[M+H-C_3H_6]^+$ is observed together with the subsequent fragmentation of the carbamate moiety in the MS^3 . On the other hand, some of the carbamate compounds (ABZ-SO and OFZ) have a sulfoxide group in the phenyl ring of the benzimidazole and this fact favored the sulfur α -cleavage to produce intense ions $[M+H-C_3H_6]^+$ and $[M+H-C_3H_6SO]^+$ for ABZ-SO and $[M+H-C_6H_5]^+$ and $[M+H-C_6H_5SO]^+$ for OFZ. The metabolite ABZ-NH₂-SO₂ showed an MS/MS fragmentation pattern similar to that observed for ABZ-SO₂ in MS^3 where after losing CH_3OH further fragmentation took place in the sulfone moiety. Finally, it must be pointed out that, among the carbamate compounds, MBZ-OH was the only one that showed one unique intense product ion at moderated collision energies. When increasing collision energy in MS^3 was possible to observe other product ions (Table 2), but with very low intensity. This is in agreement with the behavior of this compound in the triple quadrupole where very high collision energy has to be applied to obtain these additional product ions. However, their very poor signal and the important increase in the background noise prevented the use of these product ions for confirmation.

In contrast to the general behavior of this family of compounds, where the charge is always on the benzimidazole moiety, FLU-NH₂ yielded the carbonyl α -cleavage as base peak of the MS/MS spectrum with the charge remaining in the fluorobenzoyl moiety. In addition, those compounds that have a thiazolyl group in the

imidazol ring such as TBZ and its metabolite TBZ-OH, produced intense product ions due to the breakage of the thiazolyl ring at the heteroatoms, for instance $[M+H-CHN]^+$ in the MS/MS and $[M+H-CHN-CS]^+$ in the MS^3 .

In negative mode, the characteristic fragmentation of benzimidazole compounds with chlorine atoms, TCB and KETO-TCB, was based on the ether α -cleavage, $[M-H-C_6H_3Cl_2]^{-\bullet}$ and $[M-H-C_6H_3OCl_2]^{-\bullet}$, and the subsequent loss of HCl in the MS^3 . Nevertheless, for TCB the presence of the methylthio group favored the loss of CH_3 being this fragmentation the base peak of the spectrum. For FEB the loss of the carbamate group provided the base peak of the MS/MS spectrum while the breaking of the nitrogen-carbonyl bond of the methoxyacetyl amino group was observed in MS^3 .

As commented before, product ions observed in the triple quadrupole could be generated by fragmentation through multiple collisions, while in the ion trap ions are generally fragmented in one collision step. For this reason, in the MS/MS spectra obtained in a triple quadrupole, second and third generation ions can be found and used for the analysis. As an example, Fig. 1 shows product ion spectra obtained in the triple quadrupole for ABZ and its metabolites, ABZ-SO, ABZ-SO₂ and ABZ-NH₂-SO₂. In these mass spectra the progeny of the ions, according to the ion trap results obtained previously for these compounds, and the product ions selected for quantitation and confirmation purposes (quantifier and qualifier ions) are indicated. For quantitation the second-generation ions (MS/MS) have been selected, while as qualifier ions those of third-generation (MS^3) have generally been chosen. This pattern was followed for most of the studied compounds.

3.2. Ultra-high performance liquid chromatography–mass spectrometry

Although all benzimidazoles have the same essential chemical structure, with a benzene ring and an imidazole group, they show quite different chemical properties, especially in terms of pK_a (Table 1) and polarity depending on the substituent, and these differences are more acute between parent compounds and their metabolites. These facts hamper the optimization of the chromatographic separation when developing methods for the simultaneous analysis of the whole benzimidazole family and their metabolites. As preliminary study, an analytical column packed with superficially porous particles Ascentis Express C18 (150 mm \times 2.1 mm, 2.7 μ m) was tested using acetonitrile:water or methanol:water as mobile phase, gradient elution (from 10 to 100% organic modifier in 10 min) and photodiode array detector (PDA). Coelution between some compounds was observed with both organic solvents, but acetonitrile provided the shortest retention times and the lowest column backpressure, so this solvent was chosen for further studies.

In order to improve resolution, the effect of the aqueous phase pH on the chromatographic separation was studied. Several buffers such as formic acid/ammonium formate and acetic acid/ammonium acetate and also 0.1% formic acid aqueous phase, were tested. The pH was 2.65 for the formic acid solution and varied from 2.75 to 5.75 for the evaluated buffers. As an example Fig. 2 shows the chromatograms obtained at pH 2.65, 3.5 and 4.0. As the pH increased, most of the compounds were more retained due to the displacement of the acid–base equilibrium to the formation of the neutral species. This effect was more important for those compounds with low pK_a value and could explain the decrease in resolution observed between TBZ-OH (peak 1) and AZB-NH₂-SO₂ (peak 2) that coeluted at pH values higher than 3.50. In contrast, those compounds eluting at the highest percentages of ACN, such as KETO-TCB (peak 17) and FEB (peak 18), were not affected by changes in the pH range studied and as a result, the run time was similar. In general, a loss in resolution was observed at high pH: for

Table 2
Fragmentation of benzimidazoles in the ion trap analyzer. Ions observed and their corresponding assignments up to MS³.

Compound	MS		MS/MS		MS ³		
	m/z (%Rel.Ab.)	Ion assignment	m/z (%)	NCE (%)	m/z (%Rel.Ab.)	Ion assignment	NCE (%)
ABZ	266 (100)	[M+H] ⁺	20		234 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	25
ABZ-SO ₂	298 (100)	[M+H] ⁺	23		266 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	25
	282 (100)	[M+H] ⁺	25		250 (35) 240 (100)	[M+H-CH ₂ OH] ⁺ [M+H-C ₃ H ₆] ⁺	25
ABZ-NH ₂ -SO ₂	240 (100)	[M+H] ⁺	23		222 (15) 192 (10)	[M+H-C ₂ H ₄ O ₂] ⁺ [M+H-C ₃ H ₆ SO] ⁺	27
	303 (100)	[M+H] ⁺	25		198 (100) 133 (30)	[M+H-C ₃ H ₆] ⁺ [M+H-C ₃ H ₆ SO ₂] ⁺	25
FEB	445 (100)	[M-H] ⁻	15		370 (100)	[M-H-C ₂ H ₅ O ₂ N] ⁻	20
	300 (100)	[M+H] ⁺	25		268 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	28
FBZ	332 (100)	[M+H] ⁺	25		300 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	30
	314 (100)	[M+H] ⁺	23		285 (30) 282 (100)	[M+H-CH ₅ ON] ⁺ [M+H-CH ₃ OH] ⁺	25
FLU	256 (100)	[M+H] ⁺	23		256 (20) 123 (100)	[M+H-C ₂ H ₃ O ₂ H] ⁺ [M+H-C ₇ H ₇ N ₃] ⁺	27
	296 (100)	[M+H] ⁺	25		264 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	25
MBZ	298 (100)	[M+H] ⁺	25		266 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	35
	238 (100)	[M+H] ⁺	25		220 (20) 105 (100)	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-C ₇ H ₇ N ₃] ⁺	28
OFZ	316 (100)	[M+H] ⁺	23		284 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	25
	250 (100)	[M+H] ⁺	20		239 (25) 191 (80)	[M+H-C ₆ H ₅] ⁺ [M+H-C ₆ H ₅ SO] ⁺	25
TIBZ	202 (100)	[M+H] ⁺	20		175 (100)	[M+H-CH ₃ OH] ⁺	23
	218 (100)	[M+H] ⁺	22		200 (20) 191 (100)	[M+H-H ₂ O] ⁺ [M+H-CH ₃ OH] ⁺	25
TCB	357 (100)	[M-H] ⁻	25		342 (100) 212 (15) 196 (40)	[M-H-CH ₃] ⁻ [M-H-C ₆ H ₃ Cl ₂] ⁻ [M-H-C ₆ H ₃ OC ₂] ⁻	28
	327 (100)	[M-H] ⁻	25		182 (100)	[M-H-C ₆ H ₃ Cl ₂] ⁻	30

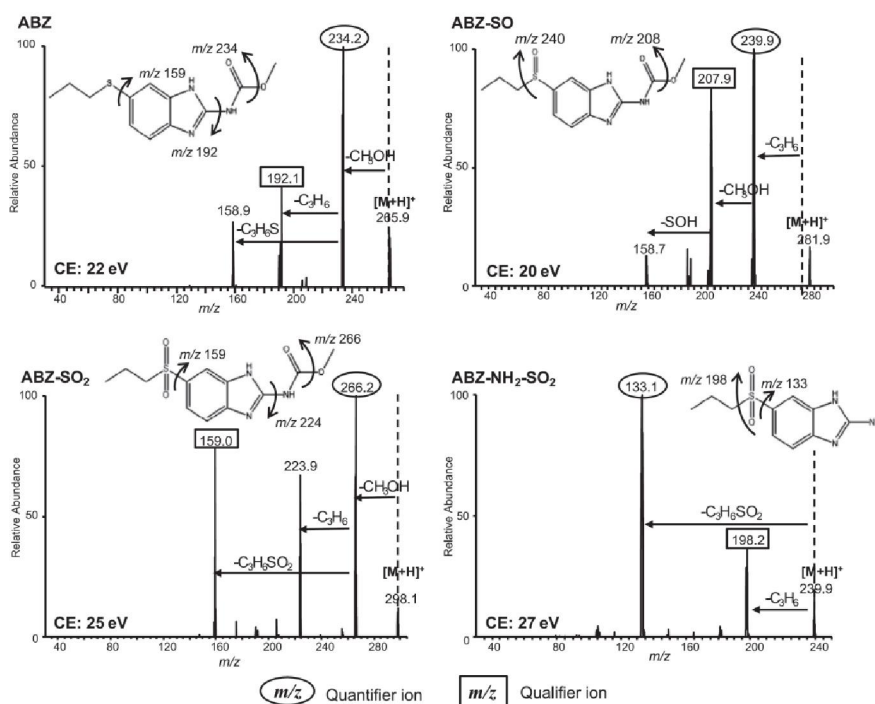


Fig. 1. Fragmentation spectra of albendazole and its metabolites in the triple quadrupole mass analyzer.

instance TBZ (peak 3) and ABZ-SO (peak 5) coeluted at pH 4.00, so a mobile phase with 0.1% formic acid was selected for the separation. In addition, at these conditions the best separation between ABZ-SO₂ (peak 10) and MBZ-OH (peak 7) was obtained, which is required since they are isobaric compounds that gave the same quantitation transition (Table 3). After optimizing the pH, the elution gradient was adjusted to get the best chromatographic resolution. The slope of the ACN gradient, in the first minutes of the run, was increased to reduce the retention times of the first eluting compounds up to two times the dead-time. Then the slope was decreased to obtain an acceptable resolution for the rest of compounds, mainly those

eluting in the middle of the chromatogram. For the last part of the chromatogram, the percentage of ACN was rapidly increased up to 100% since no resolution problems were observed with the three last eluting compounds. This UHPLC separation was coupled to the triple quadrupole mass spectrometer using APCI as ionization source and selected reaction monitoring as acquisition mode. The two most intense, characteristic and selective transitions were selected for each compound to fulfill the European legislation that requires 3 identification points to unequivocally identify the compounds. These transitions and their corresponding collision energies are given in Table 3. The chromatogram was segmented to

Table 3

Transitions followed and their corresponding collision energies (CE) for quantification and confirmation purposes in the triple quadrupole analyzer.

Schedule	Compound	<i>t_R</i> (min)	Quantification			Confirmation			Ion ratio		
			Precursor ion	Product ion	CE (eV)	Precursor ion	Product ion	CE (eV)			
APCI+	Segment 1	TBZ-OH	1.95	218.0	147.0	29	218.0	191.0	31	2.1	
		ABZ-NH ₂ SO ₂	2.33	240.0	133.0	27	240.0	198.0	20	1.4	
		TBZ	2.59	202.0	175.0	32	202.0	131.0	32	1.4	
	Segment 2	OXI	3.27	250.0	218.0	25	250.0	176.0	25	1.2	
		ABZ-SO	3.29	282.0	240.0	20	282.0	208.0	20	1.6	
		MBZ-NH ₂	3.35	238.0	105.0	28	238.0	77.0	33	1.2	
		MBZ-OH	3.45	298.0	266.0	25	-	-	-	-	
		FLU-NH ₂	3.52	256.0	95.0	35	256.0	123.0	25	1.1	
		CAM	3.66	303.0	217.0	26	303.0	261.0	20	1.6	
		ABZ-SO ₂	3.77	298.0	266.0	25	298.0	159.0	30	2.1	
		OFZ	3.86	316.0	159.0	30	316.0	191.0	27	1.6	
	Segment 3	FBZ-SO ₂	4.55	332.0	300.0	24	332.0	159.0	30	5.8	
		MBZ	4.76	296.0	264.0	25	296.0	105.0	30	10.2	
		MBZ- <i>d</i> ₃	4.77	299.0	264.0	25	299.0	105.0	30	10.1	
ABZ		4.83	266.0	234.0	22	266.0	192.0	20	5.4		
FLU		5.03	314.0	282.0	24	314.0	95.0	30	7.9		
Segment 4	FBZ	5.68	300.0	268.0	22	300.0	159.0	28	5.0		
	APCI-	Segment 4	KETO-TCB	6.33	327.0	182.0	30	327.0	146.0	30	8.1
			FEB	6.84	445.0	370.2	10	445.0	298.0	12	1.4
TCB			7.12	357.0	197.0	29	357.0	342.0	29	1.1	

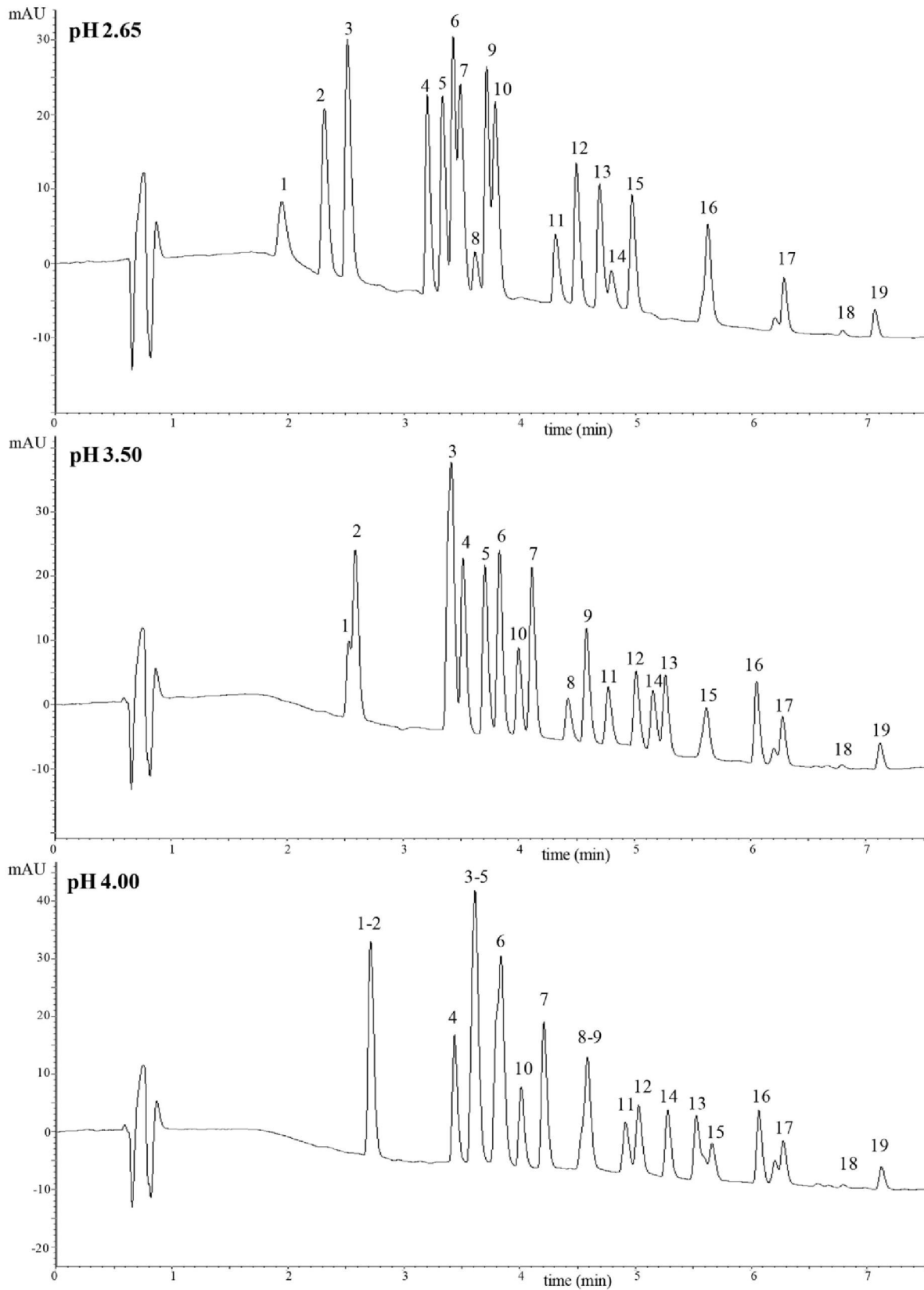


Fig. 2. Chromatograms obtained at pH: 2.65, 3.50 and 4.0 for the 19 benzimidazoles (1: TBZ-OH, 2: ABZ-NH₂-SO₂, 3: TBZ, 4: OXI, 5: ABZ-SO, 6: MBZ-NH₂, 7: MBZ-OH, 8: FLU-NH₂, 9: CAM, 10: ABZ-SO₂, 11: OFZ, 12: FBZ-SO₂, 13: MBZ, 14: ABZ, 15: FLU, 16: FBZ, 17: KETO-TCB, 18: FEB, 19: TCB).

enhance sensitivity by reducing the number of simultaneous transitions to be acquired and to enable polarity switching, since two (KETO-TCB and TCB) of the three last eluting compounds provided better response in negative mode.

3.3. Method performance

Before applying the developed method to the analysis of milk samples, instrumental quality parameters such as limit of detection (LOD), limit of quantitation (LOQ), precision and linearity were estimated for the UHPLC–MS/MS method using selected reaction monitoring (SRM) as acquisition mode. Instrumental limits of detection, based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 3:1, and limits of quantitation, based on S/N of 10:1, were estimated by injecting 10 µL of standard solutions at low concentration levels (down to 50 ng L⁻¹) and ranged from 1 to 10 pg injected. Generally, parent compounds provided better LODs, while sulfoxide as well as hydroxylated metabolites provided slightly poorer results with LODs from 2 to 5 times higher. The values obtained for each compound are given in Table 4. Internal standard calibration curves (6 concentration levels ranging from 1 to 500 µg L⁻¹) based on peak area ratio ($A_{\text{compound}}/A_{\text{standard}}$) and using mebendazole-*d*₃ as internal standard (25 µg L⁻¹) showed good linearity with a correlation coefficient (*r*²) better than 0.999. Run-to-run (*n* = 6) and day-to-day (*n* = 6, 3 days) precisions were evaluated at two concentration levels (10 µg L⁻¹ and 100 µg L⁻¹) and the % RSD values were always lower than 13%.

In order to demonstrate the applicability of the developed method, the nineteen benzimidazoles were analyzed in commercial milk samples. Three milk samples of different fat content (whole, semi-skimmed and skimmed) were purchased in local supermarkets of Barcelona and analyzed following the method described in Section 2. All the samples were proved to be free of the analytes; therefore these blank samples were spiked with the compounds of study and used to evaluate the effect of the different fat content on the reproducibility of the quantitation method and the effect of the matrix in the response. First, internal standard matrix-matched calibration curves were prepared using the three blank milk samples. Aliquots of these blank samples were spiked at 6 concentration levels and they were left to stand for 1 h before the analysis. The matrix-matched calibration curve slopes were compared among them to see if the fat content had any effect in the total recovery. No significant differences were observed among the three matrix-matched calibration curves (whole, semi-skimmed and skimmed milk); RSD% values for the slopes ranged from 2 to 9% and for the *y*-intercept were always lower than 10%. These results suggested that the clean-up was quite effective reducing the importance of the fat content in the reproducibility of the method and making possible the use of any milk matrix for the calibration-validation of the method. To evaluate sample treatment recovery values corresponding to the QuEChERS stage, two concentration levels for the three types of milk samples were studied by comparing matrix-matched calibration standards with standards prepared in blank matrix extracts. Recovery values between 75% and 100% were obtained for most of the compounds, with the exception of TCB and KETO-TCB that showed slightly lower values, 65% and 71% respectively, indicating that this procedure is acceptable for routine analysis of this family of compounds in milk samples. Moreover, to evaluate matrix effects the two internal standard calibration curves (solvent-based standards and spiked blank milk extracts) were compared. TBZ, ABZ-SO₂, OXF and FLU did not suffer from any matrix effect while the rest of compounds only presented a slight signal suppression of about 10% which is consistent with the use of an APCI source, less prone to suffer from matrix effects than ESI, where matrix suppression (up to 70%) has been reported for these compounds in milk samples [34]. Only TBZ-OH, the first eluting

Table 4 Instrumental and method quality parameters obtained for the UHPLC–APCI–MS/MS method.

Compound	Instrumental quality parameters			Method quality parameters			Accuracy (relative error %)			Ion ratio relative error ± RSD (%)	
	LOD (pg inj)	Run-to-run (% RSD, n=6)		MLOQ (µg kg ⁻¹)	Repeatability (% RSD, n=6)		MLOQ (10 µg kg ⁻¹)	High (100 µg kg ⁻¹)			
		Low (10 µg L ⁻¹)	Medium (100 µg L ⁻¹)		MLOQ (10 µg kg ⁻¹)	Medium (10 µg kg ⁻¹)		High (100 µg kg ⁻¹)			
TBZ-OH	10	2.9	3.0	1.5	9.5	2.1	4.6	6	13	4	8.4 ± 2.0
ABZ-NH ₂ -SO ₂	7.5	2.1	2.4	1.5	13	9.2	9.8	21	6	1	2.8 ± 2.5
TBZ	5.0	4.1	3.3	1.5	13	10	6.2	16	8	2	2.9 ± 2.2
OXI	10	4.4	5.6	0.9	12	3.3	7.7	22	11	2	3.3 ± 6.1
ABZ-SO	7.5	2.6	1.8	0.9	11	6.4	1.3	9	11	3	7.4 ± 4.6
MBZ-NH ₂	2.5	7.7	3.1	1.5	9.1	7.3	8.9	16	9	7	4.2 ± 2.3
MBZ-OH	2.5	6.0	4.3	0.9	6.0	4.3	4.5	18	15	3	–
FLU-NH ₂	5.0	6.3	3.9	0.9	11	6.8	9.9	20	10	5	0.1 ± 7.0
CAM	1.0	2.2	0.9	1.5	17	3.8	7.9	21	11	4	3.7 ± 2.8
ABZ-SO ₂	5.0	1.6	1.3	0.9	9.9	6.8	3.2	18	8	2	0.1 ± 1.5
OFZ	5.0	3.9	1.7	0.9	12	5.1	2.2	12	14	6	6.3 ± 4.7
FBZ-SO ₂	1.0	8.6	3.1	0.6	15	12	3.9	23	12	5	5.0 ± 5.6
MBZ	2.5	2.7	1.7	0.6	4.6	4.6	2.3	13	8	1	1.0 ± 1.2
ABZ	2.5	5.4	1.0	0.6	13	14	9.5	13	11	6	0.6 ± 3.5
FLU	1.0	3.3	2.1	0.6	7.6	8.2	6.0	13	14	5	2.8 ± 1.2
FBZ	1.0	4.4	1.6	0.6	16	15	4.7	16	12	6	0.8 ± 1.2
KETO-TCB	5.0	9.8	3.7	1.5	11	7.8	7.3	21	14	6	0.9 ± 8.7
FEB	5.0	9.6	5.3	1.5	5.9	3.2	4.1	7	13	3	0.7 ± 1.3
TCB	10	9.9	2.5	3.0	18	16	1.9	16	15	3	1.9 ± 1.3

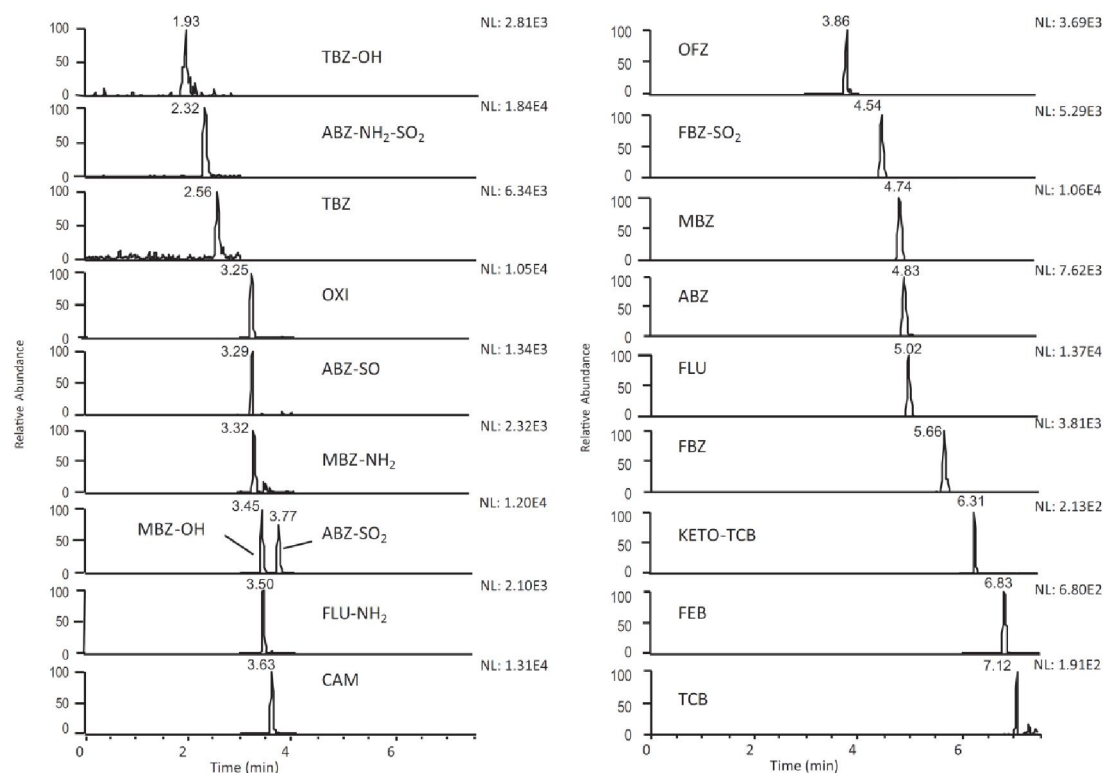


Fig. 3. UHPLC-APCI-MS/MS chromatogram of a blank milk sample spiked at $5 \mu\text{g kg}^{-1}$.

compound, presented a signal suppression of 22% which could be explained by the more significant co-elution of co-extractives of the matrix in this part of the chromatogram. For quantification purposes internal standard matrix-matched calibration using a blank whole milk is proposed to overcome both the observed slight matrix effect and the analyte losses due to the clean-up process.

