



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

L'espectrometria de masses en l'anàlisi de drogues veterinàries

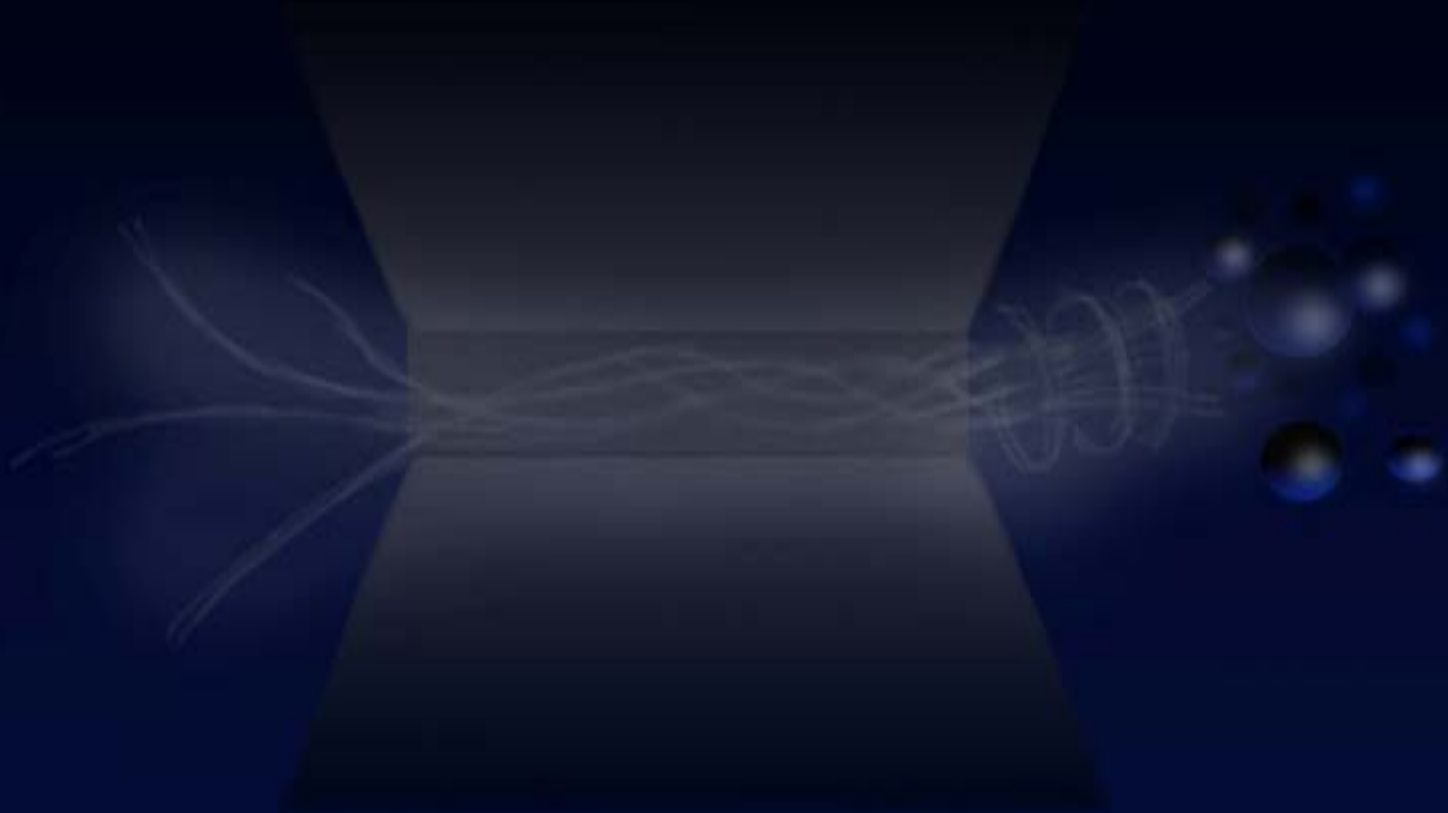
Élida Alechaga Silva

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

L'ESPECTROMETRIA DE MASSES EN L'ANÀLISI DE DROGUES VETERINÀRIES



Élida Alechaga Silva

U



B

Universitat de Barcelona



Programa de Doctorat “Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució”

L’ESPECTROMETRIA DE MASSES EN L’ANÀLISI DE DROGUES VETERINÀRIES

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

Élida Alechaga Silva

Directors de la tesi:

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

Dra. Encarnación Moyano Morcillo
Departament de Química Analítica
Universitat de Barcelona

Barcelona, setembre de 2015

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

FAN CONSTAR:

que la present memòria titulada "*L'espectrometria de masses en l'anàlisi de drogues veterinàries*" ha estat realitzada sota la nostra direcció per la Sra. **Élida Alechaga Silva** 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 2015

Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet

Dra. Encarnación Moyano Morcillo

“Every great work, every big accomplishment, has been brought into manifestation through holding to the vision, and often just before the big achievement, comes apparent failure and discouragement.”

Florence Scovel Shinn,
The Game of Life and How to Play It (1925)

AGRAÏMENTS

En el moment d'escriure aquest apartat, fer la vista enrere i recordar tots aquells amb qui he tingut el plaer de viure aquests anys de dur treball, he quedat sorpresa amb el número de persones que en algun moment o altre m'ha ofert la seva ajuda, el seu suport o tan sols una petita (però necessària) empenta per seguir endavant. Això fa que em senti molt afortunada, però també una mica temorosa de deixar-me algú per culpa de la meva falta de memòria.

Vull començar agraint a les meves directores de tesi, la Dra. Maria Teresa Galceran i la Dra. Encarna Moyano, no només l'oportunitat de realitzar aquesta tesi, sinó també els coneixements compartits, la guia, el suport i la confiança en les meves capacitats.

Als companys del laboratori CECM, passats i presents, vull agrair els bons moments, el suport, les estones del cafè i els diversos bufets gastronòmics en aniversaris i grans i petits esdeveniments, i, en general, que m'hagin fet sentir un de més. Voldria agrair especialment als Drs. Óscar Núñez i Héctor Gallart i al Xavi Esparza tots els coneixements i consells, que no han estat pocs, i sense els quals no hagués pogut arribar enlloc. I molt especialment també a l'altra meitat de les Vet-girls, l'Anna Martínez, pels coneixements, la paciència i les bones estones compartint el dia a dia. A la resta de companys cecemets, ha estat un plaer compartir l'estada al laboratori amb vosaltres. I espero seguir compartint cervesetes amb vosaltres. Molts ànims a la Raquel, al Javieeeeeer i al Juanfra amb les seves respectives tesis. Al final valdrà la pena! Vull agrair a l'Anna i al Licel el suport moral, les injeccions d'autoestima en moments baixos i les grans "competències" que hem compartit. Seguiu així!

També ha estat un gran plaer poder conèixer i compartir estones amb la resta de companys i professors del departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona. Realment sou d'excel·lència.

Alicia, Iciar y Guía (¡y allegados!), para mí sois lo más valioso de la carrera de Ingeniería. Vuestra ayuda, consejos y soporte moral han sido y son tan impagables como imprescindibles.

Muchísimas gracias a Raquel, artista, por el fantástico diseño de la portada.

Por último y no por ello menos importante, quiero agradecer a mi familia toda la ayuda y soporte que me han ofrecido. Y muy especialmente a mis padres, que desde bien pequeña han valorado, apoyado y cultivado mis ansias de conocimiento. Gracias a vosotros he llegado hasta aquí. Casi nada, ¿verdad?

ÍNDEX

RESUM	iii
ABREVIATURES I ACRÒNIMS	v
OBJECTIUS I ESTRUCTURA	ix
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. Fenicols	11
1.1.1. Farmacocinètica i toxicitat	14
1.1.2. Legislació	15
1.1.3. Mètodes d'anàlisi	17
1.2. Aminoglicòsids	11
1.2.1. Farmacocinètica i toxicitat	14
1.2.2. Legislació	15
1.2.3. Mètodes d'anàlisi	17
2. CROMATOGRAFIA DE LÍQUIDS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES PER A L'ANÀLISI DE DROGUES VETERINÀRIES	59
2.1. Introducció	62
2.2. Treball experimental	68
2.2.1. Article científic I: <i>Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods</i>	69
2.2.2. Article científic II: <i>Mixed-mode liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of aminoglycosides in meat</i>	81
2.2.3. Article científic III: <i>Simultaneous analysis of kasugamycin and streptomycin in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>	97
2.3. Discussió de resultats	107
3. ESPECTROMETRIA DE MASSES: FONTS, RUTES DE FRAGMENTACIÓ I ANÀLISI DIRECTA	121
3.1. Introducció	125
3.1.1. Fonts d'ionització i analitzadors	125
3.1.2. Analitzadors híbrids	131
3.2. Treball experimental	138
3.2.1. Article científic IV: <i>Atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry of the phenicol drug family</i>	139
3.2.2. Article científic V: <i>Ion-molecule adduct formation in tandem mass spectrometry</i>	159
3.2.3. Article científic VI: <i>Wide-range screening of psychoactive substances by FIA-HRMS: identification strategies</i>	183
3.3. Discussió de resultats	199