To finally evaluate the method quality parameters, a blank whole milk sample was used since it was considered the potentially more complex matrix. Method limits of quantitation (MLOQ) were evaluated by spiking aliquots of this sample at very low concentration levels down to $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ and based on a signal-to-noise (S/N) ratio of 10:1 in the confirmation SRM transition. Under these conditions the estimated MLOQ values were lower than $3 \mu\text{g kg}^{-1}$ for all the compounds (Table 4) and they were 7–30 times lower than the MRL values. Ion ratio relative errors were also lower than 10% for all compounds, indicating that matrix interfering compounds that could co-elute with the monitored analytes were not present. Repeatability was checked by analyzing six replicates of a blank whole milk sample spiked at three concentration levels, MLOQ, medium ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$) and high ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$). For retention times, the RSD% values ranged from 0.1 to 0.9%, while for concentration the RSD% values were below 10% for all the analytes at medium and high concentration and slightly higher (up to 18%) for the MLOQ level. The accuracy of the method was also examined at the same three concentration levels and the relative errors ranged from 1 to 15% for medium and high level and up to 23% at the MLOQ. Quality parameters that summarize the method performance are gathered in Table 4, showing that the UHPLC-APCI-MS/MS method proposed can be applied to the analysis of milk samples down to $3 \mu\text{g kg}^{-1}$. Ten milk samples purchased at local supermarket were analyzed, but benzimidazoles were not detected above MLOQ in any of them. As an example, Fig. 3 shows a blank whole milk sample spiked at $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ in which it can be seen that these compounds can be determined at this low concentration level.

4. Conclusions

In this study a fast UHPLC-APCI-MS/MS method using a C_{18} column (superficially porous particles) was developed for the determination of 19 benzimidazoles in less than 7 min. Among the API sources tested, atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was demonstrated to be the best choice for the ionization of these compounds since it is the only one capable of ionizing effectively the whole group of benzimidazoles. Positive mode provided the highest responses for most of the analytes except for TCB and KETO-TCB that ionized better in negative mode and FEB that provided similar results in both ionization modes. The use of polarity switching allowed the efficient analysis of all compounds in a single chromatographic run. Multiple-stage mass spectrometry ion trap permitted the assignment of the product ions previously observed in tandem mass spectrometry. Benzimidazoles with a methyl carbamate group in the imidazole ring generally showed the loss of CH_3OH as the most common cleavage, while the other characteristic fragmentations involve the side chains of the benzimidazolic ring. Second-generation product ions (MS/MS) were selected for quantitation in the triple quadrupole analyzer while third-generation product ions (MS^3), generated by multiple collision, were used for confirmation purposes. The application of modified version of the QuEChERS method assured a fast sample treatment with low MLOQ ($<3 \mu\text{g kg}^{-1}$), allowing the determination of these compounds at concentration levels considerably lower than the established EU MRL values.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Generalitat de Catalunya under the project 2009 SGR 1325. Anna Martínez Villalba thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for an FPI grant.

References

- [1] Q.A. McKellar, F. Jackson, *Trends Parasitol.* 20 (2004) 456.
- [2] M. Stamatakos, C. Sargedi, Ch. Stefanaki, C. Safioleas, I. Mtthaiopoulou, M. Safioleas, *Parasitol. Int.* 58 (2009) 115.
- [3] D.W. Gottschall, V.J. Theodorides, R. Wang, *Parasitol. Today* 6 (1990) 115.
- [4] Official Journal of the European Union, L224 18 August 1990, Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Brussels, Belgium, (1990).
- [5] Official Journal of the European Communities L224, of 18 August 1990, Council Regulation 2377/90/EC; consolidated version of the Annexes I to IV updated up to 22.12.2004 obtained from www.emea.europa
- [6] G. Dusi, V. Gamba, E. Faggionato, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 375.
- [7] G. Dowling, H. Cantwell, M. O'Keeffe, M.R. Smyth, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 285.
- [8] K.P. Prosaulis, D.A. Polygenis, A. Surokou, F.N. Lamari, T. Tsegenidis, *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 458.
- [9] M.D. Rose, *Analyst* 124 (1999) 1023.
- [10] H. De Ruyck, R. Van Renterghem, H. De Ridder, D. De Brabander, *Food Control* 11 (2000) 165.
- [11] A. López, D. Vega, M.E. Torres, Z. Sosa, J.J. Santana, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1957.
- [12] G. Balizs, *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 167.
- [13] De Ruyck, E. Daeseleire, H. De, R. Idder, R. Van Renterghem, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 181.
- [14] B. Kinsella, S.J. Lehotay, K. Mastovska, A.R. Lightfield, A. Furey, M. Danaher, *Anal. Chim. Acta* 637 (2009) 196.
- [15] B. Casetta, R. Cozzani, A.L. Cinquina, S. Marzio, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1497.
- [16] B. Gilbert-López, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, A.R. Fernández-Alba, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21 (2007) 2059.
- [17] H. De Ruyck, E. Daeseleire, H. De Ridder, *Analyst* 126 (2001) 2144.
- [18] M. Danaher, M. O'Keeffe, J.D. Glennon, *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 313.
- [19] P. Jedziniak, T. Szprengier-Juszkiewicz, M. Olejnik, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8165.
- [20] H. Botitsi, A. Economou, D. Tsipi, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 1685.
- [21] D. Ortelli, P. Edler, C. Corvi, *Anal. Chim. Acta* 520 (2004).
- [22] J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Anastasio, C. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy, *Anal. Chim. Acta* 654 (2009) 111.
- [23] A. Cannavan, A. Haggan, D.G. Kennedy, *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 103.
- [24] D.L. Brandon, K.P. Holland, J.S. Dreas, A.C. Henry, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 3653.
- [25] C.L. da Silva, E.C. de Lima, M.F.M. Tavares, *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 109.
- [26] C. Cacho, L. Schweitz, E. Turiel, C. Pérez-Conde, *J. Chromatogr. A* 1179 (2008) 216.
- [27] R. Rodríguez, I. Boyer, G. Font, Y. Picó, *Analyst* 126 (2001) 2134.
- [28] C.K. Kaltsonoudis, F.N. Lamari, K.P. Prousalis, N.K. Karamanos, T. Tsegenidis, *Chromatographia* 57 (2003) 181.
- [29] M. Danaher, H. De Ruyck, S.R.H. Crooks, G. Dowling, M. O'Keeffe, *J. Chromatogr. B* 845 (2007) 1.
- [30] J. Domínguez-Álvarez, M. Mateos-Vivas, D. García-Gómez, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez, *J. Chromatogr. A* 1278 (2013) 166.
- [31] D. Ortelli, E. Cognard, P. Jan, P. Edler, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2363.
- [32] A.A.M. Stolker, P. Rutgers, E. Oosterink, J.J.P. Lasaroms, R.J.B. Peters, J.A. Van Rhijn, M.W.F. Nielen, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 2309.
- [33] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer, *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 13.
- [34] X. Xia, Y. Dong, P. Luo, X. Wang, X. Li, S. Ding, J. Shen, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3174.
- [35] J.R. Mazzeo, U.D. Neue, M. Kele, R.S. Plumb, *Anal. Chem.* 1 (2005) 460 A.
- [36] D. García-Gómez, M. García-Hernández, E. Rodríguez-Gonzalo, R. Carabias-Martínez, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2909.
- [37] Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results, *Off. J. Eur. Commun. L* 221 (2002) 8.
- [38] A. Martínez-Villalba, L. Vaclavik, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Hajslova, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (3) (2013) 467.

2.2.6. ARTICLE CIENTÍFIC VI

Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food

A. Martínez-Villalba, L. Vaclavik, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Hajslova
Rapid Communications in Mass Spectrometry (2013) 27, 467-475

Rapid Commun. Mass Spectrom. **2013**, *27*, 467–475
(wileyonlinelibrary.com) DOI: 10.1002/rcm.6466

Direct analysis in real time high-resolution mass spectrometry for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs in feed and food

Anna Martínez-Villalba^{1,2}, Lukas Vaclavik¹, Encarnación Moyano², Maria Teresa Galceran² and Jana Hajslova^{1*}

¹Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Department of Food Chemistry and Nutrition, Technická 5, 16628 Prague 6, Czech Republic

²University of Barcelona, Faculty of Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Martí i Franqués 1-11, 08028 Barcelona, Spain

RATIONALE: Direct analysis in real time (DART) is a novel ionization technique that has been demonstrated in numerous applications as a useful tool for fast and convenient mass spectrometry (MS)-based analysis of complex samples. In this study, the feasibility of DART ionization coupled to a high-resolution mass spectrometer utilizing an orbitrap mass analyzer (orbitrap MS) for high-throughput analysis of antiparasitic veterinary drugs was explored.

METHODS: To obtain the best DART-orbitrap MS performance, stepwise optimization of instrumental parameter settings, such as ionization gas temperature and mass resolving power, was performed. The optimized method was applied to feed and bovine milk samples previously extracted following a QuEChERS-like strategy.

RESULTS: Most antiparasitic drugs could be analyzed following the described method. Positive DART ionization provided the protonated molecules $[M+H]^+$; in negative DART ion mode, deprotonated molecules $[M-H]^-$ were observed. As an exception, polyether ionophores could be observed as the sodiated adducts $[M+Na]^+$. Samples of milk and feed were extracted using a modified QuEChERS method for the determination of benzimidazoles and coccidiostats respectively and quantification was carried out by matrix-matched calibration curves.

CONCLUSIONS: The combination of an analysis time of less than 1 min per sample and the possibility to acquire accurate masses under high mass resolving power (HR) makes the DART-HRMS technique an effective tool for rapid qualitative screening of antiparasitic veterinary drugs. Additionally, the results obtained in this study demonstrated the feasibility of this approach to quantify target analytes at levels down to $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ for benzimidazolic compounds in milk and 0.25 mg kg^{-1} for coccidiostats in chicken feed. Copyright © 2012 John Wiley & Sons, Ltd.

Multiresidue analysis is becoming the major trend in the field of determination of contaminants in environmental^[1,2] and food^[3–7] matrices. Nowadays, more straightforward sample pre-treatment procedures as well as simpler analytical methods are being applied to control multiple target analytes, thanks to the recent developments of mass spectrometry (MS). The use of more efficient and robust ion sources, which are less sensitive to matrix effects, in combination with powerful and versatile mass analyzers capable of providing high resolution (HR) and high mass accuracy at extremely fast acquisition rates, have made possible the analysis of slightly processed samples. The coupling of ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) to MS^[8–10] has contributed to the reduction in the time needed for residue analysis in complex samples, through significant increase of the chromatographic

resolution and peak capacity. Considering other techniques enabling high-throughput analysis, also ambient mass spectrometry represents an option that became recently available.^[11–16] Since the introduction of the first ambient ionization sources in 2004,^[11] this area has undergone a rapid development. Until now, more than 20 different ambient ionization techniques have been reported in the literature and, among them, direct analysis in real time (DART) has been probably one of the most widespread, due to its commercial availability. The DART ionization process that takes place in the open atmosphere is based on the similar principles that apply for atmospheric pressure chemical ionization (APCI), following a mechanism of gas-phase ionization.^[17,18] Beside other application areas such as drug analysis,^[19–21] in food control, the DART-MS technique can be used as a simple and high-throughput tool making easier both qualitative and quantitative analysis of low molecular weight food components including some trace organic contaminants,^[22–28] as well as fingerprinting/profiling for food authenticity assessment.^[29,30] As mentioned above, several DART applications have been developed for determination of various food contaminants, such as melamine and cyanuric acid in milk and baby milk formula,^[23] strobilurin fungicides in wheat,^[24] or mycotoxins in cereals.^[28] Most of the

* Correspondence to: J. Hajslova, Institute of Chemical Technology Prague, Faculty of Food and Biochemical Technology, Department of Food Chemistry and Nutrition, Technická 5, 16628 Prague 6, Czech Republic.
E-mail: jana.hajslova@vscht.cz

available applications present the DART source coupled to a time-of-flight (TOF) mass analyzer of medium-high mass resolving power,^[20,23,24,31–34] which does not always enable the extraction of analyte signal from isobaric noise coming from the background or from interfering signals originating from the sample matrix. Recently, a DART source coupled to an orbitrap mass spectrometer (orbitrap MS), providing an improved selectivity and accurate elemental composition assignment through ultra-high mass resolution measurements, has become available.^[19,26]

In this particular study, the DART-orbitrap MS technique was utilized for the analysis of frequently used veterinary drugs, namely coccidiostats in feed and benzimidazoles in bovine milk. It is worth noticing that, with regard to coccidiostats, the European Union (EU) has recently established maximum residue levels (MRLs) in non-target feed at low mg kg⁻¹ levels while benzimidazoles are routinely controlled in milk and other animal food products (ppb levels).^[35,36] Therefore, reliable DART-HRMS-based method for monitoring of the above-mentioned antiparasitic drugs would be extremely useful for food/feed quality control laboratories.

EXPERIMENTAL

Chemicals and materials

The benzimidazoles thiabendazole (TBZ), oxfendazole (OFZ), oxi-bendazole (OXI), fenbendazole (FBZ), febantel (FEB), triclabendazole (TCB), mebendazole (MBZ) and mebendazole-*d*₃ (MBZ-*d*₃) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Albendazole (ABZ), albendazole 2-aminosulfone (NH₂ABZ-SO₂) and cambendazole (CBZ) were supplied by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Flubendazole (FLU), 5-hydroxythiabendazole (TBZ-OH), albendazole sulfone (ABZ-SO₂), albendazole sulfoxide (ABZ-SO), 5-hydroxymebendazole (MBZ-OH), fenbendazole sulfone (FBZ-SO₂), aminofluben-dazole (NH₂-FLU), keto-triclabendazole (KETO-TCB) and mebendazole amino (NH₂-MBZ) were obtained from WITEGA Laboratorien Berlin-Adlershof GmbH (Berlin, Germany). The polyether ionophore coccidiostats monensin (MON), narasin (NAR), salinomycin (SAL), lasalocid (LAS) and maduramicin (MAD) and the chemical coccidiostats robenidine (ROB), diclazuril (DIC), ethopabate (ETH), nicarbazin (NIC), clopidol (CLO) and toltrazuril (TOL) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). HPLC-grade methanol (MeOH) and acetonitrile (MeCN) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Water used for extractions was purified with a Milli-Q purification system (Millipore, Eschborn, Germany); an aqueous ammonia solution (25%, w/w) was supplied by Penta (Chrudim, Czech Republic) while anhydrous magnesium sulphate, sodium chloride, ammonium formate (≥99.0%) and formic acid (98–100%) were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Primary secondary amine (PSA) and C18 sorbents were obtained from Varian (Harbor City, CA, USA); formic acid (≥98% purity) was from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions (1 mg mL⁻¹) were prepared in MeOH and stored at 4°C while 1 µg mL⁻¹ working standard solutions were prepared weekly by dilution in MeCN.

Instrumentation

For the experiments, a DART-orbitrap MS system consisting of a DART-SVP ion source with a 12 Dip-It[™] tip scanner autosampler (IonSense, Saugus, MA, USA) coupled to an Exactive[™] mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) was used. To hyphenate the ion source and the mass spectrometer, a Vapur[™] interface (IonSense, Saugus, MA, USA) was used and a membrane pump (Vacuubrand, Wertheim, Germany) was connected to maintain the low vacuum in the chamber. The operating conditions of the DART ion source were as follows: (i) positive ion mode; helium flow, 4.0 L min⁻¹; discharge needle voltage, 3.0 kV; grid electrode potential, 250 V; (ii) negative ion mode; helium flow, 4 L min⁻¹; discharge needle voltage, 3.0 kV; grid electrode potential, -150 V. Conditions of orbitrap MS were the following: cone voltage, ±20 V; monitored *m/z* range, *m/z* 50–1000; The acquisition rate was set according to the desired resolving power of the orbitrap mass analyzer, and was 10 spectra s⁻¹ at 10 000 FWHM (full width at half maximum), 4 spectra s⁻¹ at 25 000 FWHM, 2 spectra s⁻¹ at 50 000 FWHM and 1 spectrum s⁻¹ at 100 000 FWHM. Accurate mass calibration was performed every 48 h in positive and negative ionization mode using a calibration solution consisting of caffeine, MRFA (met-arg-phe-ala) peptide, and Ultramark 1621 in an acetonitrile/methanol/water solution containing 1% acetic acid. The distance between the DART gun exit and the mass spectrometer inlet was 10 mm. About 5 µL of sample were placed on the glass rod and transferred to the optimized position in front of the DART gun exit and the gas beam temperature was set at 450 °C. The sample was then desorbed from the glass rod surface within 10 s, while the spectral data were recorded.

Sample treatment

The feeding materials used in this study were obtained from a local supplier from Barcelona, while bovine milk samples were purchased at a Czech retail market. A modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) approach was employed for sample treatment. Samples (10 g) were weighed into 50 mL tubes, fortified with the analytes and/or the internal standard (MBZ-*d*₃, 20 µL, 10 µg mL⁻¹) and allowed to stand for 15 min. Prior to extraction of feed samples, 10 mL of deionized water were added in order to dampen the matrix. The extraction was performed by adding 10 mL of either MeCN (feed) or MeCN with 0.1% NH₃ (milk), followed by 5 g of MgSO₄/NaCl (4:1, w/w). Samples were immediately shaken for 1 min in order to prevent the formation of agglomerates due to MgSO₄ hydration and centrifuged at 10 000 rpm for 5 min using an Universal 320 centrifuge (Hettich, Tuttingen, Germany). For sample cleanup, 1 mL of supernatant was transferred into a 1.5 mL Eppendorf vial containing MgSO₄ (150 mg), C₁₈ sorbent (50 mg), which is useful for removing fats and hydrophobic compounds, and primary secondary amine (PSA) sorbent (50 mg) used for the removal of organic acids. The sample extract was vortex-mixed for 1 min and centrifuged at 11 000 rpm for 2 min. The supernatant was placed into an autosampler vial and kept in the fridge until the analysis.

RESULTS AND DISCUSSION

Ionization of antiparasitic veterinary drugs

In the initial stage of this study, the applicability of DART technology for ionization of the selected antiparasitic agents was evaluated. For this purpose, two standard solutions, one containing coccidiostats and the other benzimidazoles, were prepared in pure acetonitrile at a concentration of

1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and analyzed under various working conditions. First, the ionization gas temperature, which represents one of the key parameters influencing the outcome of DART-MS analysis, was optimized in the range of 100–500°C in order to maximize the thermal desorption of the analytes. Figure 1 shows as an example the extracted chronograms for some veterinary drugs at different gas temperatures and the full scan mass spectra obtained at 450°C for the 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ standard mixtures of coccidiostats (Fig. 1(A)) and

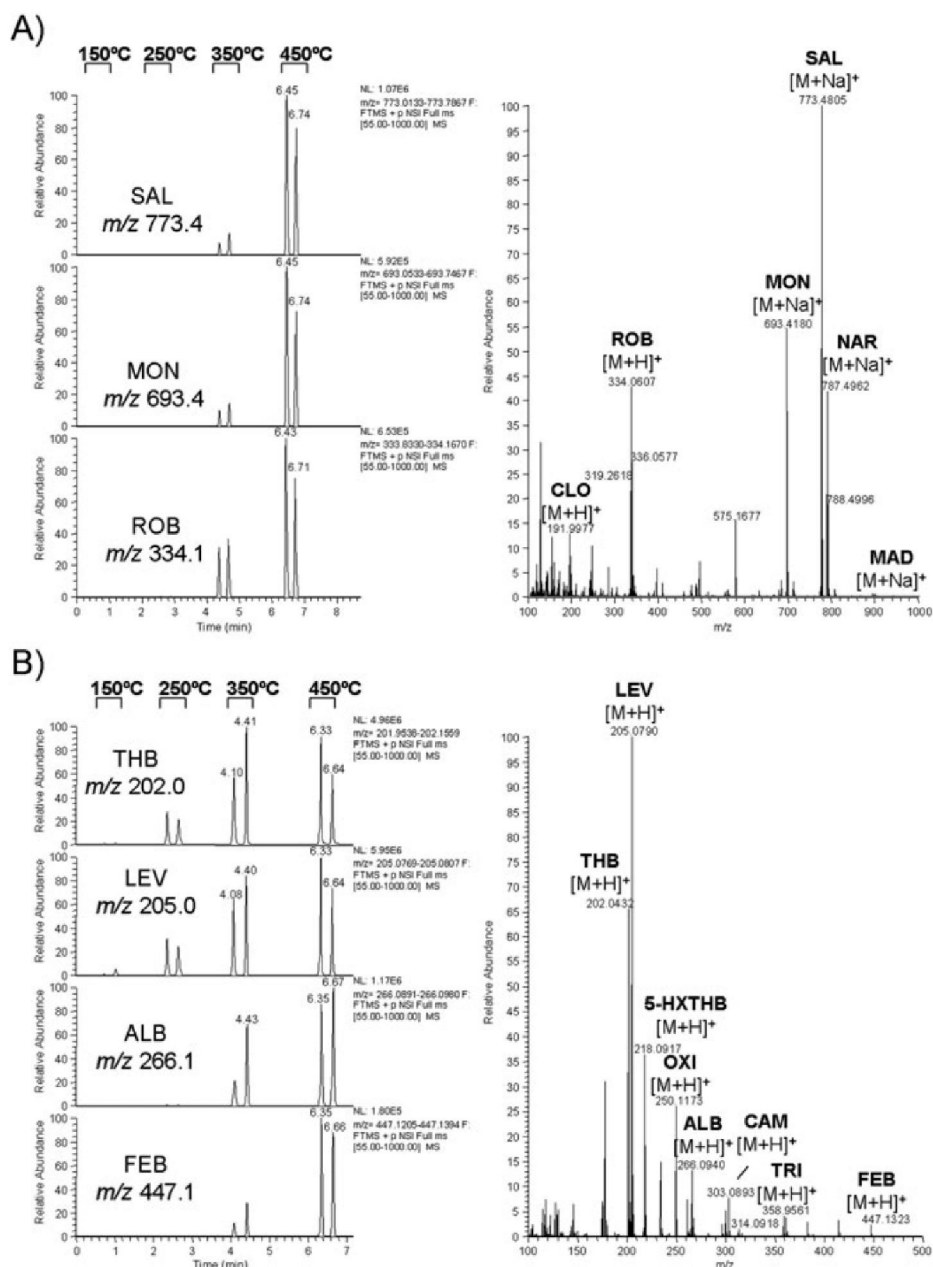


Figure 1. Effect of gas temperature on DART-HRMS sensitivity for (A) coccidiostats and (B) benzimidazoles.