CONCLUSIONS 211

BIBLIOGRAFIA..... 219

RESUM

L'administració continuada d'antibiòtics veterinaris genera recel en el consumidor degut a l'increment de casos de resistència microbiana en tractaments mèdics en humans i d'al·lèrgies a medicaments per la presència de residus d'aquests medicaments en aliments d'origen animal. Per aquestes raons, la Unió Europea ha establert límits màxims de residus (MRL) per a les drogues veterinàries permeses en aliments d'origen animal i un nivell de concentració mínim a detectar (*minimum required performance limit*, MRPL) als mètodes analítics que determinen substàncies prohibides (Reglament 37/2010). Atesa la importància del control de la presència de residus d'antibiòtics en aliments d'origen animal, és necessari disposar de mètodes d'anàlisi ràpids, senzills i amb bona selectivitat i sensibilitat. Les excel·lents prestacions de l'espectrometria de masses tant pel que fa a sensibilitat, selectivitat i a la gran quantitat d'informació estructural que ofereix, especialment acoblada a tècniques de separació, fan que avui dia sigui l'eina de referència en molts laboratoris analítics per a la determinació de compostos orgànics regulats. Per aquest motiu, aquesta tesi està centrada en l'aplicació de l'espectrometria de masses a l'anàlisi de dues famílies d'antibiòtics veterinaris, els fenicols i els aminoglicòsids.

En aquesta tesi s'ha estudiat, d'una banda, la separació cromatogràfica dels compostos seleccionats (fenicols i aminoglicòsids) mitjançant cromatografia de líquids amb l'objectiu de desenvolupar mètodes d'anàlisi mitjançant cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem. L'elevada polaritat dels aminoglicòsids i d'alguns dels fenicols comporta que presentin una baixa retenció en les fases estacionàries convencionals d'octadecilsilà. En aquest context, s'ha avaluat tant la utilització de fases estacionàries alternatives a les d'octadecilsilà per a afavorir la retenció de compostos polars, com els avenços en el desenvolupament de les partícules del rebliment cromatogràfic (partícules sub-2 µm i de nucli sòlid) per a millorar tant les eficàcies com les resolucions obtingudes. Per a la separació dels fenicols, els millors resultats es van obtenir amb la columna de partícula de nucli sòlid fenil-hexil, que va permetre aconseguir una bona separació, ràpida i eficaç i amb una retenció suficient per

al metabòlit polar florfenicol-amina. Pel que fa referència als aminoglicòsids, s'ha proposat l'ús d'una columna amb fase estacionària multimodal que proporciona adequada retenció i elució dels anàlits sense necessitat d'emprar formadors de parell iònic o concentracions elevades de sals en la fase mòbil. Els mètodes LC-MS/MS desenvolupats, han demostrat bons paràmetres de qualitat i s'ha aconseguit arribar a la sensibilitat necessària per a determinar els anàlits al nivell de concentració fixat pel MRL de cada matriu. A més, els mètodes desenvolupats es van aplicar a mostres d'aliments com ara carns (porc, vedella i pollastre), peix, mel i fruites i verdures, inclosa una mostra (material de control de qualitat) amb una concentració coneguda de cloramfenicol, obtenint també resultats satisfactoris.

D'altra banda, s'ha estudiat el comportament per espectrometria de masses de les famílies de compostos esmentades, i s'han establert les rutes de fragmentació per poder determinar les transicions més sensibles i selectives. L'estudi de les rutes de fragmentació també ha permès la identificació d'un ió característic per als fenicols, que pot ser emprat en mètodes de cribratge per a la identificació de compostos anàlegs. També s'ha estudiat la formació d'adductes en espectrometria de masses en tàndem amb diferents analitzadors de masses, fenomen que pot distorsionar els espectres de fragmentació i dificultar la identificació de compostos en base a aquests. Així, s'ha determinat que els factors clau en la formació d'aquests adductes són la configuració de l'instrument, especialment pel que respecta a la disposició de la font d'ionització, la humitat del gas de col·lisió emprat i el temps de residència en l'analitzador, i s'han avaluat les possibles estratègies que es poden dur a terme per a minimitzar aquest efecte. Finalment, s'ha aplicat l'anàlisi per injecció en flux (FIA) acoblat a l'espectrometria de masses d'alta resolució pel desenvolupament d'un mètode de cribratge ràpid per a l'anàlisi directa i global de nous productes estupefaents. En aquest cas, s'han avaluat les estratègies d'identificació per espectrometria de masses més adients per a la identificació de compostos desconeguts com ara l'ús de llibreries espectrals i programaris de fragmentació *in silico*, que han permès identificar la presència de medicaments humans i veterinaris (benzocaïna, levamisol) com a adulterants en mostres d'estupefaents així com la presència de metamizol en una mostra fraudulenta de cocaïna.