benzimidazoles (Fig. 1(B)). As can be seen, a significant increase in the signal intensity of the studied compounds was obtained at gas temperatures above 400°C. Both positive and negative polarities were applied for the ionization of the antiparasitic drugs. Table 1 provides an overview of ions observed on DART ionization. While under the positive DART ionization mode setting it was possible to ionize most of the target benzimidazoles used in this study, negative mode was required for the ionization of the benzimidazole K-TRI, the coccidiostats DIC, DNC, TOL and its metabolites. For all benzimidazoles, the observed ions corresponded to the protonated molecules $[M+H]^+$ or the deprotonated molecules $[M-H]^-$, depending on the polarity used. Analogously, both $[M+H]^+$ and $[M-H]^-$ were observed for most of coccidiostats, with the exception of amprolium, a quaternary ammonium compound, which could not be thermally desorbed into the gas phase and DART ionized. Rather unexpectedly, sodium adducts $[M+Na]^+$ were observed in DART mass spectra when analyzing the coccidiostatic polyether ionophores (monensin, narasin, salinomycin, lasalocid, and maduramicin). This type of adduct ions, which

is usually observed in LC/MS when using electrospray ionization, is generally reported not to be formed under conditions of DART ionization.^[12] However, considering the structure of these ions,^[37–39] which resembles rather a macrocycle with a sodium ion completely coordinated and stabilized in the molecule, than a regular adduct, these observations may entail an exception to the general ionization rule of the DART source. In the literature,^[37–39] it has been reported that, in addition to sodium adducts, also ammonium adducts $[M+NH_4]^+$ of the polyether ionophores can be formed. For this reason, in order to induce the formation of ammonium adducts and improve ionization yield, dopant vapors of ammonia were introduced into the region between the ion source exit and the Vapor™ interface ceramic tube inlet. No relevant results were obtained in this experiment, as no abundant $[M+NH_4]^+$ ions were observed and the sodium adducts kept being the predominant ions for polyether ionophores. This could be explained by the differences between the electrospray and DART ionization processes. While the ionization of analytes in electrospray (ESI) takes place in the liquid phase, DART needs analytes

Table 1. Molecular formulas of the studied compounds, exact masses and detected ions under DART-MS analysis. Experimental data based on replicate analysis (n = 3)

Compounds	Molecular formula	Ionization mode	Detected ions			
			Ion assignment	Exact mass (Da)	Accurate mass (Da)	Mass error (ppm)
ABZ	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S	Positive	$[M+H]^+$	266.0958	266.0950	-3.01 ± 1.75
ABZ-SO ₂	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₄ S	Positive	$[M+H]^+$	298.0857	298.0849	-2.68 ± 1.25
ABZ-SO	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃ S	Positive	$[M+H]^+$	282.0907	282.0897	-3.54 ± 1.32
NH ₂ -ABZ-SO ₂	C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	Positive	$[M+H]^+$	240.0802	240.0793	-3.75 ± 0.86
TBZ	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	Positive	$[M+H]^+$	202.0434	202.0433	-0.49 ± 1.35
TBZ-OH	C ₁₀ H ₇ N ₃ OS	Positive	$[M+H]^+$	218.0383	218.0376	-3.21 ± 1.07
FBZ	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S	Positive	$[M+H]^+$	300.0802	300.0795	-2.33 ± 1.36
FBZ-SO ₂	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	Positive	$[M+H]^+$	332.0700	332.0693	-2.10 ± 1.86
MBZ	C ₁₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	Positive	$[M+H]^+$	296.1030	296.1022	-2.70 ± 0.94
NH ₂ -MBZ	C ₁₄ H ₁₁ N ₃ O	Positive	$[M+H]^+$	238.0975	238.0966	-3.77 ± 1.07
MBZ-OH	C ₁₆ H ₁₅ N ₃ O ₃	Positive	$[M+H]^+$	298.1187	298.1183	-1.34 ± 0.54
FLU	C ₁₆ H ₁₂ FN ₃ O ₃	Positive	$[M+H]^+$	314.0936	314.0928	-2.55 ± 0.93
NH ₂ -FLU	C ₁₄ H ₁₀ N ₃ OF	Positive	$[M+H]^+$	256.0881	256.0872	-3.51 ± 1.18
OFZ	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₃ S	Positive	$[M+H]^+$	316.0751	316.0756	1.58 ± 0.66
OXI	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₃	Positive	$[M+H]^+$	250.1187	250.1178	-3.60 ± 1.04
CBZ	C ₁₄ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	Positive	$[M+H]^+$	303.0911	303.0901	-3.30 ± 1.35
TCZ	C ₁₄ H ₉ C ₁₃ N ₂ OS	Negative	$[M-H]^-$	356.9428	356.9434	1.68 ± 0.59
KETO-TCZ	C ₁₃ H ₇ N ₂ O ₂ Cl ₃	Negative	$[M-H]^-$	326.9500	326.9489	-3.36 ± 0.84
FEB	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S	Positive	$[M+H]^+$	447.1333	447.1326	-1.56 ± 0.87
LEV	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S	Positive	$[M+H]^+$	205.0794	205.0791	-1.46 ± 1.39
MON	C ₃₆ H ₆₂ O ₁₁	Positive	$[M+Na]^+$	693.4185	693.4182	-0.43 ± 0.52
NAR	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₁	Positive	$[M+Na]^+$	787.4967	787.4964	-0.38 ± 0.68
SAL	C ₄₂ H ₇₀ O ₁₁	Positive	$[M+Na]^+$	773.4811	773.4807	-0.51 ± 0.49
LAS	C ₃₄ H ₅₄ O ₈	Positive	$[M+Na]^+$	613.3711	613.3705	-0.98 ± 0.63
MAD	C ₄₇ H ₈₀ O ₁₇	Positive	$[M+Na]^+$	939.5288	939.5282	-0.64 ± 0.49
AMP	C ₁₄ H ₁₉ N ₄ ⁺	Positive	n.d.			
ROB	C ₁₅ H ₁₃ Cl ₂ N ₅	Positive	$[M+H]^+$	334.0621	334.0614	-2.09 ± 1.21
CLO	C ₇ H ₇ Cl ₂ NO	Positive	$[M+H]^+$	191.9978	191.9984	3.12 ± 1.37
ETH	C ₁₂ H ₁₅ NO ₄	Positive	$[M+H]^+$	238.1074	238.1080	2.51 ± 0.87
DIC	C ₁₇ H ₉ Cl ₃ N ₄ O ₂	Negative	$[M-H]^-$	404.9718	404.9723	1.23 ± 0.85
DNC	C ₁₃ H ₁₀ N ₄ O	Negative	$[M-H]^-$	301.0578	301.0571	-2.32 ± 1.24
TOL	C ₁₈ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₄ S	Negative	$[M-H]^-$	424.0584	424.0589	1.18 ± 1.06
TOL-SO ₂	C ₁₈ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₅ S	Negative	$[M-H]^-$	440.3737	440.3741	0.91 ± 0.56
TOL-SO	C ₁₈ H ₁₄ F ₃ N ₃ O ₆ S	Negative	$[M-H]^-$	456.3731	456.3733	0.44 ± 0.74

to be first in the gas phase before ionizing them. Since no ammonium adducts were observed for coccidiostats in DART, this could indicate that the neutral complex is formed before the ionization step and that the pseudo macrocycle with the coordinated sodium cation is stable in solution, while the possibility of observing both adducts (sodium and ammonium) in ESI is due to the presence of both ions in the electrospray droplets. Regarding the signal intensity, maduramicin provided the lowest signal; this can be due to the high molecular mass of this compound (m/z 939.5288) that could make difficult its thermal desorption. All the mass spectral data obtained are summarized in Table 1. Mass error values below 5 ppm were obtained for all the detected compounds, backing up the technical specifications of the instrument. Identification of target compounds was based on the accurate mass and confirmation was performed taking into account the mass isotope pattern.

The mass spectrometer employed in this study was able to provide mass resolving powers between 10 000 and 100 000 FWHM. Sensitivity was almost constant through the whole mass resolving power range studied but this parameter was closely related to spectra acquisition rate. Therefore, although the use of an ultra-high mass resolution is recommended when working with direct analysis techniques, a compromise between acquisition rate and mass resolving power had to be found in order to achieve analyte/interference resolution and sufficient data points across the chromatographic peak. To optimize the mass resolving power, albendazole sulfone ($C_{12}H_{15}O_4N_3S$) and 5-hydroxymebendazole ($C_{16}H_{15}O_3N_3$) were selected as model compounds, since the m/z values of their protonated molecules differed only by 0.033 Da. The four mass resolving power settings offered by the instrument, i.e. medium (10 000 FWHM), enhanced (25 000 FWHM), high (50 000 FWHM) and ultra-high (100 000 FWHM) were tested, concluding that the use of a minimum mass resolving power of 25 000 was compulsory to separate both spectral peaks. To ensure satisfactory separation of target signals from sample matrix, a mass resolving power of 50 000 FWHM was selected for further experiments. Above 50 000 FWHM the acquisition speed was lower than 2 spectra s^{-1} that was too slow to obtain an high enough number of scans per chromatographic peak.

Determination of benzimidazole compounds in milk

To evaluate the applicability of the DART technique to the analysis of real samples, benzimidazoles were determined in bovine milk. The presence of these compounds in milk is regulated by the EU, which has established maximum residue levels (MRLs) ranging from 10 to 100 $\mu g\ kg^{-1}$ for the sum of the parent drug and their metabolites. Therefore, any method proposed for the determination of these substances should be able to detect benzimidazole-related compounds below these limits. The direct analysis by DART-MS of blank milk samples spiked with the target analytes at 100 $\mu g\ kg^{-1}$ was performed. However, under these conditions extremely high signal suppression occurred due to sample matrix effects. For this reason, an extraction step employing MeCN was performed to remove as much sample matrix as possible, but only partial removal of the matrix components occurred preventing the detection of benzimidazoles. At this point, a QuEChERS-like strategy was applied to clean up the extracts.^[40–42] First of all, to enhance the transfer of the analytes into the organic phase, 0.1% of NH_4OH was added to the extraction solvent (MeCN). At pH above 9 all benzimidazoles remain neutral and are more prone to transfer from the aqueous into the organic layer. For the dispersive solid-phase extraction (SPE) cleanup, the addition of PSA (50 mg) or of both PSA and C18 (50 mg each) to 1 mL of MeCN sample extract was studied. Figure 2 compares analyte DART signal intensities obtained for spiked sample (500 $\mu g\ kg^{-1}$) without any pre-treatment and after the QuEChERS procedure employing different dispersive SPE sorbents. As can be seen, dispersive SPE has a substantial impact on the signal intensity indicating an important degree of matrix removal. The combination of PSA and C18 sorbents could remove both polar and non-polar matrix components providing even higher signal intensities for some of the compounds (as compared to using PSA only). Considering these results, the procedure using a combination of PSA and C18 sorbents was further used. It is noteworthy that since no solvent evaporation step was required in the employed sample preparation workflow, the whole procedure was considerably fast. To determine lowest calibration levels (LCLs) of the method, blank milk samples were spiked at low levels (down to 1 $\mu g\ kg^{-1}$), processed as described in

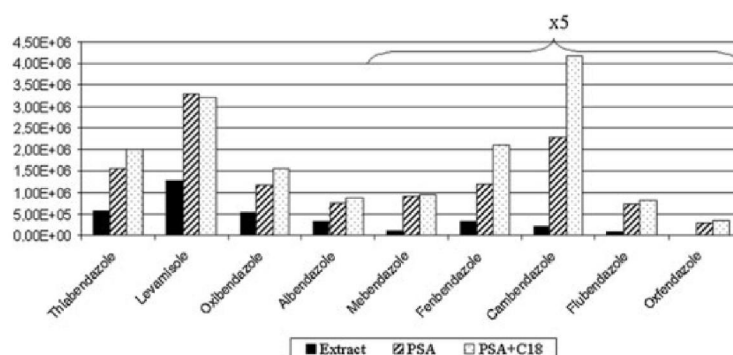


Figure 2. Comparison of PSA and PSA with C18 as dispersive SPE sorbents in the basic buffered QuEChERS applied to milk samples spiked with benzimidazoles.

the Experimental section, and analyzed by DART-MS. The values estimated for each compound are shown in Table 2. As can be observed, all the LCLs were under the MRLs established by the EU in milk, which range from 10 to 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Although the sample cleanup provided clean enough extracts to achieve the required LCLs, an important matrix effect was still observed making impossible the quantification of the samples by an external calibration curve. For this reason, matrix-a matched calibration curve was used as quantification strategy since it would also overcome the recovery effect. The method reproducibility was evaluated at two spiking levels: 10 and 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$; quantitation was performed through matrix-matched calibration standards with and without internal standard (surrogate). Slightly better results were obtained when using the deuterated mebendazole as internal standard, always providing acceptable linearity ($R^2 \geq 0.99$), relative standard deviations (RSDs) below 20%, and low relative errors in the quantification (<10%) (Table 2). Although the effect of recovery was already corrected by the matrix matched calibration curves, these were estimated comparing the samples spiked before the clean-up with blank sample extracts spiked at the theoretical concentration of the final extract, regardless the analyte, the obtained values were higher than 65%.

Determination of coccidiostats in feed

The EU has recently established MRLs for coccidiostatic compounds in non-target feed due to unavoidable carry-over in the line production. Legal limits for these compounds are rather permissive (mg kg^{-1} levels); therefore, DART-HRMS could be considered as a conceivable technique for analysis

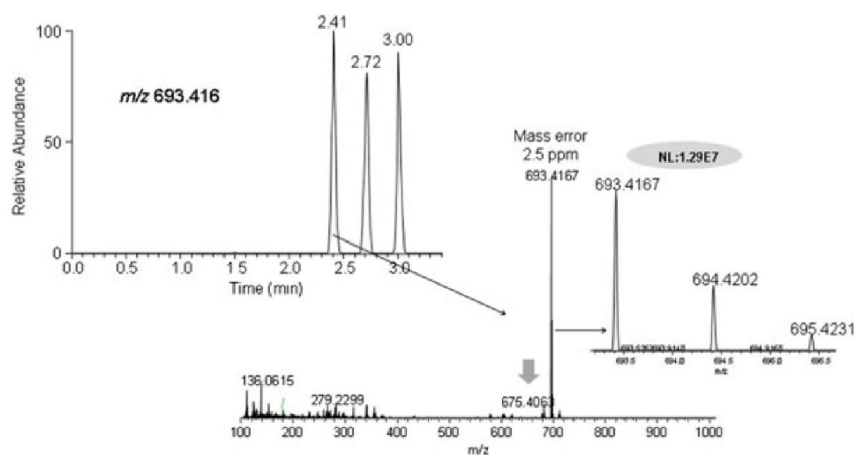
of coccidiostats in such matrices. Initially, an extraction with MeCN was performed, but the suppression of the analyte signals was strong, causing poor detectability of respective ions even at mg kg^{-1} levels. Due to these disappointing, but expectable, results, a similar strategy to that applied to the determination of benzimidazoles was followed. The QuEChERS-like extraction procedure was applied without addition of ammonia, since the polyether ionophore coccidiostats are carboxylic acids with pKa values around 5. Instead, the addition of 0.1% formic acid was used to favor the analyte transfer into the acetonitrile phase through minimization of analytes dissociation. No significant differences were observed between DART-HRMS chromatograms when analyzing samples prepared with and without the addition of formic acid; thus no acid addition was preferred to keep the method as simple as possible. For the dispersive SPE of the crude acetonitrile extract, an identical mixture of PSA and C_{18} sorbent as for benzimidazoles was used. Considering both the alkaline nature and high ion-exchange capacity of the PSA sorbent,^[40,41] the possibility of polyether ionophores (carboxylic acids) interacting with this sorbent was studied by using base standard solutions in MeCN. No losses of the analytes were observed indicating that the ionophores were not interacting with the sorbent. So a ratio of PSA/ C_{18} 1:1 (100 mg total amount) was used. However, when dealing with feed extracts, only monensin, salinomycin, narasin and robenidine could be detected in the final extract without significant losses, while matrix effects still seemed to be too strong for some compounds such as dinitrocarbanilide. Blank chicken feeding materials were used to validate the method, thus the blank samples were spiked at known concentrations levels ranging from 0.25 to 100 mg kg^{-1} . For the quantitation

Table 2. Quality parameters of the method for the determination of benzimidazoles in milk and authorized MRLs in milk

Compound	LCL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recovery (% RSD)	Linearity (r)		Run-to-run (% RSD) [Accuracy (rel. error %)]		MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
			External calibration	Internal standard calibration	Low level (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	Medium level (100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)	
ABZ	1	92 (5.1)	0.9968	0.9993	19 [2.5]	11[2.0]	100
ABZ-SO ₂	5	87 (3.4)	0.9949	0.9986	25[8.3]	22[5.4]	100
ABZ-SO	1	86 (6.3)	0.9911	0.9991	21[8.5]	13[6.1]	100
NH ₂ -ABZ-SO ₂	5	82 (5.7)	0.9920	0.9994	25[7.9]	18[6.3]	100
TBZ	1	95 (2.4)	0.9937	0.9960	17[5.3]	14[3.3]	100
TBZ-OH	1	89 (4.8)	0.9969	0.9997	15[6.2]	13[4.2]	100
FBZ	1	82 (6.2)	0.9960	0.9978	13[5.4]	9[4.2]	10
FBZ-SO ₂	5	84 (5.7)	0.9942	0.9970	20[9.3]	15[6.8]	10
MBZ	1	88 (4.3)	0.9991	0.9990	18[6.2]	16[5.3]	-
NH ₂ -MBZ	5	85 (6.7)	0.9937	0.9985	25[9.2]	20[7.6]	-
MBZ-OH	1	84 (5.4)	0.9968	0.9984	22[6.8]	5[4.2]	-
FLU	1	79 (3.4)	0.9953	0.9979	10[7.4]	6[3.7]	-
NH ₂ -FLU	10	77 (7.2)	0.9957	0.9961	22[7.7]	18[5.3]	-
OFZ	5	89 (5.6)	0.9952	0.9980	23[8.1]	17[6.4]	10
OXI	1	87 (6.1)	0.9981	0.9995	19[6.5]	13[5.2]	-
CBZ	1	90 (3.4)	0.9994	0.9998	12[7.9]	11[5.3]	-
TCZ	1	76 (7.2)	0.9994	0.9998	18[7.2]	12[6.4]	-
KETO-TCZ	1	65 (8.6)	0.9977	0.9988	15[8.4]	14[7.5]	-
FEB	1	92 (3.5)	0.9968	0.9998	14[6.5]	14[3.8]	10
LEV	1	94 (2.2)	0.9979	0.9999	19[8.6]	16[5.4]	-

Table 3. Quality parameters of the method for the determination of coccidiostats in feed

Compound	LCL (mg kg ⁻¹)	Recovery (% RSD)	Linearity (r)	Run-to-run (% RSD) [Accuracy (rel. error %)]	
				Low level (1 mg kg ⁻¹)	Medium level (10 mg kg ⁻¹)
MON	0.5	92 (5.1)	0.9974	19[9.2]	15[6.3]
SAL	0.25	87 (3.4)	0.9991	20[8.5]	18[6.7]
NAR	0.25	84 (6.2)	0.9989	24[9.1]	17[8.1]
ROB	0.5	72 (7.5)	0.9992	19[10.6]	14[9.4]

**Figure 3.** Extracted ion chromatogram and mass spectrum of a monensin-mediated feed at 100 mg kg⁻¹.

of the samples, matrix-matched calibration curves were used for the same reason as exposed in the determination of benzimidazoles in milk. Method lowest calibration levels were established by spiking the blank samples at low mg kg⁻¹ levels and matrix-matched calibration curves were prepared along the specified range with replicates at two different concentration levels (1 and 10 mg kg⁻¹) to evaluate the run-to-run precision. Recoveries were estimated following the same strategy as in the benzimidazole method and values higher than 72% were achieved for the studied coccidiostats. Data reporting method performance are summarized in Table 3. As can be seen, acceptable results were achieved in terms of linearity and run-to-run precision and accuracy even without the use of an internal standard.

Additionally, to assess the applicability of the method, a feed medicated with monensin at a declared concentration of 100 mg kg⁻¹ was subjected in triplicate to the whole QuEChERS and DART-orbitrap MS analysis. Figure 3 shows the extracted ion (*m/z* 693.4168) chromatogram, the mass spectrum obtained for the medicated feed and a zoom of the isotopic cluster ion [M+Na]⁺. From the isotopic pattern it can be observed that the [M+1]⁺ ion shows a relative abundance close to 40%, which is in agreement with an elemental composition containing around 40 carbon atoms. A good match of experimental and model isotopic clusters

(generated by the software using the respective elemental formula) was obtained. Besides the characteristic isotopic distribution, the observed mass of each ion was compared to the theoretical one, concluding that the identity of the compound could be confirmed with an observed mass error of 2.5 ppm. For the quantification of the sample the matrix-matched calibration curve was used providing a concentration value of 94 mg kg⁻¹ of monensin in the medicated feed.

CONCLUSIONS

This study has demonstrated that the combination of a simple and fast QuEChERS-like sample treatment with DART-orbitrap MS can be a useful tool for the screening of antiparasitic veterinary drugs in edible matrices. The ionization of coccidiostats and benzimidazoles was successfully accomplished enabling the observation of the protonated ([M+H]⁺) or deprotonated ([M-H]⁻) ions for most of the studied compounds with the exception of the polyether ionophores which provided the sodium adducts ([M+Na]⁺) as the most intense peaks in the DART mass spectra. The use of a high-resolution mass spectrometer allowed accurate mass measurements of the analyte signals and their isotopic

clusters provided higher confidence in identification of the target drugs. The optimization of the QuEChERS procedure allowed an improvement in the ionization of the compounds once they were found in the real matrix, the combination of PSA and C₁₈ the best sorbents for the dispersive SPE cleanup. The study demonstrates that it is possible to quantify the analytes even if no internal standard is used; however, it is still recommended to employ an appropriate internal standard (preferably isotope labeled) in order to compensate signal variations encountered during repeated sample introductions and to improve method recoveries. Following this strategy, coccidiostats in chicken feed and benzimidazoles in milk could be analyzed by the DART-orbitrap MS technique within seconds by performing two analyses for each polarity and matrix. The developed methods allowed the quantification of a wide range of antiparasitic veterinary drugs at the levels established by the EU legislation (ranging from 10 to 0.5 mg kg⁻¹).

Acknowledgements

Financial support from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6046137305) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (CTQ2009-09253) is gratefully acknowledged. Anna Martínez Villalba thanks the Spanish Ministry of Science and Technology for an FPI grant.

REFERENCES

- [1] J. M. F. Nogueira, T. Sandra, P. Sandra. Multiresidue screening of neutral pesticides in water samples by high performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *505*, 209.
- [2] M. Petrovic, M. Gros, D. Barcelo. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in wastewater by ultra-performance liquid chromatography–quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1124*, 68.
- [3] T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, J. Hajšlová. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: A novel challenge in multiresidue pesticide analysis in food. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *577*, 8.
- [4] F. Hernández, O. J. Pozo, J. V. Sancho, L. Bijlsma, M. Barreda, E. Pitarch. Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1109*, 242.
- [5] D. Ortelli, P. Edder, C. Corvi. Multiresidue analysis of 74 pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *520*, 33.
- [6] C. Cháfer-Pericás, A. Maquieira, R. Puchades, J. Miralles, A. Moreno. Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs. LC-MS-MS. *Food Control* **2011**, *22*, 993.
- [7] A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden, M. Widmer. Quantitative multiresidue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub-2- μ m particulate high-performance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1194*, 66.
- [8] S. A. C. Wren. Peak capacity in gradient ultra performance liquid chromatography (UPLC). *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, *38*, 337.
- [9] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, M. T. Galceran, J. L. Lliberia, B. Bagó, M. A. Cortes. Ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 195.
- [10] A. Villiers, F. Lestremau, R. Szucs, S. Gélébart, F. David, P. Sandra. Evaluation of ultra performance liquid chromatography: Part I. Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1127*, 60.
- [11] Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan, R. G. Cooks. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* **2004**, *306*, 471.
- [12] R. B. Cody, J. A. Laramée, H. D. Durst. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297.
- [13] A. Venter, M. Nefliu, R. G. Cooks. Ambient desorption ionization mass spectrometry. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 284.
- [14] C. N. McEwen, R. G. McKay, B. S. Larsen. Analysis of solids, liquids, and biological tissues using solids probe introduction at atmospheric pressure on commercial LC/MS instruments. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 7826.
- [15] Z. Takats, I. Cotte-Rodriguez, N. Talaty, H. W. Chen, R. G. Cooks. Direct, trace level detection of explosives on ambient surfaces by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem. Commun.* **2005**, 1950.
- [16] M. J. Ford, G. J. Van Berkel. An improved thin-layer chromatography/mass spectrometry coupling using a surface sampling probe electrospray ion trap system. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 1303.
- [17] M. Curtis, M. A. Minier, P. Chitranshi, O. D. Sparkman, P. R. Jones, L. Xue. Direct analysis in real time (DART) mass spectrometry of nucleotides and nucleosides: Elucidation of a novel fragment [C₅H₅O]⁺ and its in-source adducts. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 1371.
- [18] L. Song, A. B. Dykstra, H. Yao, J. E. Bartmess. Ionization mechanism of negative ion-direct analysis in real time: A comparative study with negative ion-atmospheric pressure photoionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 42.
- [19] J. P. Williams, V. J. Patel, R. Holland, J. H. Scrivens. The use of recently described ionisation techniques for the rapid analysis of some common drugs and samples of biological origin. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, *20*, 1447.
- [20] E. Jagerdeo, M. Abdel-Rehim. Screening of cocaine and its metabolites in human urine samples by direct analysis in real-time source coupled to time-of-flight mass spectrometry after online preconcentration utilizing microextraction by packed sorbent. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, *20*, 891.
- [21] C. Petucci, J. Diffendal, D. Kaufman, B. Mekonnen, G. Terefenko, B. Musselman. Direct analysis in real time for reaction monitoring in drug discovery. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5064.
- [22] J. Hajšlova, T. Cajka, L. Vaclavik. Challenging applications offered by direct analysis in real time (DART) in food-quality and safety analysis. *Trends Anal. Chem.* **2011**, *30*, 204.
- [23] L. Vaclavik, J. Rosmus, B. Popping, J. Hajšlova. Rapid determination of melamine and cyanuric acid in milk powder using direct analysis in real time-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 4204.
- [24] J. Schurek, L. Vaclavik, H. D. Hooijerink, O. Lacina, J. Poustka, M. Sharman, M. Caldwell, M. W. F. Nielen, J. Hajšlova. Control of strobilurin fungicides in wheat using direct analysis in real time accurate time-of-flight and desorption electrospray ionization linear ion trap mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9567.