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

ADI	ingesta diària admissible
ADN	àcid desoxirribonucleic
AGs	aminoglicòsids
AGC	<i>automatic gain control</i>
AMIK	amikacina
APCI	ionització química a pressió atmosfèrica
API	ionització a pressió atmosfèrica
APPI	fotoionització a pressió atmosfèrica
APRA	apramicina
ARB	arbakacina
BEK	bekamicina
BUT	butirosina
C18	octadecil
C8	octil
CAP	cloramfenicol
CAS	<i>chemical abstracts service</i>
CC α	límit de decisió
CC β	capacitat de detecció
CID	dissociació induïda per col·lisió
CZE	electroforesi capil·lar de zona
DART	anàlisi directe en temps real
DDA	<i>data dependent analysis</i>
DESI	ionització per desorció per electrospai
DHSTR	dihidrostreptomina
DIA	<i>data independent analysis</i>
DLLME	microextracció líquid-líquid dispersiva
DSPE	extracció en fase sòlida dispersiva
ECD	detector de captura d'electrons
EDTA	àcid etilendiamintetraacètic
EI	ionització electrònica
EMEA	agència europea per a l'avaluació de productes medicinals
ESI	electrospai

FF	florfenicol
FFA	florfenicol-amina
FIA	anàlisi per injecció en flux
FIA-HRMS	anàlisi per injecció en flux acoblada a l'espectrometria de masses d'alta resolució
FMOC-Cl	cloroformat de fluoroenilmetil
FOR	fortimicina
FT-ICR	ressonància ciclotrònica d'ions amb transformada de Fourier
FWHM	amplada de pic a mitja alçada
GC	cromatografia de gasos
GC-MS	cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses
GEN	gentamicina
H-ESI	electrosprai assistit tèrmicament
HCD	<i>higher-energy collision dissociation</i>
HFBA	àcid heptafluorobutíric
HILIC	cromatografia d'interacció hidrofílica
HLB	balanç hidrofílic-lipofílic
H _{min}	alçada òptima de plat teòric
HRMS	espectrometria de masses d'alta resolució
HSA	àcid heptanosulfònic
HYG	higromicina
IARC	agència internacional de recerca contra el càncer
IPLC	cromatografia de líquids de fase invertida amb formadors de parells iònics
ISEP	isepamicina
IT	trampa d'ions
IUPAC	Unió Internacional de Química Pura i Aplicada
k	factor de retenció
KAN	kanamicina
KAS	kasugamicina
LC	cromatografia de líquids
LC-MS/MS	cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem
LC-MS	cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses
LIF	fluorescència induïda per làser
LIT	trampa d'ions lineal

LOD	límit de detecció
LOQ	límit de quantificació
MCX	mode mixt fase invertida-bescanvi catiònic
MeAαC	2-amino-3-metil-α-carbolina
MEKC	cromatografia electrocinètica micel·lar
MiNDEKC	<i>micellar nanoparticle dispersed electrokinetic chromatography</i>
MIP	polímer d'empremta molecular
MRL	límit màxim de residu
MRM	monitorització de múltiples reaccions
MRPL	nivell mínim de funcionament exigit
MS	espectrometria de masses
MS/HRMS	espectrometria de masses en tàndem en alta resolució
MS/MS	espectrometria de masses en tàndem
MS ⁿ	fragmentació en etapes successives
MSPD	dispersió en fase sòlida de la matriu
N	número de plats
NEO	neomicina
NET	netilmicina
NFPA	àcid nonafluoropentanoic
NICI	ionització química negativa
NOAEL	nivell sense efecte advers observable
NOEL	nivell sense efecte observable
NQS	àcid 1,2-naftoquinona-4-sulfònic
OPA	<i>o</i> -ftalaldehid
PARO	paromomicina
PBS	solució tamponada de fosfats
PFP	pentafluorofenil
PLE	extracció amb líquids pressuritzats
PMME	microextracció amb polímer monolític
PSA	propilamina primària i secundària
Q	quadrupol senzill
QqQ	triple quadrupol
Q-TOF	quadrupol-temps de vol
Q-TRAP	quadrupol-trampa d'ions