- [25] E. S. Chernetsova, G. E. Morlock. Assessing the capabilities of direct analysis in real time mass spectrometry for 5-hydroxymethylfurfural quantitation in honey. *Int. J. Mass Spectrom.* **2012**, *314*, 22.
- [26] R. L. Self, W. H. Wu. Rapid qualitative analysis of phthalates added to food and nutraceutical products by direct analysis in real time/orbitrap mass spectrometry. *Food Control* **2012**, *25*, 13.
- [27] L. Wang, P. Zhao, F. Zhang, Y. Li, C. Pan. Direct analysis in real time mass spectrometry for the rapid identification of four highly hazardous pesticides in agrochemicals. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, *26*, 1859.
- [28] L. Vaclavik, M. Zachariasova, V. Hrbek, J. Hajslova. Analysis of multiple mycotoxins in cereals under ambient conditions using direct analysis in real time (DART) ionization coupled to high resolution mass spectrometry. *Talanta* **2010**, *82*, 1950.
- [29] L. Vaclavik, T. Cajka, V. Hrbek, J. Hajslova. Ambient mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source for olive oil quality and authenticity assessment. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *645*, 56.
- [30] T. Cajka, K. Riddellova, M. Tomaniova, J. Hajslova. Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint. *J. Chromatogr. A* **2010** *1217*, 4195.
- [31] O. P. Haefliger, N. Jeckelmann. Direct mass spectrometric analysis of flavors and fragrances in real applications using DART. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1361.
- [32] K. Kpegba, T. Spadaro, R. B. Cody, N. Nesnas, J. A. Olson. Analysis of self-assembled monolayers on gold surfaces using direct analysis in real time mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 5479.
- [33] M. Zhou, J. F. McDonald, F. M. Fernández. Optimization of a direct analysis in real time/ time-off mass spectrometry method for rapid serum metabolomic fingerprinting. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2010**, *21*, 68.
- [34] J. Adams. Analysis of printing and writing papers by using direct analysis in real time mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *301*, 109.
- [35] Commission Directive 2009/8/EC of 10 February 2009. *Off. J. Eur. Union* L 40/19.
- [36] Official Journal of the European Union, L224 18 August 1990, Council Regulation 2377/90/EC of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin, Brussels, Belgium, **1990**.
- [37] E. Cheneau, J. Henri, Y. Pitotais, J. P. Abjean, B. Roudaut, P. Sanders, M. Laurentie. Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for quantification of monensin in plasma and edible tissues of chicken used in pharmacokinetic studies: Applying a total error approach. *J. Chromatogr. B* **2007**, *850*, 15.
- [38] A. Martinez-Villalba, E. Moyano, M. T. Galceran. Fast liquid chromatography/multiple-stage mass spectrometry of coccidiostats. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 1255.
- [39] J. A. Harris, C. A. L. Russell, J. P. G. Wilkins. The characterization of polyether ionophore veterinary drugs by HPLC-electrospray MS. *Analyst* **1998**, *123*, 2625.
- [40] S. J. Lehotay, K. Mastovská, S. J. Yun. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 630.
- [41] S. J. Lehotay, K. Mastovská, A. R. Lightfield. Use of buffering and other means to improve results of problematic pesticides in a fast and easy method for residue analysis of fruits and vegetables. *J. AOAC Int.* **2005**, *88*, 615.
- [42] O. Shimelis, Y. Yang, K. Stenerson, T. Kaneko, M. Ye. Evaluation of a solid-phase extraction dual-layer carbon/primary secondary amine for clean-up of fatty acid matrix components from food extracts in multiresidue pesticide analysis. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1165*, 18.

CAPÍTOL 3

Discussió de resultats

La discussió dels resultats obtinguts en aquesta tesi que s'han inclòs en les publicacions del capítol 2, s'ha organitzat en quatre àrees temàtiques diferenciades: tractament de mostra, separació dels compostos d'estudi, espectrometria de masses i paràmetres de qualitat dels mètodes d'anàlisi desenvolupats. Aquesta agrupació permet discutir de forma conjunta i valorar de forma global el treball dut a terme així com posar en relleu les fites més rellevants assolides en cada etapa del procediment analític.

3.1 Tractament de mostra

En la present tesi s'han desenvolupat mètodes d'anàlisi de coccidiostats en aigua, productes carnis, ous i pinsos així com de benzimidazoles en llet. El tractament de mostra emprat en cada cas s'ha ajustat a les famílies de compostos a analitzar així com a la matriu en estudi.

En línies generals, el mètode emprat, tant per a l'extracció dels coccidiostats com de les benzimidazoles, ha estat una extracció amb acetonitril modificant, en cas que fos necessari, el pH del medi d'extracció mitjançant l'addició d'àcid fòrmic o bé de solucions aquoses d'amoniac o bé afegint sals com per exemple NaCl i MgSO₄ en el mètode QuEChERS. Ara bé, per a l'anàlisi de coccidiostats (monensina, salinomina, narasina, lasalocid, maduramicina, robenidina, diclazuril i 4,4'-dinitrocarbanilida) en mostres d'aigua s'ha emprat un procediment d'extracció en fase sòlida què en una única etapa, permet l'extracció dels analits de la matriu i la purificació dels extractes a més de la concentració dels mateixos. Aquesta metodologia de tractament de mostra va permetre obtenir uns valors de recuperació superiors al 85% per a la majoria dels compostos estudiats tal com es mostra a la taula 3 de l'article I (capítol 2). Només la robenidina va presentar una recuperació inferior (60 %) probablement degut a una baixa retenció en el reblliment de C18 durant l'etapa de càrrega de mostra que es pot explicar per la protonació del grup amino de la robenidina en les condicions de treball (mostra acidificada amb àcid fòrmic al 0,1%). Aquests valors de recuperació dels coccidiostats són molt similars als obtinguts per altres autors; per exemple, Iglesias i cols. (2012) i Herrero i cols. (2012) emprant adsorbents de base polimèrica van obtenir valors d'entre el 88% i 110% per als polièters ionòfors. Aquests autors (Iglesias i cols., 2012) indiquen

que tant la robenidina com el lasalonicid queden poc retenguts en aquests tipus d'adsorbents al pH de treball (àcid) utilitzat per la qual cosa els han eliminat de l'estudi.

Per a la resta de mostres estudiades, totes elles de tipus alimentari (ous, productes carnis, llet i pinso), es va seguir en tots els casos el mateix patró d'extracció emprant com a solvent d'extracció l'acetonitril que és el més utilitzat per a l'extracció d'aquests compostos com ja s'ha comentat a l'apartat 1.4 d'aquesta memòria. A vegades l'extracció s'ha pogut dur a terme sense afegir cap reactiu addicional com per exemple en l'extracció d'ampròlium (articles III i IV del capítol 2). Tot i així, altres vegades ha calgut afegir algun additiu, com per exemple, per a l'extracció de les benzimidazoles de la llet (mètode QuEChERS, article V i VI) on es proposa l'addició d'amoníac amb l'objectiu de tenir la majoria dels grups ionitzables de les benzimidazoles en estat neutre i així millorar la transferència dels anàlits a la fase orgànica. Seguint el mateix raonament i per tal d'afavorir la seva extracció, es va provar d'addicionar un 0,1% d'àcid fòrmic a l'acetonitril per a l'extracció dels coccidiostats dels pinsos mitjançant el mètode QuEChERS (article VI) ja que els polièters ionòfors són àcids carboxílics. Ara bé, en no observar diferències significatives pel que fa a la recuperació es va optar per no addicionar àcid fòrmic i simplificar així el procediment d'extracció. La formació de pseudomacrocicles amb un ió sodi en la cavitat interior que interacciona amb els grups polars de la molècula, com s'ha descrit al capítol 1 d'aquesta tesi, pot explicar aquest fet, ja que en aquest cas no és necessari addicionar un àcid per a mantenir la molècula neutra atesa la presència del catió sodi que compensa la càrrega negativa del grup carboxílic desprotonat. A més, l'estructura química resultant amb múltiples èter cíclics enllaçats és relativament poc polar.

Pel que fa referència a l'etapa de purificació i/o concentració, els mètodes desenvolupats en aquesta tesi es poden agrupar en els que empen la metodologia QuEChERS i els basats en extracció en fase sòlida (SPE). Excepcionalment, el mètode desenvolupat per a la determinació d'ampròlium en pollastre, ous i pinsos mitjançant cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses (article III), no inclou cap etapa de purificació de l'extracte. En aquest cas i amb la finalitat de disminuir el temps d'anàlisi, es proposa emprar l'estratègia d'*extract-and-shoot* en la qual l'extracte obtingut s'injecta directament en el sistema LC-MS/MS. Tot i la simplicitat del

tractament de mostra proposat que és evidentment un avantatge a tenir en compte, la manca d'una etapa de purificació va comportar problemes en l'etapa d'anàlisi instrumental atesa la coextracció d'altres compostos presents a les matrius d'estudi tal i com es discutirà en apartats posteriors. Les recuperacions van ser lògicament elevades (80%-90%), tenint en compte que el procediment d'anàlisi no inclou etapes en què es pugui produir la pèrdua d'anàlit, i per tant només s'avalua l'eficiència de l'extracció. De fet, la necessitat d'una etapa addicional de purificació es va posar de manifest en la determinació d'ampròlium utilitzant electroforesi capil·lar de zona amb preconcentració en línia FASI (*Field Amplified Sample Injection*) ja que la injecció dels extractes obtinguts mitjançant el procediment d'*extract-and-shoot* emprat anteriorment no proporcionava cap senyal d'ampròlium en l'electroferograma ni tan sols amb extractes adicionats amb elevades concentracions d'aquest compost. Aquest fet es degut a que l'elevat contingut de components coextrets de la matriu impedeixen la introducció en el capil·lar de l'anàlit d'interès. En aquest cas per solucionar aquest problema es proposa addicionar una etapa de *clean-up* amb SPE. A l'article IV (apartat 2) es comenten els experiments realitzats en l'avaluació de dos tipus d'adsorbents, l'Oasis MCX (*Mixed-mode Cation Exchange, Waters*) i el carbó grafititzat (Envi-Carb, Supelco). Els primers retenen els analits per interacció de bescanvi catiònic i els segons per interaccions de tipus π - π , es a dir entre electrons dels anells aromàtics, en aquets cas de l'ampròlium, i els electrons sp^2 dels àtoms de carboni que conformen l'estructura de grafit, així com per interaccions de tipus π -catió entre el grafit i l'amina quaternària. Cal esmentar que va ser necessari diluir l'extracte inicial (100% acetonitril) amb aigua desmineralitzada fins a una proporció del 90% d'aigua per tal d'assegurar la retenció de l'ampròlium en el cartutx corresponent. En el cas d'emprar els cartutxos Oasis MCX, malgrat l'evaporació de l'extracte a sequedat i posterior reconstitució en aigua desmineralitzada, la presència de traces d'amoníac en l'alíquota d'injecció (l'elució es duu a terme amb 5% d'amoníac en MeOH) va impedir la preconcentració en línia de l'ampròlium en la injecció en mode electrocinètic de la mostra raó per la qual la utilització dels cartutxos Oasis MCX va ser descartada. En canvi, els resultats obtinguts amb els cartutxos de carbó grafititzat van ser satisfactoris amb bona repetibilitat, valors de desviació estàndard relativa (RSD %) d'entre el 9,5% i el 14,2% en funció del nivell de concentració, i una recuperació global del 85%. Si aquest valor de recuperació es compara amb l'obtingut amb el mètode

d'extracció basat en la metodologia d'*extract-and-shoot* (90%) proposada l'Article III es comprova que malgrat l'etapa de purificació i concentració afegides, tan sols es perd un 5% addicional respecte a l'etapa d'extracció amb acetonitril, per tant es pot considerar que l'optimització del tractament de mostra ha estat exitosa.

En aquesta tesi també es proposa la utilització d'SPE com a etapa de purificació per a la determinació de toltrazuril i els seus principals metabòlits en productes carnis (article II, apartat 2). En aquest cas, els dos tipus de cartutxos avaluats, els Oasis HLB de base polimèrica i els de C18, van proporcionar unes bones recuperacions, tot i que les obtingudes amb els de C18 (86%-94%) van ser lleugerament superiors als de l'Oasis HLB (72%-77%), motiu pel qual es proposa emprar els primers en detriment dels polimèrics. Si es compara aquesta metodologia amb la disponible a la literatura per a l'anàlisi de productes derivats carnis (Hormazabal i cols. (2003), veure taula 1.6) la qual està basada en múltiples extraccions amb solvents com l'acetona, el tetrahidrofurà, el diclorometà i l'hexà, es posa de manifest que el mètode proposat en aquesta tesi és significativament més ràpid i senzill i a més empra dissolvents més segurs i menys contaminants.

Finalment, en el desenvolupament d'aquesta tesi es va aplicar la metodologia QuEChERS, descrita ja en l'apartat 1.4.2 del Capítol 1, per a la determinació dels fàrmacs antiparasitaris en matrius alimentàries (articles V i VI del capítol 2). La optimització d'aquesta metodologia per a la determinació de benzimidazoles en llet i de coccidiostats en pinsos es descriu a l'article V del capítol 2. En l'etapa inicial de l'extracció (extracció amb acetonitril i addició de NaCl + MgSO₄) es va seguir sense modificacions el mètode original. Ara bé, per a la purificació de l'extracte de llet en l'anàlisi de benzimidazoles es va avaluar l'addició de PSA (*Primary-Secondary Amine*) i la combinació de PSA i C18 en una proporció 1:1 com a sorbents d'eliminació de matriu. A la Figura 2 de l'article V on es compara el comportament d'aquests dos sorbents en la purificació dels extractes es pot observar una millora substancial en la resposta de la fenbendazole i la cambendazole en emprar PSA+C18, mentre que per a la resta de benzimidazoles estudiades les diferències no són significatives. Aquesta mescla de sorbents ha estat emprada en l'anàlisi de benzimidazoles en mostres de llet tant utilitzant UHPLC-APCI-MS/MS (article VI) com DART (article V) obtenint-se recuperacions superiors al 75% per a tots els anàlisis en estudi excepte per a la triclabendazole i la ketotriclabendazole que donen valors una

mica inferiors (65% i 71% respectivament). Atesos els bons resultats obtinguts en la recuperació de les benzimidazoles en mostres de llet es va avaluar l'aplicabilitat de la mescla de PSA:C18 (1:1) per a l'extracció de polièters ionòfors de pinsos. L'estudi del comportament de patrons de polièters ionòfors (àcids carboxílics) amb el PSA de naturalesa alcalina i amb una moderada capacitat d'intercanvi iònic va posar de manifest que aquests compostos no interaccionen amb el sorbent, la qual cosa indica que es pot emprar per eliminar interferències de la matriu. No obstant això, la posterior anàlisi dels extractes de pinso emprant DART-HRMS només va permetre determinar monensina, salinomicina, narasina i robenidina, compostos que van ésser detectats amb una recuperació superior al 74%, mentre que compostos com la 4,4'-dinitrocarbanilida o la maduramicina no van ser detectats probablement degut a un efecte de supressió de la ionització produïda per la presència de components de la matriu a l'extracte.

Els diversos tractaments de mostra desenvolupats en aquesta tesi han proporcionat en tots els casos resultats satisfactoris per als requeriments dels mètodes d'anàlisi posteriors, assolint-se els objectius de desenvolupar tractaments de mostra ràpids, senzills i efectius. Els mètodes basats en l'estratègia QuEChERS són més senzills i ràpids que els d'extracció en fase sòlida, si bé segons els resultats obtinguts en l'anàlisi de coccidiostats poden ser sensiblement menys efectius pel que fa a l'eliminació d'interferències de la matriu la qual cosa cal tenir especialment en compte si la tècnica d'anàlisi emprada posteriorment prescindeix de l'etapa de separació cromatogràfica habitual en l'anàlisi d'aquests compostos, com és el cas del DART-HRMS que s'ha utilitzat en aquesta tesi. Pel que fa als mètodes basats en l'extracció en fase sòlida desenvolupats per a la determinació de coccidiostats en aliments i aigües, en tots els casos s'ha demostrat que són mètodes reproductibles i efectius atesos els bons resultats obtinguts en termes de percentatges de recuperació dels analits estudiats.

3.2. Separació dels analits

La tècnica de separació utilitzada en la major part de les metodologies optimitzades en aquesta tesi ha estat la cromatografia de líquids de fase invertida emprant columnes amb fase estacionària d'octadecilsilà (C18) atesa la naturalesa apolar de la majoria dels compostos analitzats, tant coccidiostats com benzimidazoles. L'única excepció ha estat la determinació d'ampròlium per a la qual s'ha emprat cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica (HILIC) utilitzant una columna amb un rebliment de sílice pura especialment dissenyada per a la retenció de compostos amb un marcat caràcter polar (article III del capítol 2). Per aquest compost i atesa la seva naturalesa catiònica, també s'ha optimitzat un mètode de determinació emprant l'electroforesi capil·lar com a tècnica de separació (article IV del capítol 2).

Pel que fa referència als mètodes de cromatografia de líquids optimitzats, tots ells presenten un denominador comú que és la utilització de columnes de cromatografia de líquids de nova generació amb partícules de petit diàmetre, $<2\mu\text{m}$, o de nucli sòlid (*Fused-Core*), amb la finalitat de treballar en condicions de cromatografia de líquids d'ultra-elevada eficàcia (UHPLC, *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*). En aquest sentit els treballs inclosos en aquesta tesi mostren l'evolució que la instrumentació i les columnes de cromatografia de líquids ha sofert en els últims anys. Així, en el primer treball inclòs en el capítol 2 (article I) on es desenvolupa un mètode per a la separació dels coccidiostats químics, robenidina, diclazuril i 4,4'-dinitrocarbanilida i els polièters ionòfors, es va utilitzar una columna d'octadecilsilà d' $1,9\mu\text{m}$ de diàmetre de partícula (Hypersil Gold C18) amb una fase mòbil d'aigua i acetonitril però en un equip de cromatografia de líquids convencional. En aquestes condicions es generava una elevada sobrepressió que superava el valor màxim de pressió que podia suportar el sistema utilitzat, problema que es va resoldre treballant a una temperatura de 50°C que va permetre reduir la pressió ja que en aquestes condicions la viscositat de la mescla acetonitril-aigua es menor. Com ja s'ha comentat a la introducció del capítol 2 l'aparició de les noves columnes amb partícules de nucli sòlid va permetre obtenir prestacions similars a les de les columnes sub- $2\mu\text{m}$ en termes d'eficàcia sense generar les sobrepressions que aquestes produeixen i poder emprar en conseqüència,

instruments convencionals. Així, en aquesta tesi, s'ha desenvolupat un mètode per a l'anàlisi de toltrazuril i els seus dos principals metabòlits, toltrazuril sulfona i toltrazuril sulfòxid, (article II del capítol 2) emprant una columna C18 de nucli sòlid (Ascentis Express C18, 150 x 2,1 mm, 2,7 μ m) i una fase mòbil de metanol/aigua en mode gradient que ha permès obtenir una separació a línia de base dels tres compostos en menys de dos minuts. Aquesta mateixa columna cromatogràfica ha estat utilitzada per a la separació de 19 benzimidazoles, entre compostos parentals i metabòlits en menys de 7 minuts (article VI del capítol 2).

En relació a les fases mòbils utilitzades en els tres mètodes optimitzats cal esmentar que sempre s'ha emprat gradient d'elució i acetonitril o metanol com a solvent orgànic. Així, per a la separació dels coccidiostats químics i els polièters ionòfors (article I del capítol 2) es proposa emprar acetonitril i un gradient de separació molt ràpid (del 40% al 70% de ACN en 0,75 min) amb el qual s'aconsegueix una separació òptima dels 9 compostos en aproximadament 5 minuts. Aquest és també el dissolvent emprat per a la separació de les de 19 benzimidazoles (article VI del capítol 2) ja que en presentar un poder eluotrópic major que el del metanol permet disminuir el temps d'anàlisi. Cal esmentar que en aquest últim cas i degut a la diversitat de pKa dels diferents compostos, ha estat necessària una acurada optimització del pH de la fase mòbil. Els valors de pKa de les benzimidazoles (veure taula 1, article VI del capítol 2) indiquen que a pH inferiors a 2,8 totes les substàncies es troben ionitzades, mentre que per sobre d'aquest valor es comencen a trobar compostos en estat neutre que per tant, es retindran millor en la fase estacionària de C18. Els resultats experimentals confirmen aquest fet ja que en augmentar el pH de 2,65 (àcid fòrmic) a 3,75 (àcid fòrmic/acetat d'amoni) i 4,75 (àcid acètic/acetat d'amoni) s'observa un augment de la retenció de la majoria dels compostos. Aquest augment té en alguns casos, un efecte contraproductiu; per exemple, els dos primers compostos en eluir, la hidroxitiabendazole i la 2-amino-albendazole estan totalment separats a pH 2,65, amb uns temps de retenció de 1,9 min i 2,3 min respectivament, mentre que arriben a coeluir a pH 4,0 amb un temps de retenció de 2,7 min (veure Figura 2, article VI). Aquest, no és un cas aïllat ja que la variació del pH de la fase aquosa afecta en major o menor mesura a tots els compostos de manera que l'ordre d'elució es veu alterat respecte a l'observat a pHs més baixos tot i que el temps total de

separació no es veu gairebé afectat. Això últim es deu a que els compostos que elueixen amb un major temps de retenció (febantel i ceto-triclabendazole) pràcticament no s'endarrereixen; la ceto-triclabendazole (pK_a : 11,84) perquè a l'interval de pH estudiat no es modifica la ionització de la molècula, i el febantel (pK_a : 5,83) perquè a més de tenir un pK_a una unitat per sobre del pH estudiat, és el compost de major pes molecular. Atès que a pH 4,0 s'observa la coelució de tres parelles de compostos, l'esmentada anteriorment, la tiabendazole amb l'albendazole sulfòxid i l'aminoflubendazole amb la cambendazole, es proposa treballar al pH més baix (2,65) ja que a aquest pH, obtingut mitjançant l'acidificació de la fase aquosa amb un 0,1% d'àcid fòrmic, s'obté la separació de les 19 benzimidazoles estudiades. Per a la separació dels coccidiostats químics i els polièters ionòfors (article I del capítol 2) també es proposa addicionar àcid fòrmic (0,1%) a la fase mòbil, però en aquest cas concret, aquesta addició no respon a criteris cromatogràfics sinó espectromètrics ja que així s'afavoreix la ionització dels anàlits en polaritat positiva a la font d'electrosprai.

Pel que fa a l'ordre d'elució dels compostos estudiats en aquesta tesi, aquest està directament relacionat amb la seva polaritat i pes molecular com correspon a una columna de C18. Per exemple, en el mètode optimitzat per a l'anàlisi del totrazuril i els seus metabòlits (article II del capítol 2), els compostos elueixen seguint l'ordre de polaritat, el totrazuril sulfòxid en primer lloc atesa la major polaritat del grup sulfòxid respecte al grup sulfona, en segon lloc la totrazuril sulfona i finalment el totrazuril. Per altra banda, els coccidiostats químics, més polars presenten una menor retenció (article I del capítol 2) que els polièters ionòfors i l'elució d'aquests últims segueix un ordre basat en el pes molecular tot i que s'ha observat alguna excepció com per exemple, la maduramicina que tot i ser el compost de pes molecular més elevat, no és l'últim compost en eluir probablement degut a que la formació d'una estructura macrocíclica amb l'ió sodi (interacció del catió sodi amb 6 àtoms d'oxigen a l'interior de la macroestructura) deixa encara un elevat nombre d'àtoms d'oxigen a la part externa de la molècula, conferint-li així un caràcter lleugerament més polar, que fa disminuir la capacitat de retenció.