QuEChERS	<i>quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
RER	<i>reverse energy ramp</i>
RIB	ribostamicina
RSD	desviació estàndar relativa (%)
SCX	bescanvi catiònic fort
SDS	dodecilsulfat de sodi
SFE	extracció amb fluids supercrítics
SIM	monitorització selectiva d'ions
SIS	sisomicina
SPC	espectinomicina
SPE	extracció en fase sòlida
SRM	monitorització de reaccions selectives
STR	estreptomycina
SWATH	<i>sequential windowed acquisition of all theoretical fragment ion mass spectra</i>
TAP	tiamfenicol
TCA	àcid tricloroacètic
TFA	àcid trifluoroacètic
TLC	cromatografia de capa fina
TOB	tobramicina
TOF	temps de vol
UHPLC	cromatografia de líquids d'ultraalta eficàcia
UV	ultravioleta
VUV	ultravioleta de buit
WCX	bescanvi catiònic feble

OBJECTIUS I ESTRUCTURA

OBJECTIUS I ESTRUCTURA

Avui dia el control de la presència de residus d'antibiòtics en aliments d'origen animal és un tema de gran importància social pels possibles efectes negatius sobre la salut humana, fet que ha comportat que s'hagin d'establir mètodes d'anàlisi adequats per a la seva determinació. Ara bé, algunes famílies d'antibiòtics presenten unes característiques fisicoquímiques que dificulten l'establiment de metodologia analítica multi-residu per a la seva determinació i per als quals encara avui no existeixen procediments ràpids, senzills i amb bona selectivitat i sensibilitat adequats per al seu control. De fet, un dels aspectes d'interès de la química analítica actual és el desenvolupament de mètodes multi-residu capaços de determinar conjuntament un gran nombre de compostos amb propietats molt diferents.

Atesa aquesta problemàtica, els objectius generals plantejats en aquesta tesi són:

- Desenvolupar metodologia robusta i selectiva basada en la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses per a la determinació en aliments de compostos que presenten elevada dificultat analítica.
- Establir mètodes multi-residu ràpids i que requereixin un mínim de manipulació de la mostra, adequats per a la identificació i quantificació d'un elevat nombre d'anàlits.

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

- Avaluar l'aplicabilitat de nous rebliments i noves fases estacionàries per a la separació per cromatografia de líquids d'antibiòtics amb polaritat mitjana-alta; en concret, els fenícols i els aminoglicòsids.
- Establir les rutes de fragmentació dels compostos estudiats en aquesta tesi. Identificar les transicions més sensibles i selectives per a la seva determinació i avaluar possibles estratègies per a la identificació d'anàlegs mitjançant mètodes *non-target*.

- Estudiar la formació d'adductes ió-molècula en l'etapa de fragmentació induïda per col·lisió (CID) en espectrometria de masses en tàndem i avaluar l'efecte del tipus d'analitzador i del disseny de l'espectròmetre de masses.
- Estudiar l'aplicabilitat de l'acoblament de la injecció en FIA amb espectrometria de masses d'alta resolució per implementar mètodes d'anàlisi *non-target*; en concret, per a la identificació i determinació de productes estupefaents.
- Avaluar l'ús de diferents mètodes d'escombratge en espectròmetres de masses amb analitzadors híbrids de nova generació i alta resolució per al desenvolupament de mètodes d'anàlisi *non-target*, així com les estratègies de tractament de dades més adients per a la identificació de compostos desconeguts.

La present memòria de tesi s'ha estructurat en tres apartats:

- Una introducció on es comenta la importància de desenvolupar mètodes analítics per al control de la presència de residus de medicaments veterinaris en aliments i que inclou informació sobre dues famílies d'antimicrobians en les quals s'ha centrat aquesta tesi: els fenicols i els aminoglicòsids. Igualment, es comenta breument la metodologia emprada habitualment per a l'anàlisi d'aquests compostos en aliments.
- El segon capítol està dedicat al desenvolupament de mètodes d'anàlisi dels productes veterinaris estudiats mitjançant cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem. El treball experimental corresponent a aquest capítol està recollit en tres articles científics intitolats "*Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods*", publicat a la revista *The Analyst*, 137 (2012) 2486-2494; "*Mixed-mode liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of aminoglycosides in meat*", publicat a la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406 (2014) 4941-4953 i "*Simultaneous analysis of kasugamycin and streptomycin in vegetables by liquid*

chromatography-tandem mass spectrometry”, publicat a la revista *Analytical Methods*, 7 (2015) 3600-3607.

- El tercer capítol està dedicat a temes específics d'espectrometria de masses. S'hi inclou l'estudi de la fragmentació de la família dels fenícols en espectrometria de masses en tàndem, la formació d'adductes en CID en diferents instruments amb analitzadors de trampa d'ions, triple quadrupol i quadrupol-orbitrap, i el desenvolupament d'un mètode *non-target* per a l'anàlisi de nous productes estupefaents per anàlisi per injecció en flux (FIA) i espectrometria de masses d'alta resolució. Aquests estudis es troben recollits en els articles científics intitulats “*Atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry of the phenicol drug family*”, publicat a la revista *Journal of Mass Spectrometry*, 48 (2013) 1241-1251; “*Ion-molecule adduct formation in tandem mass spectrometry*”, enviat a publicar a la revista *Rapid Communications in Mass Spectrometry* i “*Wide-range screening of psychoactive substances by FIA-HRMS: identification strategies*”, publicat a la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407 (2015) 4567-4580.
- Finalment s'inclouen les conclusions obtingudes de la realització d'aquesta tesi, així com la bibliografia corresponent.

CAPÍTOL 1

Introducció

El considerable creixement de la població mundial esdevingut des de la revolució industrial i molt especialment després de la segona guerra mundial no hauria estat possible sense les millores higièniques i alimentàries que s'han incorporat a la ramaderia moderna, les quals han permès abastir d'aliments àmplies capes de població humana. No obstant això, avui dia el planeta supera àmpliament els 7.000 milions d'habitants i satisfer les necessitats alimentàries d'aquesta població, si es té en compte que la disponibilitat d'espai conreable o apte per a pastures és reduïda, implica aconseguir un rendiment molt elevat de les explotacions agrícoles i ramaderes; rendiment que sovint s'aconsegueix portant al límit les legislacions existents. En aquest context i en relació a la producció i consum de productes d'origen animal, es pot afirmar que l'ús de drogues veterinàries ha estat i és una eina de gran utilitat, atès que ha permès garantir la salut i el benestar dels animals i reduir el risc de transmissió de malalties a la població humana.

Avui dia, en ramaderia, els medicaments veterinaris no només són emprats amb finalitats terapèutiques, sinó que també s'addicionen de manera regular als pinsos o a l'aigua com a mesura profilàctica per tal de prevenir l'aparició de malalties afavorides per l'amuntegament dels animals. A més, certs medicaments, com per exemple les hormones o alguns antibiòtics, actuen com a promotors del creixement i han estat utilitzats per engreixar de manera ràpida els animals amb els conseqüents avantatges de tipus econòmic. Ara bé, l'administració de compostos amb efecte hormonal (estilbens, estrògens, tireostats,...) sense raons terapèutiques, és a dir, únicament pel seu efecte promotor del creixement, està prohibida des de l'any 1996 per la Directiva 96/22/EC [96/22/EC] tant pel frau que suposa, ja que els animals s'engreixen en omplir-se els teixits amb líquid, disminuint en conseqüència la qualitat del producte final, com pel perill que la presència de residus d'aquests compostos en els aliments pot comportar per al consumidor. Alguns agents antimicrobians també presenten efectes de promoció del creixement, encara que en menor grau que les hormones, però tot i així, el seu ús ha estat una pràctica freqüent en les explotacions ramaderes. Ara bé, l'increment de casos de resistència microbiana, tant en tractaments mèdics en humans com en alguns tractaments veterinaris, ha portat a la prohibició de la utilització de pinsos medicats amb agents antimicrobians (amb l'excepció d'alguns coccidiostats i histomonostats) a partir

de l'1 de gener del 2006 [1831/2003/EC], de manera que avui dia només es permet la seva utilització per prescripció veterinària i amb motius terapèutics.

La classificació de les drogues veterinàries és complexa, ja que existeixen multitud de compostos amb característiques diferents i la majoria d'ells tenen diversos usos. A la Taula 1.1 s'inclou una recopilació dels medicaments d'ús veterinari més rellevants classificats d'acord amb el criteri ATCvet (anatòmic, terapèutic, químic) proposat pel WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology de l'Institut Noruec de la Salut Pública [WHOCC, 2015]. Aquest criteri classifica les drogues veterinàries i les hi assigna un codi en funció de diferents criteris. El primer nivell de codificació correspon al grup anatòmic afectat (conjunt d'òrgans o sistema anatòmic), mentre que els nivells segon i tercer corresponen a la funció terapèutica que desenvolupen (grup i subgrup terapèutic). Els subsegüents nivells classifiquen els compostos d'acord amb les famílies i subfamílies químiques a les quals pertanyen. Cal tenir en compte, però, que certs compostos o famílies poden aparèixer en diversos apartats si desenvolupen la mateixa funció en grups anatòmics diferents, com és el cas dels analgèsics i antiinflamatoris. A més, el criteri ATCvet també inclou, encara que en un llistat separat, les combinacions de compostos que es poden subministrar conjuntament. Això comporta que la classificació completa on es mostren tots els possibles nivells sigui molt extensa. A la Taula 1.1 es mostra la classificació de les drogues veterinàries però només s'indiquen els grups i subgrups per als antimicrobians, que és el més rellevant per a aquesta tesi, mentre que per a la resta d'apartats s'ha indicat només el nombre de grups que inclouen. Com es pot observar a la Taula 1.1, els medicaments veterinaris comprenen una gran quantitat de compostos amb activitats terapèutiques molt diferents. No obstant això, les dades de les vendes a nivell europeu de cada tipus de medicament posen de manifest que els antibacterians són els compostos més emprats actualment. Per exemple, l'any 2004 al Regne Unit gairebé la meitat de les tones de productes d'ús veterinari venudes van correspondre a agents antimicrobians i, d'entre aquests, els antibacterians representaven més del 95% del total [Kools i cols., 2008]. Això posa de manifest la gran importància que presenten aquest tipus de compostos i justifica la necessitat d'establir mesures de control sobre el seu ús. Els agents antibacterians són aquells que actuen contra les infeccions bacterianes, ja sigui produint la mort de