En relació als mètodes optimitzats amb cromatografia de fase invertida, cal esmentar que fins la data de publicació del treball sobre la separació del totrazuril i els seus

metabòlits inclòs en aquesta tesi, no s'havia publicat a la literatura cap mètode d'anàlisi que permetés l'anàlisi dels tres compostos alhora i a més, les metodologies descrites empraven separacions cromatogràfiques convencionals, amb uns temps d'anàlisi molt superiors al proposat en aquesta tesi.

L'ampròlium, com ja s'ha comentat repetidament en aquesta memòria, és un compost amb una amina quaternària que tal i com s'ha comprovat experimentalment, no es reté en columnes de tipus C18 emprant fases mòbils convencionals de cromatografia en fase invertida. Per aquest motiu en aquesta tesi s'han optimitzat dos mètodes especialment adequats per a l'anàlisi de compostos catiònics, la cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica (HILIC) i la electroforesi capil·lar. En HILIC s'ha escollit una columna de nucli sòlid (*Fused-Core*) de sílice pura i en electroforesi capil·lar de zona s'ha emprat FASI (*field amplified sample injection*) com a mode d'injecció. En el mètode cromatogràfic s'ha utilitzat acetonitril (60%) com a modificador orgànic a la fase mòbil ja que en les columnes HILIC de sílice pura no són recomanables els solvents pròtics, com el metanol, mentre que en electroforesi capil·lar aquest últim solvent orgànic més polar és el que finalment s'ha addicionat al tampó electroforètic (40%) per aconseguir la separació de l'ampròlium de les substàncies coextretes de la matriu. En ambdós casos s'ha estudiat l'efecte que produeix la concentració i el pH del tampó en la forma dels pics i en el temps d'elució i sempre s'ha observat que un augment de la concentració del tampó comporta una millora de la forma del pic de l'ampròlium que es fa més estret, encara que l'efecte sobre el temps d'anàlisi és diferent en les dues tècniques. Així, mentre que en HILIC l'ampròlium queda menys retingut, probablement degut a que en augmentar la força eluotròpica del dissolvent s'afavoreix el desplaçament de l'equilibri de bescanvi iònic que té lloc amb la fase estacionària, en electroforesi capil·lar el temps de migració augmenta. En aquest últim cas l'augment s'explica perquè a forces iòniques més elevades es produeix una disminució del camp elèctric efectiu i per tant, una menor velocitat lineal de les espècies carregades. L'estretament del pic en electroforesi capil·lar amb la concentració del tampó tot i que el temps de migració augmenta (veure figura 1, article IV), està lligat a un efecte de preconcentració entre el medi d'injecció (aigua 100%) i el de separació electroforètica (tampó) durant la injecció FASI. Aquesta diferència produeix la ràpida migració de l'anàlit cap a la interfície entre els dos medis

de forma que es crea una banda estreta que en aplicar la diferència de potencial de la separació, migra pel capil·lar cap al detector i com més gran és la diferència entre els dos medis, major és l'efecte de preconcentració i més estret és el pic. Pel què fa al pH, s'observa un efecte similar en les dues tècniques, en augmentar el pH, millora la forma del pic mentre que a pHs baixos es produeix un eixamplament. Aquesta millora es pot observar a la Fig. 3.1 on es mostra la variació dels pics corresponents a l'ampròlium obtinguts en HILIC (A) i en electroforesi capil·lar de zona (B) en variar el pH del tampó de 3,25 a 4,0 en el primer cas i de 4,0 a 5,5 en el segon.

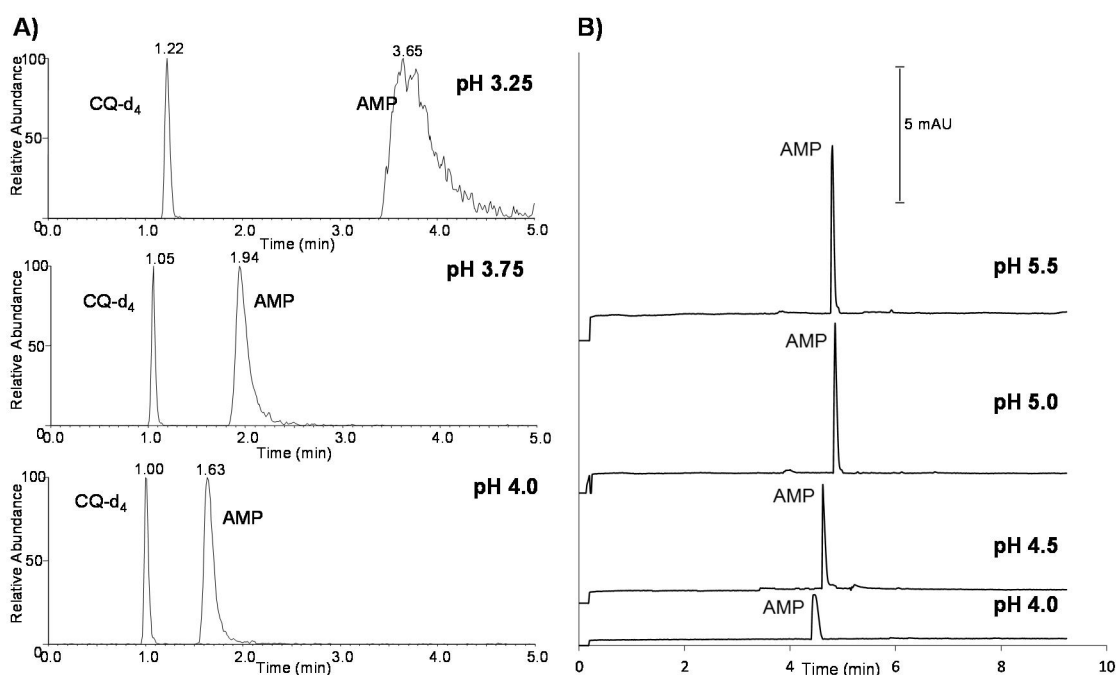


Figura 3.1. A) Cromatogrames obtinguts per a una solució estàndard d'ampròlium i clomequat-d₄ (patró intern) amb fase mòbil ACN:tampó formiat d'amoni (50 mM) (60:40) a diferents pHs. B) Electroferogrames obtinguts per a una solució estàndard d'ampròlium amb tampó electrolític d'acetat d'amoni (150 mM) a diferents pHs.

En tots dos casos s'observa un eixamplament de banda en disminuir el pH del tampó que dona lloc a pics amb cues molt importants en HILIC i en aquest cas, amb un augment significatiu del temps de retenció mentre que en electroforesi capil·lar també s'observa eixamplament però els temps de migració disminueixen a baixos pHs. Aquest comportament coincideix amb l'observat en augmentar la concentració del tampó i està directament relacionat amb l'augment de la força iònica. A pH elevat la força iònica és més gran ja que augmenta la dissociació de la forma àcida del tampó i això afavoreix

d'una banda l'elució de l'ampròlium en la columna HILIC i de l'altra, la disminució de la velocitat de migració en electroforesi capil·lar.

Per a l'anàlisi de l'ampròlium en una columna HILIC es proposa emprar com a fase mòbil acetonitril/formiat amònic a pH 4 ja que a valors superiors, el patró intern CQ-d₄ queda poc retintut i coelueix amb els components de la matriu. D'altra banda, i atès que es desaconsella emprar concentracions elevades de sals en l'acoblament LC-MS, es proposa per al tampó una concentració 50 mM com a compromís. Un altre avantatge important a esmentar d'aquest mètode està relacionat amb l'extracció de les mostres ja que es poden extreure amb acetonitril i ser injectades directament en el sistema LC-MS sense haver d'addicionar aigua a l'extracte. De fet, la injecció de la mostra al 100% d'acetonitril resulta avantatjosa quan es treballa en cromatografia HILIC, cosa que no succeeix quan es treballa en cromatografia de fase invertida. En HILIC l'acetonitril és el dissolvent de la fase mòbil de menor força eluotròpica i produeix un efecte de preconcentració dels analits en el cap de la columna cromatogràfica que contribueix a l'obtenció de pics estrets. Justament l'efecte contrari es produeix quan es treballa amb columnes de C18 en les quals es recomana injectar en solvent amb una proporció d'aigua el més elevada possible.

Per a l'anàlisi d'ampròlium amb el mètode d'electroforesi capil·lar les condicions òptimes s'han obtingut en emprar tampó aquós àcid acètic/acetat amònic 50 mM a pH 5. De fet, a pHs superiors a 5,0 no s'aprecia una millora significativa pel que fa a l'amplada dels pics i a més, augmenten considerablement els valors del corrent elèctric generat, fet que també es va observar a concentracions superiors a 150 mM. Tot i així, aquestes no van ser les condicions definitives del mètode, ja que en aplicar el mètode a l'anàlisi de mostres d'ou es va detectar una interferència amb el mateix temps de migració que l'ampròlium la qual posteriorment va ser identificada com a tiamina (vitamina B1). Per tal de separar aquests dos compostos, es va re-optimitzar la composició de l'electròlit de separació afegint metanol com a modificador orgànic fins a un 40% de la composició final del dissolvent electroforètic. El pH del component aquós format pel tampó d'àcid acètic/acetat es va baixar fins a un valor de 4,5, ja que en mesclar-se amb el component orgànic, el pH efectiu final de la mescla s'incrementa de manera que el valor final es proper a 5,0 que és el proposat amb anterioritat. L'addició

de metanol a l'electròlit de separació, va fer augmentar el temps d'anàlisi degut a una disminució de la conductivitat del medi, fet que es va minimitzar incrementant el potencial aplicat fins a +30 kV.

Ambdós mètodes desenvolupats per a l'anàlisi d'ampròlium representen una aportació innovadora en relació als mètodes que es troben a la literatura. Cal destacar, però, que el camp d'aplicació d'aquests mètodes és clarament diferent, especialment si hom té en compte el tipus de detecció emprada, la seva selectivitat i sensibilitat i el cost econòmic de l'anàlisi. El mètode d'HPLC (detecció per espectrometria de masses en tàndem) està pensat per a la detecció de residus a una concentració de ppb (ng/g) mentre que el mètode d'electroforesi capil·lar de zona (detecció UV) és una tècnica més econòmica però tan sols és capaç d'analitzar mostres a una concentració un ordre de magnitud superior (ppm ($\mu\text{g/g}$)).

3.3. Espectrometria de masses

Un aspecte important del treball desenvolupat en aquesta tesi ha estat l'estudi dels compostos a analitzar mitjançant espectrometria de masses, tècnica que s'ha emprat no tan sols com a eina de detecció acoblada a la cromatografia sinó també per a la caracterització i identificació dels anàlits. Així, en aquest apartat es discuteixen els resultats obtinguts des d'aquests dos punts de vista. Es posa especial èmfasi en aspectes rellevants d'aquesta tècnica com són els avantatges de la utilització d'espectròmetres que permeten fragmentar els analits en múltiples etapes (tàndem en el temps) que són especialment adequats per a la identificació d'ions producte en estudis de fragmentació, així com en la utilització de l'espectrometria de masses d'alta resolució. Aquesta última tècnica permet confirmar amb seguretat les assignacions dels ions i fornir suficient informació per a la identificació dels compostos. Aquestes característiques de l'espectrometria de masses d'alta resolució han permès l'optimització en aquesta tesi de metodologia per a l'anàlisi directa de fàrmacs veterinaris utilitzant el DART. La discussió, s'ha subdividit en dos apartats, el primer dedicat a comentar els resultats obtinguts en l'estudi del comportament dels compostos estudiats en espectrometria de

masses (ionització i fragmentació) i el segon que fa referència a les condicions d'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses.

Ionització i fragmentació dels compostos estudiats

Les diferents fonts d'ionització utilitzades en aquesta tesi han estat l'electrosprai (ESI), la ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) i la fotoionització a pressió atmosfèrica (APPI) que s'han emprat en sistemes acoblats a la cromatografia de líquids, així com el *direct analysis in real time* (DART), tècnica d'ionització que s'ha emprat per avaluar l'aplicabilitat de l'anàlisi directa sense separació cromatogràfica. Les tècniques a utilitzar en cada cas concret s'han escollit a partir de la informació bibliogràfica disponible o a partir de la comparació de les respostes obtingudes per als fàrmacs antiparasitaris en les fonts avaluades. En concret, per als polièters ionòfors s'ha emprat una font d'ESI en mode positiu i en aquestes condicions s'ha obtingut com a pic base de l'espectre l'adducte de la molècula amb sodi ($[M+Na]^+$) que és el descrit a la literatura com a majoritari per aquests compostos (Volmer i cols., 1998; Lopes i cols., 2002). La capacitat d'aquestes molècules de formar aquests adductes rau en la conformació pseudomacrocíclica que adopten en solució i que dona lloc a estructures estables en afavorir les interaccions per pont d'hidrogen entre el grup carboxílic i l'hidroxil terminal de la molècula (veure figura 1.2 del Capítol I). Aquesta estabilitat explica que aquests adductes també s'hagin observat en DART(+) (article V), tot i que en aquesta font d'ionització habitualment no es generen aquest tipus d'ions. Els polièters ionòfors també es ionitzen en ESI(-) atès que són àcids carboxílics i en aquest mode d'ionització generen l'ió $[M-H]^-$, encara que la resposta és molt menor que l'obtinguda en polaritat positiva. En canvi, la polaritat negativa és l'òptima per als coccidiostats químics diclazuril i 4,4'-dinitrocarbanilida, atesa la capacitat d'estabilitzar la carrega negativa que tenen els grups carbonil adjacents a les amines de les seves estructures (Fig. 1, article I). Els altres coccidiostats químics es ionitzen en polaritat positiva generant la molècula protonada. Polaritat positiva és també l'adequada per a l'ampròlium (articles III i IV) com correspon a una sal d'amoni quaternari. Aquest compost dona en conseqüència com a pic base de l'espectre tan en ESI com en APCI, l'ió de m/z 243, que correspon a la massa

monoisotòpica del catió ampròlium. El toltrazuril i els seus metabòlits, toltrazuril sulfona i toltrazuril sulfòxid (article II) es ionitzen tan en ESI com en APCI generant com a pic base dels espectres els ions $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ segons correspongui a la polaritat de treball seleccionada. Ara bé, en APCI en polaritat negativa el pic base de l'espectre del tottrazuril i la tottrazuril sulfona no correspon a l'ió molecular desprotonat sinó que és el $[M-69]^-$ que prové d'una fragmentació a la font deguda a la pèrdua del fragment CF_3 , fragmentació que també fou observada per Li i cols. (2006). El mateix fenomen s'ha observat per al tottrazuril sulfòxid que dóna com a pic base de l'espectre l'ió $[M-70]^-$ resultat de la pèrdua del fragment CHF_3 . Cal esmentar però que l'ió corresponent a la molècula desprotonada també s'observa en els espectres d'aquestes substàncies amb una abundància que va del 5% per al tottrazuril al 60% per al tottrazuril sulfòxid. Pel que fa al comportament dels coccidiostats químics a la font DART, i a diferència dels polièters ionòfors, els compostos que es ionitzen en polaritat positiva generen l'ió $[M+H]^+$ com a pic base de l'espectre i no s'observa la presència d'adductes. A mode d'exemple a la figura 3.2 es mostra l'espectre obtingut per a una mescla de patrons de coccidiostats en DART(+)-HRMS on es pot observar la presència dels adductes amb sodi per als polièters ionòfors monensina, salinomicina i narasina i els ions protonats per als coccidiostats químics clopidol i robenidina. Cal destacar la baixa senyal observada per a la maduramicina deguda probablement al seu elevat pes molecular que dificulta la seva desorció de la vareta de vidre que s'utilitza per introduir la mostra a la font d'ionització DART. L'ampròlium no va ser detectat en aquestes condicions possiblement per la mateixa raó, ja que en trobar-se com a catió en la solució és difícil la transferència a la fase gas.

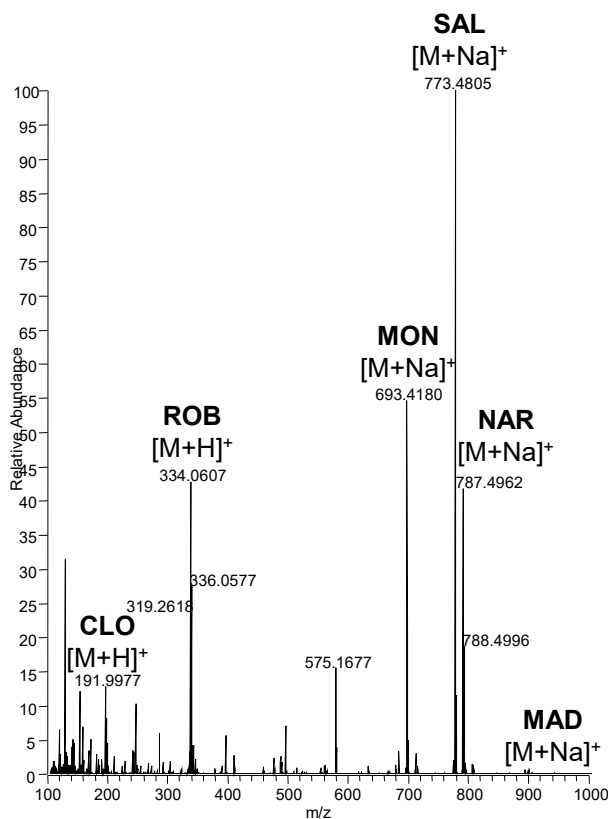


Figura 3.2. Espectre de masses obtingut en DART(+)-HRMS d'una solució patró de coccidiostats de concentració 1 µg/mL

L'establiment d'un mètode per a l'anàlisi de les benzimidazoles (article VI) ha permès comparar el comportament de tres fonts d'ionització convencionals APCI, ESI i APPI, estudi que s'ha completat amb la utilització d'una tècnica *ambient*, el DART (article V). Els resultats posen de manifest que les benzimidazoles poden ser ionitzades tan en ESI com en APCI i DART en els dos modes d'ionització (positiu i negatiu) proporcionant com a únic ió de l'espectre de masses el $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ corresponent. Aquesta capacitat és deguda a la nombrosa presència de nitrògens a l'estructura que tenen propietats àcides o bàsiques en funció de la seva posició a la molècula i l'aromaticitat de la mateixa. Únicament la ceto-triclabendazole no proporciona cap ió estable en mode positiu mentre que sí que ho fa en mode negatiu ja que l'electronegativitat dels àtoms de clor en la seva estructura (Taula 1, article VI) estabilitza la càrrega negativa. Per aquesta raó es proposa analitzar aquesta molècula així com el seu compost parental la triclabendazole en polaritat negativa. En general, les respostes obtingudes per a les benzimidazoles en APCI són superiors (10-20 %) que en l'ESI. Pel que fa referència a l'aplicabilitat de l'APPI amb l'addició post-columna de dopants (toluè, acetona,

tetrahidrofurà, anisol i clorbenzè) per tal d'afavorir la fotoionització de les benzimidazoles, els resultats obtinguts no van ser satisfactoris en cap cas, ja que els senyals registrats varen ser de baixa intensitat per tots els anàlits. A diferència de les altres fonts d'ionització estudiades, en APPI a més d'obtenir-se els ions corresponents a la protonació (+) o desprotonació (-) de les molècules en estudi també es va observar en emprar clorbenzè i l'anisol com a dopants, la formació dels cations o anions radicals amb abundàncies relatives entre el 40% i el 100%. La coexistència de l'ió radical i la molècula protonada o desprotonada és desfavorable des del punt de vista de la resposta, ja que aquesta s'ha de dividir entre els dos ions originats. Com s'ha comentat en la introducció del capítol 2, l'APPI és una font d'ionització indicada per a l'anàlisi de compostos apolars amb un elevat grau d'aromaticitat. En aquest cas, les benzimidazoles no són compostos amb una certa polaritat i tot i que tenen l'anell benzimidazol a la seva estructura, probablement aquesta aromaticitat no és suficient per ser uns bons candidats a ésser analitzats per APPI. Atesos els resultats obtinguts amb les diferents fonts d'ionització estudiades, es va seleccionar l'APCI en mode positiu o negatiu en funció de la millor resposta observada per a cada analit per a la posterior anàlisi. Aquesta conclusió contrasta amb la metodologia disponible a la literatura que majoritàriament empra fonts de tipus ESI per a l'anàlisi d'aquests compostos, probablement degut a la major disponibilitat d'aquesta font en els laboratoris d'anàlisi. Només una publicació de l'any 1998 de Cannavan i cols. empra una font d'APCI per a l'anàlisi de tiabendazole i el seu metabòlit majoritari, la hidroxitiabendazole en mostres de teixit animal.

En aquesta tesi s'ha aprofundit en l'estudi de la fragmentació dels compostos antiparasitaris en espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) per tal d'identificar els ions fragment, establir la relació genealògica entre els ions generats i seleccionar els ions més abundants i selectius i per la posterior anàlisi (quantificació i confirmació) en LC-MS/MS. Per aquests estudis s'ha utilitzat un analitzador de trampa d'ions (IT) que permet dur a terme fragmentacions successives en l'espai dels ions generats, mentre que el triple quadrupol (QqQ) s'ha emprat per a la quantificació ja que permet disminuir els límits de detecció en treballar en SRM.

En els estudis de fragmentació s'han utilitzat les fonts d'ionització i els ions precursors més abundants dels espectres obtinguts en *full-scan*. Per exemple, per als polièters

ionòfors s'ha utilitzat l'adducte amb sodi, $[M+Na]^+$, mentre que per als coccidiostats químics i les benzimidazoles s'ha emprat l'ió molecular protonat, $[M+H]^+$. Cal esmentar que en intentar fragmentar els ions moleculars protonats o desprotonats obtinguts en ESI per al toltrazuril i els seus metabòlits no es va obtenir cap ió estable, motiu pel qual es va treballar en APCI(-) seleccionant com a ió precursor el $[M-CF_3]^-$ per al toltrazuril i la toltrazuril sulfona i el $[M-CHF_3]^-$ per a toltrazuril sulfòxid. En relació als ions producte obtinguts, s'ha constatat que en alguns casos, són poc específics com per exemple, els dels polièters ionòfors per als quals majoritàriament el pic base de l'espectre d'ions producte és l'ió provinent de la pèrdua d'una molècula d'aigua ($m/z -18$). En aquests casos la fragmentació successiva en una trampa d'ions ha permès d'obtenir informació sobre ions més selectius utilitzables per a la confirmació. Per exemple, en l'espectre MS^3 dels polièters ionòfors que contenen un grup cetona (salinomicina, narasina i lasalocid) obtingut seleccionant com a ió precursor l'ió de segona generació (MS^2) $[M+Na-H_2O]^+$, s'observen els ions provinents del trencament de l'enllaç en posició β respecte a aquest grup. La figura 3 de l'article I mostra el mecanisme d'aquesta fragmentació. Els altres compostos de la família (monensina i maduramicina) generen altres ions producte generalment provinents de la fragmentació dels èters cíclics. Les fragmentacions obtingudes en MS^3 en una trampa d'ions són directament observables en els espectres de MS/MS obtinguts en un equip de QqQ en el qual es poden produir col·lisions múltiples tal com reporten altres autors (Dubois i cols. (2005), Rokka i cols (2006), Jestoi i cols. (2007)). En aquesta tesi s'ha proposat la utilització d'ions de tercera generació (MS^3) com ions de confirmació en MS/MS per a l'anàlisi d'alguns coccidiostats (Fig. 5 article I) així com de les benzimidazoles (Fig. 1 article VI). Un exemple interessant de l'aportació que pot comportar la utilització d'analitzadors que fragmenten en el temps com les trampes d'ions, ha estat la identificació d'alguns dels ions de l'espectre de masses de l'amprolium obtingut en un triple quadrupol. Com es posa de manifest a la figura 2 del article III, els ions de baixa intensitat de l'espectre obtingut en el triple quadrupol (m/z 122; 135 i 108) provenen de l'ió producte majoritari (m/z 150) i es generen per múltiples col·lisions que afavoreixen el trencament de la cadena alquílica de l'ió fragment aminopirimidílic (m/z 150).