Taula 1.1. Classificació de les drogues veterinàries.

Grup anatòmic	Grup terapèutic	Subgrup terapèutic	Grups químics	
Tracte alimentari i metabolisme	preparacions estomatològiques		4	
	tractament de desordres relacionats amb l'acidesa	antiàcids	8	
		controladors del reflux	5	
	tractament de desordres gastrointestinals funcionals	antiespasmòdics propulsius	5 1	
	antiemètics i antinauseants		2	
	tractament del fetge i la vesícula biliar		2	
	tractament del restrenyiment		7	
	antidiarreics	adsorbents	3	
		antipropulsius	1	
	preparacions antiobesitat		3	
	digestius		3	
	control de la diabetis		14	
	vitamines		19	
	suplements minerals		9	
	tònics		1	
	agents anabolitzants d'ús sistèmic	esteroides anabolitzants	3	
	estimulants de la gana		1	
	Sang i òrgans formadors de la sang	agents antirombòtics		7
		antihemorràgics	Antifibrinolítics	2
		Hemostàtics	5	
preparats antianèmics			7	
Substituts de la sang i solucions de perfusió			14	
Sistema cardiovascular	Tractament cardíac			
		estimulants antiarrítmics	3 5	

	vasodilatadors	3
antihipertensius		18
Diurètics	diurètics de sostre baix diurètics de sostre alt	9 7
Vasodilatadors perifèrics		7
Vasoprotectors		9
Agents beta-bloquejants		15
Bloquejants del canal del calci		6
Agents actuadors en el sistema renina-angiotensina	inhibidors ACE antagonistes angiotensina	4 3
Agents modificadors dels lípids		6
Dermatològic		
Antifúngics dermatològics		3
Hidratants i protectors UV		6
Tractament ferides i úlceres	ciatritzants enzims	2 2
antiprurítics	antihistamínic	3
antipsoriàtics		6
antibiòtics per a tractament tòpic		4
corticosteroids per a tractament tòpic		13
antisèptics i desinfectants		11
preparats antiacnè		7
Sistema genitourinari i hormones sexuals		
Antiinfectius i antisèptics ginecològics		8
Moduladors del sistema genital	anticonceptius hormonal hormones	4 24
Urològics		
Urològics		5
Reguladors sistema endocrí		
Control glàndula pituïtària i hipotàlam		9
Corticosteroids sistèmics		4

Control glàndula tiroidea	6
Control pancreàtic	1
Homeostasi del calci	1
	2
Immunoteràpia/vacunes	(segons animal)
Antimicrobians	benzimidazoles imidazotiazoles tetrahidropirimidines lactones macrocíclicues
Antiparasitaris	antihelmíntics antiprotozoics/coccidiostats ionòfors no ionòfors
Antibacterians	beta-lactames (penicil·lines i cefalosporines) aminoglicòsids quinolones sulfamides o sulfonamides tetraciclines fenicols o amfenicols macròlids lincosamides pèptids nitrofurans nitroimidazoles quinoxalines
Antifúngics	macròlids poliens imidazoles
Antivirals	
Agents antineoplàsics i	20

immunomoduladors	immunoestimulants	3
	immunosupressors	4
Sistema musculoesquelètic	antiinflamatori i antireumàtic	No esteroideus
	relaxants musculars	8
	tractament malalties esquelètiques	3
	tractament de la gota	3
Sistema nerviós	anestèsics	10
	analgèsics	opioides
		sedants no opioides
	anticonvulsions	7
	medicaments contra el Parkinson	8
	psicològics	antipsicòtics
		ansiolítics
		sedants
	psicoanalèptics	antidepressius
		psicoestimulants
	preparats per a l'eutanàsia	3
Sistema respiratori	antitussius	2
	expectorants	2
	supressors de la tos	14
	broncodilatadors	adrenèrgics
		antihistamínic
	preparats nasals	descongestius
	pesticides	5
Control Ectoparasitari	repel·lents	10