Un fet a destacar dels estudis de fragmentació duts a terme en aquesta tesi ha estat el comportament de la maduramicina. El pic base de l'espectre d'ions producte obtingut a partir de l'ió precursor $[M+Na]^+$ és l'ió $[M+Na-62]^+$ enlloc de la pèrdua d'aigua com els altres polièters ionòfors (article I). Aquesta fragmentació es pot explicar per la pèrdua simultània de H_2O i CO_2 , que és possible per la conformació pseudomacro-cíclica que adopten aquestes molècules (veure figura 1.2 del Capítol 1). L'assignació es va confirmar utilitzant espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) amb un analitzador Orbitrap a un poder de resolució de 60000. L'error en l'assignació de la massa és més baix per a aquesta proposta que per a d'altres possibles assignacions com per exemple la pèrdua de dos grups metoxi que conseqüentment van ser descartades (Taula 2, article I). La pèrdua simultània de H_2O i CO_2 també ha estat observada, i confirmada per HRMS, per a d'altres polièters ionòfors en MS^3 (Taula 1, article I)

En general, la fragmentació dels compostos que contenen heteroàtoms a la seva estructura té lloc en els enllaços amb els heteroàtoms. Per exemple, l'ió base de l'espectre MS/MS de l'ampròlium correspon a una fragmentació per l'enllaç adjacent al nitrogen quaternari (Fig. 2, article III), el de la robenidina es genera pel trencament de l'enllaç N-N, la dinitrocarbanilida es trenca per l'enllaç amida i el diclazuril per l'anell de triazina (article I). El pic base de l'espectre d'ions producte del toltrazuril i els seus metabòlits es deu també al trencament de l'anell de triazina (Taula 2, article II). Les benzimidazoles també segueixen aquest patró de fragmentació (Taula 2, article V), la triclabendazole i la ceto-triclabendazole originen ions fragment provinents de la pèrdua de l'anell de diclorobenzè enllaçat a un grup èter, les que contenen un grup metilcarbamat a l'anell imidazol normalment perden metanol pel trencament de l'enllaç en α del grup carbonil, les que contenen un substituent amb sofre en el grup fenil també es fragmenten per l'enllaç en α respecte al sofre. Aquesta última fragmentació s'afavoreix en les molècules que contenen un grup sulfòxid a l'estructura com es pot observar a la figura 1 de l'article V.

Els mètodes desenvolupats per a l'anàlisi de fàrmacs antiparasitaris mitjançant DART-HRMS no utilitzen l'espectrometria de masses en tàndem ateses les característiques de l'instrument utilitzat (Exactive, Orbitrap) que només permet realitzar una fragmentació no selectiva dels ions que s'introdueixen a la cel·la de col·lisió HCD ja que no es pot

realitzar la selecció dels ions precursors. Considerant a més, que en treballar en DART es prescindeix de la separació cromatogràfica dels compostos, no es recomana realitzar aquest tipus de fragmentació ja que és impossible correlacionar els ions precursors amb els ions producte generats. Com a alternativa per a la quantificació i identificació dels compostos s'utilitza la resolució que l'analitzador d'aquest equip és capaç de proporcionar. En el nostre estudi, per tal de definir el poder de resolució mínim a emprar es van utilitzar dos compostos, l'albendazole sulfona i la 5-hidroximebendazole, els m/z de les quals difereixen només en 33 mDa. Tal com es pot observar a la figura 3.3, es requereix un poder de resolució mínim de 25.000 FWHM per tal de separar aquests dos compostos en l'analitzador Orbitrap. Així mateix, la separació obtinguda en emprar 100.000 FWHM si bé és molt bona, ofereix una baixa sensibilitat (el senyal de fons d'escala disminueix unes 50 vegades) i una velocitat d'escombratge de tan sols 2 espectres/segon, que és massa baixa per poder reconstruir els cronogrames obtinguts en DART que són de tan sols uns pocs segons. Per aquest motiu, es va escollir com a resolució de compromís 50.000 FWHM.

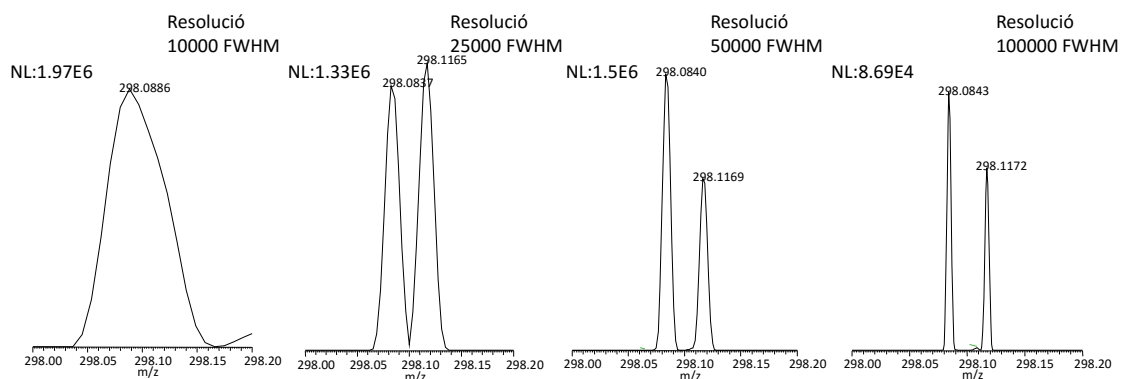


Figura 3.3. Efecte del poder de resolució utilitzat en l'Orbitrap en la separació de l'ABZ-SO₂ (m/z 298,0857 i el MBZ-OH m/z 298,1187)

Acoblament cromatografia de líquids-espectrometria de masses

Per a la quantificació i confirmació de la identitat dels analits en l'acoblament LC-MS/MS s'han escollit les transicions més selectives i abundants. A la taula 3.1 s'inclouen els ions seleccionats per a tots els compostos estudiats en aquesta tesi. Com es pot observar a la taula, diversos ions de confirmació (indicats amb *) corresponen a ions de tercera generació. En el cas dels mètodes que empren com a analitzador de masses el QqQ aquests ions de tercera generació són observats en l'etapa de MS/MS i per tant la confirmació es fa seguint la transició corresponent. En el cas d'emprar l'IT com a analitzador de masses si el mètode es configura únicament amb l'etapa de MS² en cas de trobar una mostra sospitosa de ser positiva per als compostos que requereixen ions de tercera generació (monensina, robenidina y 4,4'-dinitrocarbanilida) és necessari re-injectar la mostra activant només el mode MS³. En aquest treball el procediment es va establir d'aquesta manera degut a la limitació de la velocitat d'escombratge de la trampa d'ions utilitzada. Aquesta no era suficientment ràpida i no permetia obtenir un nombre de punts suficient per reconstruir el pic cromatogràfic si es duien a terme dues etapes de fragmentació successives. Les trampes d'ions de nova generació són suficientment ràpides i sensibles per permetre aplicar dues etapes de fragmentació successives sense problemes.

Un tema a tenir en compte en l'acoblament LC-MS/MS és l'efecte matriu especialment important en emprar electrosprai com a tècnica d'ionització. És per tant necessari, avaluar la resposta dels compostos en les mostres i comparar-la amb la dels patrons a la mateixa concentració per comprovar si existeixen diferències significatives entre patrons i mostres. En aquesta tesi s'ha posat clarament de manifest que l'efecte matriu depèn tant de l'anàlit com de la mostra analitzada. Per exemple, en la determinació de coccidiostats en aigua (article I) aquest efecte no fou significatiu, tot i que la font d'ionització és l'ESI especialment propensa a sofrir efectes matriu. El tipus de mostra, relativament neta explica aquest comportament i va permetre proposar un mètode de calibratge extern per a la quantificació sense que l'exactitud del mètode es veiés afectada.

Taula 3.1. Ions seleccionats per a l'anàlisi de fàrmacs antiparasitaris en l'acoblament LC-MS/MS

Compost	Font ionització	Analitzador de masses	Ió precursor	Ió producte 1 (quantificació)	Ió producte 2 (confirmació)
Monensina	ESI	IT	693 ([M+Na] ⁺)	675 ([M+Na-H ₂ O] ⁺)	657*([M+Na-H ₂ O-H ₂ O] ⁺)
Salinomicina	ESI	IT	773 ([M+Na] ⁺)	755 ([M+Na-H ₂ O] ⁺)	531 ([M+Na-C ₁₃ H ₂₂ O ₄] ⁺)
Narasina	ESI	IT	787 ([M+Na] ⁺)	769 ([M+Na-H ₂ O] ⁺)	531 ([M+Na-C ₁₄ H ₂₄ O ₄] ⁺)
Lasalocid	ESI	IT	613 ([M+Na] ⁺)	595 ([M+Na-H ₂ O] ⁺)	577([M+Na-2H ₂ O] ⁺)
Maduramicina	ESI	IT	939 ([M+Na] ⁺)	877 ([M+Na-(H ₂ O+COO)] ⁺)	397 ([M+Na-C ₂₉ H ₅₀ O ₉] ⁺)
Robenidina	ESI	IT	334 ([M+H] ⁺)	317 ([M+H-NH ₃] ⁺)	263* ([M+H-NH ₃ -CN ₃] ⁺)
Diclazuril	ESI	IT	405 ([M-H] ⁻)	335 ([M-H-C ₂ H ₂ ON ₂] ⁻)	334 ([M-H-C ₂ HO ₂ N] ⁻)
4,4'-Dinitrocarbanilida	ESI	IT	301 (M-H) ⁻	137 ([M-H-C ₇ H ₄ O ₃ N ₂] ⁻)	107*([M-H-C ₇ H ₄ O ₃ N ₂ -NO] ^{-*})
Amprolium	ESI	QqQ	243 ([M] ⁺)	150 ([M-C ₆ H ₇ N] ⁺)	94 ([M-C ₈ H ₁₂ N ₃] ⁺)
Toltrazuril	APCI	QqQ	356 ([M-CF ₃] ⁻)	256 ([M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂] ⁻)	124* ([M-CF ₃ -C ₁₁ H ₁₀ O ₃ N ₃] ⁻)
Toltrazuril sulfona	APCI	QqQ	388 ([M-CF ₃] ⁻)	288 ([M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂] ⁻)	248 ([M-CF ₃ -C ₄ H ₂ O ₃ N ₃] ⁻)
Toltrazuril sulfòxid	APCI	QqQ	371 ([M-CHF ₃] ⁻)	371 ([M-CHF ₃] ⁻)	271 ([M-CF ₃ -C ₃ H ₄ O ₂ N ₂] ^{-*})
Albendazole	APCI	QqQ	266 ([M+H] ⁺)	234 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	192* ([M+H-C ₄ H ₁₀ O] ⁺)
Albendazole sulfona	APCI	QqQ	298 ([M+H] ⁺)	266 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	159* ([M+H-C ₄ H ₁₀ SO ₃] ⁺)
Albendazole sulfòxid	APCI	QqQ	282 ([M+H] ⁺)	240 ([M+H-C ₃ H ₆] ⁺)	208* ([M+H-C ₄ H ₁₀ O] ⁺)
Albendazole aminosulfona	APCI	QqQ	240 ([M+H] ⁺)	133 ([M+H-C ₃ H ₆ SO ₂] ⁺)	198 ([M+H-C ₃ H ₆] ⁺)
Cambendazole	APCI	QqQ	303 ([M+H] ⁺)	217* ([M+H-C ₄ H ₆ O ₂] ⁺)	261 ([M+H-C ₃ H ₆] ⁺)
Febantel	APCI	QqQ	445 ([M-H] ⁻)	370 ([M-H-C ₂ H ₅ O ₂ N] ⁻)	298* ([M-H-C ₅ H ₉ O ₄ N] ⁻)
Fenbendazole	APCI	QqQ	300 ([M+H] ⁺)	268 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	159* ([M-H-C ₅ H ₉ O ₃ S] ⁻)
Fenbendazole sulfona	APCI	QqQ	332 ([M+H] ⁺)	300 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	159* ([M+H-C ₇ H ₆ O ₃ S] ⁺)
Flubendazole	APCI	QqQ	314 ([M+H] ⁺)	282 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	95 ([M+H-C ₁₀ H ₈ O ₃ N ₃] ⁺)
Flubendazole amino	APCI	QqQ	256 ([M+H] ⁺)	95* ([M+H-C ₈ H ₇ ON ₃] ⁺)	123 ([M+H-C ₉ H ₉ O ₂ N ₃ H] ⁺)
Mebendazole	APCI	QqQ	296 ([M+H] ⁺)	264 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	105* ([M+H-C ₈ H ₁₀ O ₂] ⁺)
Mebendazole amino	APCI	QqQ	238 ([M+H] ⁺)	105 ([M+H-C ₈ H ₁₀ O ₂] ⁺)	77* ([M+H-C ₈ H ₇ ON ₃] ⁺)
Hidroximebendazole	APCI	QqQ	298 ([M+H] ⁺)	266 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	-
Oxfendazole	APCI	QqQ	316 ([M+H] ⁺)	159 ([M+H-C ₇ H ₉ O ₂ S] ⁺)	191 ([M+H-C ₆ H ₅ OS] ⁺)

Taula 3.1. Ions seleccionats per a l'anàlisi de fàrmacs antiparasitaris en l'acoblament LC-MS/MS (continuació)

Compost	Font ionització	Analitzador de masses	Ió precursor	Ió producte 1 (quantificació)	Ió producte 2 (confirmació)
Oxibendazole	APCI	QqQ	250 ([M+H] ⁺)	218 ([M+H-CH ₃ OH] ⁺)	131* ([M+H-C ₂ HNS] ⁺)
Tiabendazole	APCI	QqQ	202 ([M+H] ⁺)	175 ([M+H-CHN] ⁺)	131* ([M+H-C ₂ HNS] ⁺)
Hidroxitiabendazole	APCI	QqQ	218 ([M+H] ⁺)	147* ([M+H-C ₂ HNS] ⁺)	191 ([M+H-CHN] ⁺)
Triclabendazole	APCI	QqQ	357 ([M-H] ⁻)	197* ([M-H-C ₇ H ₆ Cl ₂] ⁻)	342 ([M-H-CH ₃] ^{-*})
Ceto-triclabendazole	APCI	QqQ	327 ([M-H] ⁻)	182 ([M-H-C ₆ H ₃ Cl ₂] ^{-*})	146* ([M-H-C ₆ H ₄ Cl ₃] ^{-*})

*Ions generats en etapa de MS³ en analitzador IT.

En canvi, tan en la determinació de benzimidazoles en llet (article V) com en la determinació de toltrazuril i els seus metabòlits en productes carnis (article II), es va arribar a observar una supressió de la senyal de fins a un 22 % tot i utilitzar una font d'ionització d'APCI. Per aquest motiu, en aquests mètodes es proposa emprar calibratge en matriu (*matrix-matched calibration*) que permet evitar la quantificació de les mostres per defecte ja que tan els patrons com les mostres pateixen la supressió iònica en la mateixa mesura. Ara bé, aquest mètode requereix disposar d'una matriu blanca de cada tipus de mostra a analitzar. La determinació d'ampròlium mitjançant LC-(ESI)MS/MS (article III), representa un cas completament diferent ja que es va observar un importat efecte d'augment de la resposta, que per als extractes adicionats és més del doble de la obtinguda en les corresponents solucions patró. Es produeix un increment del senyal degut a la presència de substàncies coextretes de la matriu que coelueixen amb l'ampròlium. En aquest cas es posa clarament de manifest l'efecte de la matriu (pinso, ous i múscul de pollastre). El procediment dut a terme per a la identificació de la substància responsable d'aquest augment del senyal (*enhancement*) és una mostra de la utilització de les possibilitats que ofereixen les diferents tècniques d'espectrometria que es troben a disposició de l'analista en un moment donat. L'obtenció de l'espectre de masses en mode *full scan* en la regió d'elució de l'ampròlium va permetre observar la presència d'un pic cromatogràfic al temps de retenció de l'ampròlium corresponent a un ió de m/z 162,1 (veure figura 4, article III). A partir de l'espectre MS/MS d'aquest ió, obtingut emprant un triple quadrupol que permet treballar a una relativa elevada resolució en el tercer quadrupol (Q3) ($\Delta m/z$ 0,1 FWHM), i de la utilització de programes d'elucidació estructural i bases de dades d'estructures químiques es va poder identificar el compost responsable de l'efecte matriu que va resultar ser la L-carnitina, un compost amb un grup amino quaternari que es sintetitza en el fetge i el ronyó dels animals. Aquest compost competeix amb l'ampròlium en la formació de parells iònics amb els components de la fase mòbil afavorint l'augment de la concentració d'ampròlium en la superfície de la gota de l'electrosprai i produint l'efecte d'augment del senyal (*enhancement*). Aquest efecte ha estat utilitzat en aquesta tesi per controlar l'efecte d'aquesta interferència de la matriu. Així, s'ha proposat l'addició de L-carnitina als extractes fins a una concentració 700 ng/mL de manera que l'efecte sigui el mateix en totes les matrius amb independència de la concentració de carnitina endògena ja que

els patrons de quantificació es preparen addicionant-hi aquest compost a aquesta mateixa concentració. Aquest efecte no ha estat descrit mai a la literatura relacionada amb l'anàlisi d'amprolium, si bé tots els mètodes disponibles proposen tractaments de mostra molt més exhaustius que el proposat en aquesta tesi i probablement eliminen aquesta interferència. Tot i així, la presència d'aquest compost, acaba sent beneficiosa per a la sensibilitat del mètode ja que permet baixar els límits de detecció i quantificació respecte als obtinguts per altres autors com Squadrone i cols. (2008) i Pietruk i cols. (2015) els quals obtenen límits de quantificació de 10 a 1000 vegades superiors.

En l'anàlisi d'ampròlium en mostres d'ou per CZE-UV (article IV), també es va trobar una interferència que impedia la seva quantificació. En aquest cas, l'acoblament de l'electroforesi capil·lar a un espectròmetre de masses amb un analitzador de trampa de ions va permetre obtenir els espectres en mode *full scan* i tàndem d'aquest aquest compost que va ser identificat com la tiamina o vitamina B1 (veure figura 2 de l'article IV). Identificada la interferència, i tal com s'ha exposat a l'apartat 3.2, la separació va ser re-optimitzada per a separar els dos compostos i poder continuar proposant la detecció UV com a mètode de detecció sense necessitat de l'espectrometria de masses.

En aquesta tesi s'ha utilitzat espectrometria de masses en tàndem tant emprant analitzadors de trampa d'ions com triples quadrupols treballant en baixa resolució. Tan sols s'ha emprat alta resolució (Orbitrap) en el DART i en la identificació d'ions producte com s'ha comentat a l'apartat anterior. Nogensmenys durant l'anàlisi de mostres de productes carnis per a la determinació de toltrazuril i es seus metabòlits (article II) emprant un analitzador de triple quadrupol es van evidenciar dificultats a l'hora de quantificar el toltrazuril a nivells propers al límit de quantificació. Mentre que la quantificació i confirmació de tottrazuril sulfona es pot dur a terme sense problemes emprant ambdós quadrupols en baixa resolució (Q1 $\Delta m/z$ 0,7 FWHM i Q3 $\Delta m/z$ 0,7 FWHM) les traces de quantificació (m/z 256) i confirmació (m/z 124) del toltrazuril presenten un elevat soroll de fons en aquestes condicions. Per solucionar aquest problema es va aprofitar la possibilitat que presenta el QqQ utilitzat en aquesta tesi de treballar amb una relativa alta resolució. Així, si el primer quadrupol (Q1) treballa a una resolució de $\Delta m/z$ 0,1 FWHM, mode H-SRM (*Highly selective Selected Reaction Monitoring*), s'aconsegueix reduir el soroll degut a l'eliminació de possibles

interferències isobàriques de l'ió precursor. Això permet millorar substancialment la sensibilitat del mètode i quantificar i confirmar el toltrazuril fins a un nivell de 2,2 µg/kg (veure figura 5, article II).

3.4 Paràmetres de qualitat i aplicació

Els paràmetres de qualitat de mètode (límits de detecció instrumental (LOD), límit de quantificació del mètode (MLOQ), precisió i exactitud) així com la recuperació dels diferents anàlits de les matrius analitzades han estat avaluats per a cadascun dels mètodes desenvolupats en aquesta tesi doctoral. A la taula 3.4.1 es resumeixen els valors obtinguts per a cada paràmetre i compost tot especificant el mètode emprat per a l'obtenció de cadascun dels valors així com les unitats en què s'expressa el límit de quantificació del mètode atesa la diversitat de mostres analitzades. Els valors d'exactitud i precisió recollits a la taula corresponen al nivell de concentració més baix avaluat per a cada mètode.

Analitzant les dades recollides en la taula 3.4.1 s'observa en primer lloc una clara diferència entre els LODs instrumentals obtinguts amb l'analitzador de trampa d'ions (IT), indicats amb una "a" a la taula, i els obtinguts amb un triple quadrupol de QqQ treballant en mode de SRM. Els valors obtinguts amb la trampa d'ions són en general, un ordre de magnitud superiors als del QqQ independentment del compost analitzat. Aquí s'evidencia la diferència de generacions entre instruments a més de la major sensibilitat dels instruments de QqQ treballant en mode SRM enfront de les trampes d'ions. El LOD més baix obtingut correspon a l'ampròlium en emprar LC-ESI-MS/MS (QqQ), probablement degut a l'efecte d'augment de la senyal produït per la presència de L-carnitina que s'afegeix als patrons de calibratge, com ja s'ha indicat a l'apartat anterior on es comenta l'efecte d'aquest compost en la resposta de l'ampròlium en electrospai.

Taula 3.4.1. Resum dels paràmetres de qualitat obtinguts per als diferents compostos analitzats i mètodes desenvolupats en la present tesi

Compost	Límit de detecció Instrumental (LOD) (pg injectats)	Límit de quantificació de mètode (MLOQ)	Recuperació (%)	Exactitud (% error relatiu)	Precisió (% RSD)
Salinomicina	10 ^a	33 ng/L ^a /0,25 mg/kg ^b	90 ^a /87 ^b	3 ^a /8,5 ^b	5,8 ^a /20 ^b
Narasina	15 ^a	54 ng/L ^a /0,25 mg/kg ^b	90 ^a /84 ^b	3 ^a /9,1 ^b	6,5 ^a /24 ^b
Lasalocid	20 ^a	69 ng/L ^a	85 ^a	4 ^a	6,7 ^a
Monensina	15 ^a	51 ng/L ^a /0,5 mg/kg ^b	92 ^a /92 ^b	3 ^a /9,2 ^b	5,2 ^a /19 ^b
Maduramicina	25 ^a	93 ng/L ^a	80 ^a	5 ^a	8,7 ^a
Robenidina	30 ^a	150 ng/L ^a /0,5 mg/kg ^b	60 ^a /72 ^b	8 ^a /10,6 ^b	12,1 ^a /19 ^b
Diclazuril	60 ^a	213 ng/L ^a	85 ^a	6 ^a	7,4 ^a
4,4'-dinitrocarbanilida	50 ^a	168 ng/L ^a	90 ^a	5 ^a	9,3 ^a
Toltrazuril	0,5 ^c /0,5 ^d	3 ^c /1,5 ^d µg/kg	94	5 ^d	1,8 ^c /3,7 ^d
Toltrazuril sulfona	0,5 ^c /0,5 ^d	3 ^c /1,5 ^d µg/kg	92	5 ^d	1,3 ^c /1,9 ^d
Toltrazuril sulfòxid	3 ^c /4 ^d	24 ^c /15 ^d µg/kg	86	14 ^d	1,5 ^c /2,4 ^d
Amprolium	0,2 ^e /0,25 µg/L ^f	0,6 ^e /75 ^f µg/kg	80 ^e /85 ^f	7 ^e /13,1 ^f	12,9 ^e /14,2 ^f
Albendazole	2,5 ^g	0,6 ^g /1 ^h µg/kg	92 ^h	13 ^g /19 ^h	13 ^g /2,5 ^h
Albendazolesulfona	5,0 ^g	0,9 ^g /5 ^h µg/kg	87 ^h	18 ^g /25 ^h	9,9 ^g /8,3 ^h
Albendazolesulfòxid	7,5 ^g	0,9 ^g /1 ^h µg/kg	86 ^h	9 ^g /21 ^h	11 ^g /8,5 ^h
Albendazoleaminosulfona	7,5 ^g	1,5 ^g /5 ^h µg/kg	82 ^h	13 ^g /25 ^h	21 ^g /7,9 ^h
Tiabendazole	5,0 ^g	1,5 ^g /1 ^h µg/kg	95 ^h	13 ^g /17 ^h	16 ^g /5,3 ^h
Hidroxitiabendazole	10 ^g	1,5 ^g /1 ^h µg/kg	89 ^h	9,5 ^g /15 ^h	6 ^g /6,2 ^h
Fenbendazole	1,0 ^g	0,6 ^g /1 ^h µg/kg	82 ^h	16 ^g /13 ^h	16 ^g /5,4 ^h
Fenbendazolesulfona	1,0 ^g	0,6 ^g /5 ^h µg/kg	84 ^h	23 ^g /20 ^h	15 ^g /9,3 ^h
Mebendazole	2,5 ^g	0,6 ^g /1 ^h µg/kg	88 ^h	13 ^g /18 ^h	4,6 ^g /6,2 ^h
Mebendazoleamino	2,5 ^g	1,5 ^g /5 ^h µg/kg	85 ^h	16 ^g /25 ^h	9,1 ^g /9,2 ^h
Hidroximebendazole	2,5 ^g	0,9 ^g /1 ^h µg/kg	84 ^h	18 ^g /22 ^h	6,0 ^g /6,8 ^h
Flubendazole	1,0 ^g	0,6 ^g /1 ^h µg/kg	79 ^h	13 ^g /10 ^h	7,6 ^g /7,4 ^h
Aminoflubendazole	5,0 ^g	0,9 ^g /10 ^h µg/kg	77 ^h	20 ^g /22 ^h	11 ^g /7,7 ^h

Taula 3.4.1. Resum dels paràmetres de qualitat obtinguts per als diferents compostos analitzats i mètodes desenvolupats en la present tesi (Continuació)

Compost	Límit de detecció Instrumental (LOD) (pg injectats)	Límit de quantificació de mètode (MLOQ)	Recuperació (%)	Exactitud (% error relatiu)	Precisió (% RSD)
Oxfendazole	5,0 ^g	0,9 ^g / 5 ^h µg/kg	89 ^h	12 ^g / 23 ^h	12 ^g / 8,1 ^h
Oxibendazole	10 ^g	0,9 ^g / 1 ^h µg/kg	87 ^h	22 ^g / 19 ^h	12 ^g / 6,5 ^h
Cambendazole	1 ^g	1,5 ^g / 1 ^h µg/kg	90 ^h	21 ^g / 12 ^h	17 ^g / 7,9 ^h
triclabendazole	10 ^g	3,0 ^g / 1 ^h µg/kg	76 ^h	16 ^g / 18 ^h	18 ^g / 7,2 ^h
Cetotriclabendazole	5,0 ^g	1,5 ^g / 1 ^h µg/kg	65 ^h	21 ^g / 15 ^h	11 ^g / 8,4 ^h
Febantel	5,0 ^g	1,5 ^g / 1 ^h µg/kg	92 ^h	7 ^g / 14 ^h	5,9 ^g / 6,5 ^h
Levamisole	-	1 ^h µg/kg	94 ^h	19 ^h	8,6 ^h

^aLC-ESI- MS/MS (IT)-aigua de riu; ^bDART-HRMS-pinsos; ^cLC-APCI- MS/MS (QqQ)(SRM)-productes carnis; ^dLC-APCI- MS/MS (QqQ)(H-SRM)-productes carnis;

^eLC-ESI-MS/MS (QqQ)-ous, pinso i carn pollastre; ^fFASI-CZE-UV-ous; ^gLC-APCI-MS/MS(QqQ)-llet; ^hDART-HRMS-llet

D'altra banda, cal indicar que les unitats en què s'expressa el límit de detecció instrumental d'ampròlium per FASI-CZE-UV són de $\mu\text{g/L}$, la concentració de la solució injectada, ja que amb aquesta tècnica no es pot determinar el volum efectiu de mostra injectat atès que en treballar amb injecció electrocinètica tan sols s'introdueixen en el capil·lar els ions presents a la solució. Si bé el límit de detecció instrumental dóna idea de la capacitat de la tècnica i instrumentació utilitzades, el paràmetre que té interès des del punt de vista de l'aplicació d'una determinada metodologia és el límit de quantificació de mètode (MLOQ) que dóna informació sobre el mètode complert, tenint en compte les etapes d'extracció, purificació i la pròpia anàlisi instrumental considerant el possible efecte matriu. Així, malgrat que els LODs obtinguts per als coccidiostats amb el mètode LC-ESI-MS/MS (IT) no són com ja s'ha comentat, gaire bons, els MLOQs obtinguts en l'aplicació d'aquest mètode a mostres d'aigua superficial (riu) es troben en l'interval de 33-213 ng/L (ppt) per als diferents coccidiostats estudiats atès l'efecte de preconcentració de la mostra que és d'un factor aproximat de 210, ja que el mètode parteix de 200 mL de mostra que es concentren fins a un volum final de 950 μL . Aquests MLOQs són del mateix l'ordre que els obtinguts per Iglesias i cols. (2012) en un equip de QqQ per a la monensina, salinomicina i maduramicina però són un ordre de magnitud superiors als trobats per Herrero i cols. (2012) que proporcionen valors de 1,0 ng/L per als polièters ionòfors en mostres d'aigua superficial, encara que aquests últims autors realitzen una major preconcentració de la mostra (1000 mL per a mostres d'aigua superficial portats a un volum final d'1 mL). La resta de mètodes optimitzats en aquesta tesi i basats en espectrometria de masses en tàndem emprant el mode SRM en un triple quadrupol (QqQ) proporcionen valors de MLOQs de l'ordre dels baixos ppb ($\mu\text{g/kg}$) i per tant, adequats per a la determinació dels fàrmacs antiparasitaris en matrius d'aliments per a les què s'ha establert un valor de MRL (10-1.000 $\mu\text{g/kg}$) (veure apartat 1.3.1). Pel que fa referència a la determinació de toltrazuril i els seus metabòlits en productes carnis, les dades recollides a la taula 3.4.1 posen de manifest que la utilització del mode H-SRM té una incidència directa en la millora dels MLOQs que en general baixen a la meitat (de 3 $\mu\text{g/kg}$ en SRM a 1,5 $\mu\text{g/kg}$ en H-SRM per al toltrazuril i la toltrazuril sulfona i de 24 $\mu\text{g/kg}$ a 15 $\mu\text{g/kg}$ per al toltrazuril sulfòxid) mentre que els LODs instrumentals no es veuen pràcticament afectats pel fet de treballar a una resolució superior. Això és degut a que en treballar en H-SRM l'augment de la resolució del primer quadrupol de

m/z 0,7 FWMH a 0,1 FWMH permet una significativa reducció del nombre d'ions de la matriu que entren a la cambra d'ionització millorant de la relació senyal/soroll, com s'ha comentat a l'apartat 3.3. Aquest efecte té incidència principalment en l'anàlisi de mostres, on el soroll acostuma a ser superior respecte a l'observat en els patrons. Pel que fa als mètodes desenvolupats per a la determinació de benzimidazoles en llet mitjançant, DART-HRMS i LC-APCI-MS/MS (QqQ), els nivells de concentració més baixos de calibratge (LCL, *lowest calibration level*) obtinguts en DART (1-10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) emprant mostres blanques de llet adicionades són lleugerament superiors als MLOQs obtinguts amb el mètode LC-APCI-MS/MS (QqQ) (0,6-3 $\mu\text{g}/\text{kg}$), encara que ambdós són molt inferiors als nivells de MRL establerts per a aquests compostos en aquesta matriu (10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Els valors corresponents al mètode DART es donen com LCL (concentració/quantitat mínima d'anàlit a partir de la qual l'instrument és capaç de quantificar mostres de forma precisa) ja que en treballar en HRMS no s'observa soroll i per tant, no es pot avaluar la relació senyal/soroll. S'aplica per tant, un criteri de repetibilitat dels resultats obtinguts i d'exactitud dels mateixos per a establir els denominats LCLs. En l'aplicació desenvolupada per a la determinació de coccidiostats en pinso (indicats amb una b a la taula 3.4.1) i basada en aquesta mateixa tècnica, els LCLs obtinguts varen ser sensiblement superiors, de l'ordre dels mg/kg (ppm) degut als efectes matriu. Tot i així aquests valors encara són inferiors als nivells màxims permesos en pinsos no medicamentosos i deguts a contaminació creuada (0,7-1,25 mg/kg , veure apartat 1.3.2), per tant, el mètode proposat compleix amb els requeriments mínims d'un mètode desenvolupat amb aquesta finalitat. Relativament elevat és també el MLOD obtingut en el mètode FASI-CZE-UV proposat per a la determinació d'ampròlium (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) si es compara amb els resultats obtinguts pel mètode de LC-ESI-MS/MS (QqQ) (0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Aquest resultat està però d'acord amb la menor sensibilitat que sempre s'obté en els mètodes d'electroforesi relacionats especialment amb la menor quantitat de mostra injectada.

Pel que fa referència a les recuperacions dels mètodes de tractament de mostra s'han obtingut valors entre el 72- 94 %. Ara bé, normalment s'han observat efectes matriu raó per la qual la quantificació de les mostres d'aliments s'ha dut a terme emprant el mètode *matrix-matched*. En el cas de la determinació d'ampròlium per LC-MS/MS, s'ha aprofitat

l'efecte matriu com ja s'ha comentat a l'apartat 3.3, per proposar l'addició L-carnitina per millorar la resposta. Tan sols en el mètode de determinació de coccidiostats en aigua de riu es va poder emprar calibratge extern degut a que no es van observar efectes matriu i a que les bones recuperacions obtingudes no van fer necessària l'aplicació cap factor de correcció.

L'exactitud dels mètodes desenvolupats ha estat avaluada mitjançant l'error relatiu comès en la quantificació de mostres dopades a diferents nivells de concentració. La taula 3.4.1 recull els valors d'error relatiu obtinguts per a cada compost i mètode emprat per al nivell de concentració més baix estudiat que en la majoria dels casos correspon al límit de quantificació. Es pot comprovar com en general s'obtenen errors inferiors al 20% tret d'alguna excepció en què aquest valor es veu lleugerament superat, però en línies generals les exactituds dels mètodes desenvolupats es poden considerar satisfactòries. Altrament, la precisió dels mètodes ha estat avaluada mitjançant la desviació estàndard relativa (RSD, %) obtinguda en la determinació per sextuplicat d'una mostra dopada a diversos nivells de concentració. Novament, la taula 3.4.1 recull els valors obtinguts només per al nivell més baix estudiat atesos els diferents nivells de concentració que depenen del mètode i mostres analitzades. Majoritàriament els valors de RSD (%) es troben per sota del 10% per a tots els mètodes desenvolupats independentment de la tècnica emprada, si bé en algun cas poden ser superiors. El disseny de la font d'ionització DART va fer pensar inicialment que la repetibilitat podia ser el punt feble de la tècnica, i aquesta idea semblava confirmar-se en observar els resultats de RSD (%) obtinguts per als coccidiostats ($\approx 20\%$). Tot i així, en validar el mètode de determinació de benzimidazoles en llet, es va comprovar que les precisions obtingudes són similars a les aconseguides amb el mètode de LC-MS/MS. Per aquest motiu la relativament baixa reproduïbilitat obtinguda en la determinació dels coccidiostats no es pot atribuir a la font d'ionització, sinó a les dificultats que aquestes molècules presenten per passar a la fase gas atès el seu elevat pes molecular.

Respecte a l'aplicació dels mètodes desenvolupats a l'anàlisi de mostres de productes comercials destinats al consum humà, s'ha de destacar que en el desenvolupament d'aquesta tesi no s'han detectat fàrmacs antiparasitaris a les mostres analitzades, amb la única excepció del toltrazuril i els seus metabòlits (article II). En l'aplicació del mètode

de LC-APCI-MS/MS a l'anàlisi de productes carnis es va detectar toltrazuril sulfona per sota del MLOQ en 6 d'un total de 17 mostres analitzades i toltrazuril en una mostra. A més, aquests dos compostos van poder ser quantificats a nivells entre 1,9-2,3 µg/kg en dues mostres de salsitxes de frankfurt (veure Taula 4, article II). Aquests resultats posen de manifest que la legislació referent al control de la presència d'aquests compostos en matrius alimentaries es segueix amb rigurositat i per tant el consumidor està protegit davant d'un possible frau d'aquest tipus.

CONCLUSIONS

En aquesta tesi doctoral s'ha desenvolupat metodologia analítica per a la determinació de coccidiostats i benzimidazoles en matrius alimentàries i aigües de riu. La metodologia optimitzada es basa, en general, en la utilització de l'espectrometria de masses tant acoblada a la cromatografia de líquids com a una tècnica d'anàlisi directa com és el DART.

Dels estudis duts a terme en aquesta tesi se'n poden deduir dues conclusions generals:

- ♦ Els mètodes de cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem proposats en aquesta tesi permeten l'anàlisi tan de coccidiostats com de benzimidazoles a nivells inferiors als establerts per la legislació europea vigent en les matrius analitzades (MRLs 10-100 µg/kg).
- ♦ Es demostra que la tècnica d'anàlisi directa DART es pot emprar per al control de la presència de benzimidazoles en llet i coccidiostats en pinsos assolint uns límits de quantificació que permeten complir amb els requeriments de la legislació europea vigent. Tot i així, cal indicar que per tal de realitzar una correcta anàlisi quantitativa és necessari reduir els problemes derivats de la supressió iònica. Per evitar aquest problema es proposa realitzar un tractament previ de l'extracte mitjançant el mètode de QuEChERS.

A continuació s'inclouen les conclusions específiques del treball efectuat agrupades per temàtiques.

En relació a la separació dels anàlits,

- ♦ S'han desenvolupat mètodes de cromatografia ràpids i eficaços mitjançant dues estratègies: (a) la utilització de columnes amb rebliments de diàmetre de partícula sub-2µm que s'han emprat per a la separació dels coccidiostats (químics i polièters ionòfors) separació que s'ha aconseguit en 6 minuts, i (b) la utilització de columnes de tecnologia de partícula de nucli sòlid, que es proposen per a l'anàlisi del toltrazuril i els seus metabòlits i per al de les benzimidazoles. Aquestes columnes de gran eficàcia cromatogràfica han permès obtenir la separació de les 19 benzimidazoles, entre compostos parentals i metabòlits, en menys de 7 minuts i proposar per primera vegada un mètode per a la separació conjunta del tottrazuril i els seus metabòlits que tan sols requereix dos minuts.

- ◆ S'ha posat de manifest que les fases estacionàries de C18 són adequades per a la retenció i separació de la majoria dels coccidiostats i benzimidazoles. Per a la separació de les dues famílies de compostos es proposa emprar acetonitril-aigua com a fase mòbil i treballar en gradient. Es recomana l'addició d'àcid fòrmic fins a una concentració del 0,1% per tal assolir un pH de 2,65 imprescindible per aconseguir una adequada separació de la família de les benzimidazoles amb un important interval de valors de pKa. Per millorar la resolució entre el totrazuril i els seus metabòlits, totrazuril sulfona i totrazuril sulfòxid, es proposa emprar metanol/aigua (60/40 v:v) com a fase mòbil.
- ◆ La utilització de cromatografia d'interacció hidrofílica (HILIC) emprant un rebliment de sílice pura ha permès desenvolupar un mètode per a l'anàlisi per cromatografia de líquids de l'ampròlium, compost que no es pot analitzar amb la resta de fàrmacs veterinaris atesa la seva naturalesa catiònica. Es proposa treballar amb una fase mòbil acetonitril/àcid fòrmic/formiat d'amoni (50 mM pH 4,0). L'estudi dels efectes de la força iònica i el pH de la fase mòbil ha posat de manifest que el mecanisme de separació en la columna HILIC és de bescanvi iònic.
- ◆ Per primer cop s'ha desenvolupat un mètode basat en l'electroforesi capil·lar de zona amb preconcentració on-line (FASI) consistent en una etapa d'introducció hidrodinàmica d'aigua desmineralitzada (40 s) seguida de la introducció electrocinètica de la mostra (50 s) i emprant un tampó de separació electroforètica format per àcid acètic/acetat d'amoni 150 mM pH 4,5:MeOH (60:40). En aquestes condicions, s'ha demostrat que aquesta és una tècnica adient per a la determinació d'ampròlium en mostres d'ou.

En relació a l'aplicació de l'espectrometria de masses,

- ♦ Majoritàriament els coccidiostats químics i les benzimidazoles mostren com a pics base als seus corresponents espectres de masses els ions protonats/desprotonats independentment de la font d'ionització utilitzada (ESI o APCI). En canvi els polièters ionòfors presenten una clara tendència a formar adductes amb sodi i altres cations alcalins enlloc de les molècules protonades. Excepcionalment, el toltrazuril i els seus metabòlits en ésser ionitzats en una font d'APCI en mode negatiu han mostrat un comportament diferenciat, mostrant com a pic base de l'espectre un ió corresponent a una fragmentació a la font que comporta la pèrdua del grup trifluorometil.
- ♦ Els estudis del comportament dels fàrmacs veterinaris en diferents fonts d'ionització han permès proposar la utilització de l'ESI per a la ionització dels polièters ionòfors, ampròlium i la major part dels coccidiostats químics, essent l'APCI la tècnica a escollir per a l'anàlisi de tottrazuril i els seus metabòlits i les benzimidazoles. La baixa resposta obtinguda amb la font d'ionització d'APPI per a l'anàlisi de benzimidazoles indica que no és una font d'ionització recomanable per a l'anàlisi d'aquests compostos.
- ♦ L'estudi del comportament dels fàrmacs antiparasitaris emprant tècniques *ambient* en concret el DART ha posat de manifest en primer lloc la importància de la temperatura en aquesta font d'ionització atès que es necessiten temperatures superiors als 400°C per tal d'aconseguir una ionització eficient. Els resultats obtinguts són satisfactoris especialment per a les benzimidazoles. Els coccidiostats han presentat més dificultats obtenint-se eficiències d'ionització més baixes la qual cosa es deu a la naturalesa dels anàlits, elevat pes molecular (maduramicina) o naturalesa iònica (ampròlium) que dificulten la desorció tèrmica dels anàlits i el conseqüent pas a la fase gas on té lloc la ionització.
- ♦ La interpretació de la informació obtinguda en espectrometria de masses en tàndem en el temps amb un analitzador de trampa de ions ha possibilitat l'establiment de patrons de fragmentació per als diferents compostos estudiats i l'ordre genealògic dels diferents fragments observats. En aquest context les mesures de massa exacta obtingudes en un Orbitrap amb una resolució de

60.000 FWHM han estat decisives per a la correcta assignació de l'ió producte majoritari de la maduramicina en l'etapa de MS² i d'un dels ions producte minoritaris en l'etapa d'MS³ de la monensina, els quals corresponen a una pèrdua simultània de CO₂ i H₂O només possibilitada per la conformació pseudomacroscíclica d'aquestes molècules.

- ◆ Les fragmentacions observades majoritàriament per als polièters ionòfors corresponen a les pèrdues de molècules d'aigua a causa de l'elevat nombre de grups hidroxil presents en aquestes estructures moleculars. Aquestes no poden ser considerades fragmentacions específiques, però sí que acostumen a ésser les més abundants. Altres fragmentacions més característiques observades per a aquests compostos responen a trencaments en els enllaços amb heteroàtoms ja sigui dels èters cíclics o en les posicions en β respecte a un grup carbonil. Els ions corresponents a aquests trencaments són identificats en les diferents etapes de MS² i MS³ contribuint a la identificació dels compostos d'estudi. En la fragmentació del toltrazuril i els seus metabòlits tan sols la selecció com a ió precursor de l'ió corresponent a la pèrdua del grup trifluorometil ha possibilitat l'obtenció d'ions producte ja que els ions corresponents al [M-H]⁻ no donen lloc a ions producte estables. Paral·lelament les benzimidazoles generen com a ions producte els provinents de la pèrdua d'una molècula de metanol o bé els originats per les pèrdues dels grups funcionals diferencials, transicions que poden ser utilitzades per a la identificació d'aquesta família de compostos.
- ◆ Les transicions més abundants i selectives observades han estat emprades per a la posterior anàlisi quantitativa d'aquests compostos i la seva correcta identificació ja sigui en modes de ions producte en treballar amb analitzador de trampa de ions, obtenint tot l'espectre en el rang de treball especificat, o en mode SRM treballant amb equips de QqQ.
- ◆ Els modes de treball en *enhanced mass resolution*, possibles en el triple quadrupol emprat en aquesta tesi, H-SIM i H-SRM (Q3 a $\Delta m/z$ 0.04 FWHM i ± 5 mDa d'exactitud en la massa) han estat utilitzats per identificar un compost interferent (la L-carnitina) que ha produït un important augment de la senyal en analitzar ampròlium en mostres d'aliments. L'augment de resolució en

espectrometria de masses que s'aconsegueix treballant en el mode H-SRM (Q1) ($\Delta m/z$ 0,1 FWHM), ha permès millorar la sensibilitat dels mètodes desenvolupats gràcies a una disminució del soroll de fons produït per la matriu de les mostres.

- ◆ L'espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) ha possibilitat la determinació dels fàrmacs antiparasitaris fent ús de la font d'ionització "ambient" DART sense emprar una separació cromatogràfica prèvia dels analits. Per a aquesta finalitat, es requereix una resolució mínima de 25.000 FWHM. Ara bé, per tal d'assegurar la separació de compostos isobàrics es proposa treballar a una resolució de 50.000 FWHM.

En relació al mètode d'anàlisi de mostres d'aliments i aigües de riu i als paràmetres de qualitat obtinguts,

- ◆ S'han desenvolupat mètodes de tractament de mostra ràpids i senzills basats en l'SPE, QuEChERS i l'estratègia d'*extract-and-shoot* la qual cosa ha permès reduir notablement els temps d'anàlisi així com el volum de dissolvents i reactius respecte d'altres mètodes disponibles a la literatura. Tots els mètodes desenvolupats permeten una adequada recuperació dels compostos (65 % - 95 %) si bé l'estratègia d'*extract-and-shoot* en no implicar cap etapa d'eliminació de la matriu pot comportar, tal com s'ha pogut comprovar, la coextracció de substàncies interferents en l'anàlisi dels compostos d'interès. En relació als mètodes de *clean-up* proposats, els resultats obtinguts en l'anàlisi de coccidiostats posen de manifest que els basats en l'estratègia QuEChERS, més senzills i ràpids que els d'extracció en fase sòlida, són sensiblement menys efectius pel que fa a l'eliminació d'interferències de la matriu.
- ◆ El mètode proposat per a la determinació d'ampròlium mitjançant LC-MS/MS que utilitza una extracció amb acetonitril (mostres d'ous i carn de pollastre) i posterior dilució, es proposa addicionar L-carnitina a l'extracte final a fi i efecte d'aprofitar l'efecte d'augment de la senyal (*enhancement*) causat per la presència d'aquest compost a la matriu de les mostres i la seva coelució amb l'anàlit. Es proposa afegir L-carnitina a patrons i mostres fins a una concentració

que permeti homogeneïtzar l'efecte observat en totes les solucions analitzades (1 µg/mL).

- ◆ En l'anàlisi d'ampròlium en mostres d'ou mitjançant FASI-CZE-UV s'ha detectat una interferència en el temps de migració de l'ampròlium que compromet l'aplicabilitat del mètode a mostres reals. Aquesta interferència ha estat identificada, mitjançant l'espectrometria de masses en tàndem, com la tiamina. Les condicions finals del mètode han estat optimitzades per aconseguir la separació dels dos compostos, l'ampròlium i la tiamina.
- ◆ Els paràmetres de qualitat obtinguts per a tots els mètodes d'anàlisi desenvolupats en el transcurs d'aquesta tesi demostren que aquests mètodes són: (a) sensibles, atesos els baixos nivells de quantificació obtinguts en cada cas (MLOQ per a coccidiostats i benzimidazoles en aliments 0,6-75 µg/kg, coccidiostats en aigua de riu 33-213 ng/L i coccidiostats en pinsos 0,25-0,5 mg/kg), els quals es troben a nivells inferiors als límits establerts per la legislació europea (benzimidazoles en llet MRLs 10-100 µg/kg, coccidiostats en pinsos 0,7-1,25 mg/kg), (b) selectius, ja que generalment es compleix amb la legislació europea 657/2002/EC que exigeix 3 punts d'identificació per a cada compost analitzat i (c) precisos, atesa la reproductibilitat obtinguda per als mètodes establerts (RSDs 1,3-18 %). Per tant, els mètodes desenvolupats poden ser proposats per al control de la presència d'aquests compostos en les matrius estudiades en cada cas.
- ◆ Per a la quantificació dels anàlisis estudiats en les mostres de productes alimentaris es proposa emprar de manera general el mètode de quantificació de *matrix-matched* atesa la capacitat d'aquest mètode de considerar els efectes matriu en la quantificació. Nogensmenys, es pot utilitzar calibratge extern en la quantificació de coccidiostats en matrius senzilles com per exemple l'aigua de riu en la qual l'efecte matriu és molt menor. Aquest mètode de calibratge afegint L-carnitina als patrons es proposa per eliminar l'efecte d'aquesta interferència en la quantificació d'ampròlium per LC-MS/MS. Els errors relatius obtinguts en la quantificació de mostres fortificades han estat d'entre el 3 i el 25%).

- ◆ Les anàlisis de mostres de productes comercials destinats al consum humà dutes a terme han posat de manifest l'absència dels fàrmacs antiparasitaris estudiats en les mostres analitzades a un nivells de concentració superiors als límits de detecció establerts (força inferiors als MRL legiscats). Tan sols s'ha detectat la presència de toltrazuril en una mostra de productes carnis i toltrazuril sulfona (< 1,5 µg/kg) en algunes de les mostres analitzades. Aquests resultats posen de manifest que la legislació establerta i les mesures preses permeten garantir la seguretat dels productes consumits.

BIBLIOGRAFIA

Ai L, Sun H, Wang F, Chen R, Guo C. Determination of diclazuril, toltrazuril and its two metabolites in poultry tissues and eggs by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 879 (2011) 1757-1763

Alpert A J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 499 (1990) 177-196

Balitz G. Determination of benzimidazole residues using liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 727 (1999) 167

Blazsek M, Kubis M. HPLC determination of salinomycin and related compounds in fermentation media of *Streptomyces albus* and premixes. *J Pharm Biomed Anal* 39 (2005) 564-571

Blazsek M, Surovcová A. LC determination of salinomycin in fermentation broths and premixes. *J Pharm Biomed Anal* 31 (2003) 291-298

Boontongto T, Santaladchaiyakit Y, Burakham R. Alternative Green Preconcentration Approach Based on Ultrasound-Assisted Surfactant-Enhanced Emulsification Microextraction and HPLC for Determination of benzimidazole anthelmintics in milk formulae. *Chromatographia* 77 (2014) 1557–1562

Botitsi H, Economou A, Tsipi D. Development and validation of a multi-residue method for the determination of pesticides in processed fruits and vegetables using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 389 (2007) 1685–1695

Boxall AB, Fogg LA, Kay P, Blackwel PA, Pemberton EJ, Croxford A. Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicol Lett.* 142 (3) (2003) 207-218.

Boxall AB, Kolpin DW, Halling-Sørensen B, Tolls J. Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ Sci Technol* 37 (15) (2003) 286A-294A.

Broekaert N, Van Peteghem C, Daeseleire E, Sticker D, Van Poucke C. Development and validation of an UPLC-MS/MS method for the determination of ionophoric and synthetic coccidiostats in vegetables. *Anal Bioanal Chem* 401 (2011) 3335-3344

Cabello FC. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environ microbiol* 8 (7) (2006) 1137–1144

Cacho C, Schweitz L, Turiel E, Pérez-Conde C. Molecularly imprinted capillary electrochromatography for selective determination of thiabendazole in citrus samples. *J Chromatogr A* 1179 (2008) 216–223

Cannavan A, Hagan S A, Kennedy D G. Simultaneous determination of thiabendazole and its major metabolite, 5-hydroxythiabendazole, in bovine tissues using gradient liquid chromatography with thermospray and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *J Chromatog. B* 718 (1998) 103.

Capleton AC, Courage C, Rumsby P, Holmes P, Stutt E, Boxall AB, Levy LS. Prioritising veterinary medicines according to their potential indirect human exposure and toxicity profile. *Toxicol Lett* 163(3) (2006) 213-223

Caprioli G, Cristalli G, Galarini R, Giacobbea D, Ricciutelli M, Vittori S, Zuoa Y, Sagratina Comparison of two different isolation methods of benzimidazoles and their metabolites in the bovine liver by solid-phase extraction and liquid chromatography–diode array detection. *J Chromatogr A* 1217 (2010) 1779–1785

Capurro E, Danaher M, Anastasio A, Cortesi M L, O’Keeffe M. Efficient HPLC method for the determination of nicarbazin, as dinitrocarbanilide in broiler liver. *J Chromatogr B* 822 (2005) 154-159

Casetta B, Cozzani R, Cinquina A L, Marzio S. Sulfamethazine, sulfothiazole and albendazole residue dosage in food products determined by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 10 (1996) 1497-1503

Castanon J I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult Sci* 86(11) (2007) 2466-2471

Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E. Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environ Sci Technol* 40 (1) (2006) 357-363

Cha J M, Yang S, Carlson K H. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1065 (2005) 187–198

Cha J M, Yang S, Carlson K H. Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1065 (2005) 187-198

Chen D, Tao Y, Liu Z, Liu Z, Huang L, Wang Y, Pan Y, Peng D, Dai M, Yuan Z. Development of a high-performance liquid chromatography method to monitor the residues of benzimidazoles in bovine milk. *J Chromatogr B* 878 (2010) 2928–2932

Chico J, Rúbies A, Centrich F, Companyó R, Prat M D, Granados M. Use of gel permeation chromatography for clean-up in the analysis of coccidiostats in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405 (2013) 4777–4786

Clarke L, Moloney M, O'Mahony J, O'Kennedy R, Danaher M. Determination of 20 coccidiostats in milk, duck muscle and non-avian muscle tissue using UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam* 30(6) (2013) 958-969

Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and interpretation of results. *Off J Eur Commun* L221, 8-36

COMMISSION DIRECTIVE 2009/8/EC of 10 February 2009 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels of unavoidable carry-over of coccidiostats or histomonostats in nontarget feed. *Off J Eur Commun* L40, 19-25

COMMISSION REGULATION (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Off J Eur Commun* L40, 7-11

Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Commun* L15, 1-72

COMMISSION REGULATION (EU) No 610/2012 of 9 July 2012 amending Regulation (EC) No 124/2009 of 10 February 2009 setting maximum levels for the presence of coccidiostats or histomonostats in food resulting from the unavoidable carry-over of these substances in non-target feed. *Off J Eur Commun* L178, 1-3

COUNCIL DIRECTIVE 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off J Eur Commun* L125, 10-32

COUNCIL DIRECTIVE of 23 November 1970 concerning additives in feeding-stuffs (70/524/EEC) *Off J Eur Commun* L270, 840-856

COUNCIL REGULATION (EEC) No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Commun* L224, 1-8

Danaher M, O'Keeffe M, Glennon J D. Development and optimisation of a method for the extraction of benzimidazoles from animal liver using supercritical carbon dioxide. *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 313.

De Ruyck H, Daeseleire E, De Ridder H, Van Renterghem R. Development and validation of a liquid chromatographic–electrospray tandem mass spectrometric multiresidue method for anthelmintics in milk. *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 181.

De Ruyck H, Daeseleire E, Ridder H. Development and validation of a liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method for mebendazole and its metabolites hydroxymebendazole and aminomebendazole in sheep liver. *Analyst* 126 (2001) 2144-2148

De Ruyck H, Van Renterghem R, De Ridder H, De Brabander D. Determination of anthelmintic residues in milk by high performance liquid chromatography. *Food Control* 11 (2000) 165.

Dominguez-Alvarez J, Mateos-Vivas M, Garcia-Gomez D, Rodriguez-Gonzalo E, Carabias-Martinez R. Capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry for the determination of anthelmintic benzimidazoles in eggs using a QuEChERS with preconcentration as sample treatment. *J Chromatogr A* 1278 (2013) 166– 174

Dorne J L C M, Fernández-Cruz M L, Bertelsen U, Renshaw D W, Peltonen K , Anadon A, Feil A, Sanders P, Wester P, Fink-Gremmels J. Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: Animal and human health aspects. *Toxicol Applied Pharmacol* 270 (2013) 196–208

Dowling G, Cantwell H, O’Keeffe M, Smyth M R. Multi-residue method for the determination of benzimidazoles in bovine liver. *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 285.

Dowling G, O’Keeffe M, Smyth M R. Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. *Anal Chim Acta* 539 (2005) 31–34

Dubois M, Pierret G, Delahaut P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 813 (1-2) (2004) 181-189

Dubreil-Chéneau E, Bessiral M, Roudaut B, Verdon E, Sanders P. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. *J Chromatogr A*. 1216(46) (2009) 8149-8157

Dusi G, Gamba V, Faggionato E. Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection. *J Pharm Biomed Anal* 38 (2005) 375–379

Ferraz Spisso B, Gomes Ferreira R, Ulberg Pereira M, Alves Monteiro M, Avila Cruz T, Pinto da Costa R, Belem Lima A M, Wanderley da Nobrega A. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. *Anal Chim Acta* 682 (2010) 82-92

Furusawa N. Simplified high-performance liquid chromatographic determination of residual amprolium in edible chicken tissues. *J Chromatogr Sci* 40(6) (2002) 355-358

Galarini R, Fioroni L, Moretti S, Pettinacci L, Dusi G. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. *Anal Chim Acta* 700 (2011) 167-176

García-Gómez D, García-Hernández M, Rodríguez-Gonzalo E, Carabias-Martínez R. A fast and reliable method for the quantitative determination of benzimidazoles and metabolites in milk by LC-MS/MS with on-line sample treatment. *Anal Bioanal Chem* 404 (2012) 2909–2914

Gilbert-López B, García-Reyes J F, Ortega-Barrales P, Molina-Díaz A, Fernández-Alba A R. Analyses of pesticide residues in fruit-based baby food by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21 (2007) 2059–2071

Girardi C, Odore R. Pharmacological treatments and risks for the food chain. *Vet Res Commun* 32 (2008) 11-18

Gottschall DW, Theodorides VJ, Wang R. The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitol Today* 6(4) (1990) 115-124

Heller D N, Nochetto C B. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: Silica SPE cleanup and LC-MS/MS analysis of ionophore and macrolide residues. *J Agr Food Chem* 52 (12) (2004) 6848-6856

Herrero P, Borrull F, Marcé R M, Pocurull E. Determination of polyether ionophores in urban sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Study of different clean-up strategies. *J Chromatogr A* 1285 (2013) 31-39

Herrero P, Borrull F, Pocurull E, Marcé R M. Novel amide polar-embedded reversed-phase column for the fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method to determine polyether ionophores in environmental waters. *J Chromatogr A* 1263 (2012) 7-13

Hormazábal V, Østensvik Ø, Kaldhusdal M. An improved LC-MS method for the determination of lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 28(17) (2005) 2769–2776

Hormazábal V, Yndestad M, Ostensvik O. Determination of flunixin and tiamulin hydrogen fumarate in meat and toltrazuril and the metabolite toltrazurilsulfon in meat and eggs using LC/MS. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 26 (5) (2003) 791-801

Hormazábal V, Yndestad M. Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin and salinomycin in chicken tissues, plasma and egg using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Liq Chromatogr Rel Tech* 23(10) (2000) 1585-1598

Hou X L, Chen G, Zhu L, Yang T, Zhao J, Wang L, Wu Y L. Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of sulfonamides, quinolones and benzimidazoles in bovine milk. *J Chromatogr B*, 962 (2014) 20–29

Iglesias A, Nebot C, Miranda J M, Vázquez B I, Cepeda A. Detection and quantitative analysis of 21 veterinary drugs in river water using high-pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Environ Sci Pollut Res* 19 (2012) 3235-3249

Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T, Olejnik M. Determination of benzimidazoles and levamisole residues in milk by liquid chromatography–mass spectrometry: Screening method development and validation. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 8165–8172

Jestoi M, Rokka M, Peltonen K. An integrated sample preparation to determine coccidiostats and emerging Fusarium-mycotoxins in various poultry tissues with LC-MS/MS. *Mo. Nut. Food Res* 51 (2007) 625 – 637

Jones F T, Ricke S C. Observations on the history of the development of antimicrobials and their use in poultry feeds. *Poult Sci.* 82(4) (2003) 613-617

Kaltsonoudis C K, Lamari F N, Prousalis K P, Karamanos N K, Tsegenidis T. Analysis of Carbendazim and Thiabendazole in Lemons by CE-DAD. *Chromatographia* 57(2003) 181-184

Kanda M, Ushiyama K, Igusa K, Murayama M, Horie M, Hirokado M, Miyazaki T. Simple determination of residual anticoccidial drugs (diclazuril and nicarbazin) in chicken tissues by HPLC. *J Food Hyg Soc Jpn* 44 (22) (2003) 110-113

Keegan J, Whelan M, Danaher M, Crooks S, Sayers R, Anastasio A, Elliott C, Brandon D, Furey A, O’Kennedy R. Benzimidazole carbamate residues in milk: Detection by Surface Plasmon Resonance-biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction. *Anal Chim Acta* 654 (2009) 111–119

Kim S C, Carlson K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. *Water Res* 40 (2006) 2549-2560

Kim Y, Jung J, Kim M, Park J, Boxall AB, Choi K. Prioritizing veterinary pharmaceuticals for aquatic environment in Korea. *Environ Toxicol Pharmacol* 26(2) (2008) 167-176

Kinsella B, Lehotay S J, Mastovska K, Lightfield A R, Furey A, Danaher M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 637 (2009) 196-207

Kools S A E, Moltmann J F, Knacker T. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regul Toxicol Pharmacol* 50 (2008) 59–65

- Lacey E, Gill JH. Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Trop.* 56(2-3) (1994) 245-62
- Lacey E. Mode of action of benzimidazoles. *Parasitol Today.* 6(4) (1990) 112-115
- Li C, Wu Y L, Yang T, Zhang Y. Rapid simultaneous determination of eight benzimidazoles in animal feed by LC–MS–MS. *Chromatographia* 73 (2011) 59–65
- Li H, Kijak P J, Turnipseed S B, Cui W. Analysis of veterinary drug residues in shrimp: A multi-class method by liquid chromatography–quadrupole ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B* 836 (2006) 22–38
- Liu Y, Wu Y, Jiang Y. Determination of robenidine residue in chicken tissues and eggs by high performance liquid chromatography. *Se Pu* 28(2010) 905–907.
- Lopes N P, Gates P J, Wilkins J P G, Staunton J. Fragmentation studies on lasalocid acid by accurate mass electrospray mass spectrometry. *Analyst* 127 (2002) 1224-1227
- López Monzón A, Vega Moreno D, Torres Padrón M E, Sosa Ferrera Z, Santana Rodríguez J J. Solid-phase microextraction of benzimidazole fungicides in environmental liquid samples and HPLC–fluorescence determination. *Anal Bioanal Chem* 387 (2007) 1957–1963
- M Rokka, Peltonen K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: Validation of an LC-MS/MS method. *Food Additives and Contaminants* 23 (5) (2006) 470-478
- Marshall B M, Levy S B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health *Clinical Microbiology Reviews* 24 (2011) 718–733
- Matabudu D K, Conway B, Lumley I, Sumar S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC–MS–MS *Food Chem* 75 (3) (2001) 267-394
- Matabudul D K, Lumley I D, Points J S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst.* 127(6) (2002) 760-768
- Matabudul D K, Lumley I D, Points J S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomyi and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analyst* 127(6) (2002) 760-768
- McKellar QA, Jackson F. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends Parasitol* 20(10) (2004) 456-461

Mortier L, Daeseleire E, Delahaut P. Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 483 (2003) 27-37

Mortier L, Daeseleire E, Van Peteghem C. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin, lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 533-539

Mulder P P J, Balzer-Rutgers P, te Brinke E M, Bolck Y J C, Berendsen B J A, Gerçek H, Schat B, van Rhijn J A. Deposition and depletion of the coccidiostats toltrazuril and halofuginone in eggs. *Anal Chim Acta* 529 (2005) 331-337

Nász S, Debreczeni L, Rikker T, Eke Z. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. *Food Chem* 133 (2012) 536-543

Nebot C, Iglesias A, Regal P, Miranda J M, Fente C, Cepeda A. A sensitive and validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of seven coccidiostats in bovine whole milk. *Food Control* 27 (2012) 29-36

Olejniak M, Szprengier-Juszkiewicz T, Jedziniak P. Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 8141-8148

Phillips I, Casewell M, Cox T, Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrobial Chemotherapy* 53 (2004), 28-52

Pietruk K, Olejniak M, Jedziniak P, Szprengier-Juszkiewicz T. Determination of fifteen coccidiostats in feed at carry-over levels using liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 112 (2015) 50-59

Prousalis K P, Polygenis D A, Syrokou A, Lamari F N, Tsegenidis T. Determination of carbendazim, thiabendazole, and o-phenylphenol residues in lemons by HPLC following sample clean-up by ion-pairing. *Anal Bioanal Chem* 379 (2004) 458–463

Qi K Z, Shi Z H, Peng K S, Tu J, Zhu L Q, Chen D D. Simultaneous determination of residues of diclazuril and toltrazuril in chicken tissues by matrix solid phase dispersion-high performance liquid chromatography/ultraviolet detection. *Chinese J Anal Chem* 35(11) (2007) 1601-1606

Ra Y K, Li C, Jiang H Y, Zhang S X, Zhao S J, Li X W, Shen J Z. Immunoaffinity Chromatography Clean-Up and LC for Analysis of Salinomycin and Narasin in Chicken Muscle. *Chromatographia* 68 (2008) 701-706

Real Decreto 109/1995, de 27 de enero, sobre medicamentos veterinarios. Publicado en BOE núm. 53 de 03 de Marzo de 1995

REGLAMENTO (CE) No 470/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 6 de mayo de 2009 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) *Off J Eur Commun L152*, 11-22

REGULATION (EC) No 183/2005 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 12 January 2005 laying down requirements for feed hygiene. *Off J Eur Commun L35/22*

REGULATION (EC) No 1831/2003 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Off J Eur Commun L268*, 29-43

Reig M, Toldrá F. Veterinary drug residues in meat: Concerns and rapid methods for detection. *Meat Science* 78(1-2) (2008) 60-67

Robert C, Gillard N, Brasseur P Y, Ralet N, Dubois M, Delahaut P. Rapid multiresidue and multi-class screening for antibiotics and benzimidazoles in feed by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Food Control* 50 (2015) 509-515

Rodríguez R, Boyer I, Font G, Picó Y. Capillary zone electrophoresis for the determination of thiabendazole, prochloraz and procymidone in grapes. *Analyst* 126 (2001) 2134–2138

Rose M D. A method for the separation of residues of nine compounds in cattle liver related to treatment with oxfendazole. *Analyst* 124 (1999) 1023.

Sarmah AK, Meyer MT, Boxall AB. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*. 65 (5) (2006) 725-759

Shao B, Wu X, Zhang J, Duan H, Chu X, Wu Y. Development of a Rapid LC–MS–MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken. *Chromatographia* 69 (2009) 1083-1088

Song W, Huang M, Rumbelha W, Li H. Determination of amprolium, carbadox, monensin, and tylosin in surface water by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 21(2007) 1944–1950

Squadrone S, Mauro C, Ferro G L, Amato G, Abete M C. Determination of amprolium in feed by a liquid chromatography–mass spectrometry method. *J Pharm Biomed Anal* 48 (2008) 1457–1461

Stamatakis M, Sargedi C, Stefanaki Ch, Safioleas C, Matthaopoulou I, Safioleas M. Anthelmintic treatment: an adjuvant therapeutic strategy against *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Int* 58(2) (2009) 115-120

Sun P, Barmaz D, Cabrera M L, Pavlostathis S G, Huang C H. Detection and quantification of ionophore antibiotics in runoff, soil and poultry litter. *J Chromatogr A* 1312 (2013) 10-17

Tarbin J A, Rawlings E, Tyler D, Sharman M. Improved clean-up for the determination of lasalocid in “difficult” food matrices. *Food Addit Contam* 19(1) (2002) 28-32

Teruel M, Catalano R, Salomón L (2009b). Efecto de albendazol sulfóxido sobre el desarrollo preimplantacional de embriones de ratón. Primer Encuentro Internacional Virtual de Educación e Investigación en Ciencias Morfológicas. Libro de Resúmenes. Investigación Sesión 3. ISBN: 978-987-25642-0-9, <http://www.primerencuentrovirtual.fcm.unc.edu.ar>

Teruel M, Felipe A, Solana H, Sallovitz J, Lanusse C. Placental and fetal toxicity of albendazole sulphoxide. *Vet Hum Toxicol* 45(3) (2003) 131-136

Thompson T S, Noot D K, Kendall J D. Determination of ionophores in raw bovine milk using LC-MS/MS: Application to residue surveillance. *Food Chem* 127 (2011) 321-326

Ulberg Pereira M, Ferraz Spisso B, Couto Jacob S, Alves Monteiro M, Gomes Ferreira R, de Souza Carlos B, Wanderley da Nóbrega A. Validation of a liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometric method to determine six polyether ionophores in raw, UHT, pasteurized and powdered milk. *Food Chem* 196 (2016) 130-137

Visek W J. The Mode of Growth Promotion by Antibiotics. *J Animal Science* 46(5) (1978) 1447-1469

Volmer D A, Lock C M. Electrospray ionization and collision-induced dissociation of antibiotic polyether ionophores. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 12 (1998) 157-164

Wang Y, Li X, Zhang Z, Ding S, Jiang H, Li J, Shen J, Xia X. Simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles, and chloramphenicol components in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem* 192 (2016) 280-287

Xia X, Dong Y, Luo P, Wang X, Li X, Ding S, Shen J. Determination of benzimidazole residues in bovine milk by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 878 (2010) 3174–3180

Xia X, Wang Y, Wang X, Li Y, Zhong F, Li X, Huang Y, Ding S, Shen J. Validation of a method for simultaneous determination of nitroimidazoles, benzimidazoles and chloramphenicols in swine tissues by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1292 (2013) 96– 103

Zhang Y, Huang X, Yuan D. Determination of benzimidazole anthelmintics in milk and honey by monolithic fiber-based solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography–diode array detection. *Anal Bioanal Chem* 407 (2015) 557–567

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AAFCO	<i>Association of American Feed Control Officials</i>
ABZ	Albendazole
ABZ-NH ₂ -SO ₂	Albendazole aminosulfona
ABZ-SO	Albendazole sufòxid
ABZ-SO ₂	Albendazole sulfona
ACN	Acetonitril
ADS	Síllice alquil diol
AEMPS	Agencia española del medicamento y productos sanitarios
AMP	Ampròlium
APCI	Ionització química a pressió atmosférica
API	Ionització a pressió atmosférica
APPI	Fotoionització a pressió atmosférica
ASMS	<i>American Society of Mass Spectrometry</i>
BHT	Butil hidroxitoluè
CAM	Cambendazole
CC α	Límit de decisió
CC β	Capacitat de detecció
CE	Electroforesis capil·lar
CEC	Electrocromatografia capil·lar
CLAZ	Clazuril
CLO	Clopidol
CQ-d ₄	Clormequat deuterat
CZE	Electroforesis capil·lar de zona
DAD	Detector de xarxa de diodes
DART	<i>Direct analysis in real time</i>
DCM	Diclormetà
DEC	Decoquinat
DESI	Ionització per desorció per electrospai
DIC	Diclazuril
DMF	Dimetilformamida
DNC	4,4'-Dinitrocarbanilida
dSPE	Extracció en fase sòlida dispersiva

EDTA	EtileIndiamintetraacètic
EFSA	<i>European food safety agency</i>
EMA	<i>European medicines agency</i>
ESI	Electrosprai
EtAc	Acetat d'etil
ETH	Etopabate
EtOH	Etanol
FASI	<i>Field amplified simple injection</i>
FEB	Febantel
FEN-SO ₂	Fenbendazole sulfona
FLD	Detector de fluorescència
FLU	Flubendazole
FLU-NH ₂	Aminoflufendazole
FWHM	<i>Full width half maximum</i>
GPC	Cromatografia de permeació en gel
HAc	Àcid acètic
HCD	<i>higher-energy collision dissociation</i>
HFG	Halofuginona
HFor	Àcid fòrmic
HILIC	Cromatografia d'interacció hidrofílica
HLB	Balanç hidrofílic-lipofílic
HPLC	Cromatografia de líquids d'alta eficàcia
HRMS	Espectrometria de masses d'alta resolució
H-SIM	<i>Highly selective selected ion monitoring</i>
H-SRM	<i>Highly selective selected reaction monitoring</i>
IT	Trampa d'ions
K-TCB	Cetotriclabendazole
LC	Cromatografia de líquids
LCL	<i>Lowest calibration level</i>
LEV	Levamisole
LLP	Partició líquid-líquid
LOD	Límit de detecció

LOQ	Límit de quantificació
LSE	Extracció líquid-sòlid
MAD	Maduramicina
MCX	Mode mixt fase invertida-bescanvi catiònic
MEB	Mebendazole
MEB-NH ₂	Mebendazole amino
MEB-OH	Hidroximebendazole
MeOH	Metanol
MIP	Polímer d'empremta molecular
MLOQ	Límit de quantificació de mètode
MON	Monensina
MRL	Límit màxim de residu
MRM	<i>Multiple reaction monitoring</i>
MS	Espectrometria de masses
MS/MS	Espectrometria de masses en tàndem
MS ⁿ	Fragmentació en etapes successives
MSPD	<i>Matrix solid phase dispersion</i>
NAR	Narasina
NH ₄ Ac	Acetat d'amoni
NIC	Nicarbazina
NIG	Nigericina
OXF	Oxfendazole
OXI	Oxibendazole
PLE	Extracció amb líquids pressuritzats
PSA	Amina primària-secundària
Q	Quadrupol
QqQ	Triple quadrupol
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
RNZ	Ronidazole
ROB	Robenidina
RSD	Desviació estàndard relativa
SAL	Salinomicina

SCX	Bescanvi catiònic fort
SEM	Semduramicina
SIM	<i>Selected ion monitoring</i>
SPE	Extracció en fase sòlida
SPME	Microextracció en fase sòlida
SPR	Ressonància de plasmons en superfície
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
TBZ	Tiabendazole
TBZ-OH	Hidroxitiabendazole
TCB	Triclabendazole
TEA	Trietilamina
TFA	Àcid trifluoroacètic
THF	Tetrahidrofurà
TOF	Temps de vol
TOL	Toltrazuril
TOLSO	Toltrazuril sulfòxid
TOLSO ₂	Toltrazuril sulfona
UASEME	Ultrasound-assisted surfactant enhanced emulsification microextraction
UE	Unió Europea
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography (Waters trademark)</i>
UHPLC	Cromatografia de líquids d'ultra-alta eficàcia
UV	Ultravioleta visible

2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