l'organisme patògen (efecte bactericida) o inhibint-ne el creixement (efecte bacteriostàtic). Una vegada subministrats, els agents antibacterians es metabolitzen i s'excreten. Ara bé, el procés metabòlic depèn de l'animal, del compost i de la via d'administració i pot variar des d'unes hores fins a unes quantes setmanes. Per tant, en els teixits dels animals poden romandre petites quantitats del fàrmac original (residus) que poden acabar en el producte final de consum. De fet, l'ús poc controlat d'agents antibacterians ha suscitat recel en la població degut a la possibilitat de casos d'al·lèrgies [Reig i Toldrà, 2008] i de transferència de soques bacterianes resistents dels animals a les persones [Piddock, 1996] en consumir aliments d'origen animal. A més, és conegut que certs agents antibacterians presenten greus efectes secundaris i alguns, com ara el verd de malaquita, certes nitroimidazoles o els nitrofurans, han estat prohibits atesos els seus efectes carcinogènics i mutagènics. Per aquestes raons, s'han proposat mesures de control de la presència de residus d'agents antibacterians en aliments d'origen animal. A Europa, ja el Reglament Europeu 2377/1990 incloïa una metodologia per tal d'establir uns límits màxims de residu (*maximum residue level*, MRL) per als productes veterinaris que degut als seus possibles efectes havien de ser controlats. A part, aquest reglament classificava els productes en diversos grups recollits en una sèrie d'annexos:

- Annex I: compostos amb un valor de MRL definitiu establert.
- Annex II: substàncies considerades segures i per les que, per tant, no cal establir un MRL.
- Annex III: compostos amb MRL provisional a aplicar mentre es duen a terme estudis addicionals, i la data d'expiració del mateix.
- Annex IV: compostos pels quals no es pot establir MRL, ja que qualsevol nivell de residu es pot considerar perillós. L'administració d'aquestes substàncies a animals destinats al consum humà està prohibida.

Aquest reglament va ser substituït pel Reglament 470/2009 [470/2009/EC], que defineix un nou procediment per a l'establiment dels MRL, i pel 37/2010 [37/2010/EC], que agrupa les substàncies en dues taules:

- Taula 1: compostos dels annexos I, II i III del Reglament 2377/1990
- Taula 2: compostos de l'annex IV del Reglament 2377/1990

D'altra banda, la Directiva 96/23/EEC [96/23/EEC] obliga als països membres a establir programes de control de la presència de residus farmacològics en productes d'origen animal, tant en productes nacionals com en els d'importació, als quals ha de donar conformitat la Comissió Europea. Aquesta directiva regula el nombre de mostres i freqüència del mostreig, el tipus de mostres a controlar per a cada animal (no només teixits sinó també excrecions, altres productes de consum com ara la mel, i llocs de cria dels animals) i les mesures a prendre en cas d'incompliment de la normativa. Aquest control s'ha de fer conforme a la Decisió de la Comissió 657/2002/EC [657/2002/EC], que estableix les característiques que han de complir els mètodes analítics per al control dels residus de medicaments veterinaris en aliments d'origen animal. Per a aquelles substàncies que han estat directament prohibides (corresponents a la taula 2 del nou Reglament 37/2010) també estableix un nivell mínim a exigir (*minimum required performance limit*, MRPL) als mètodes analítics i que correspon al valor de concentració més baix d'un compost que ha de poder ser detectat i confirmat pel mètode analític en una determinada mostra.

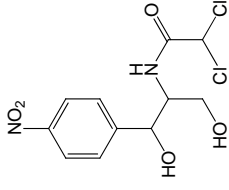
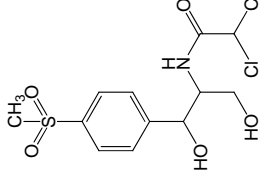
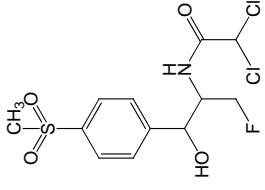
Atesa la importància del control de la presència de residus d'antibiòtics en aliments d'origen animal, és necessari disposar de mètodes d'anàlisi ràpids, senzills i amb bona selectivitat i sensibilitat, adequats per a la determinació d'aquests residus en aliments. Per aquest motiu, s'han desenvolupat molts mètodes per a la determinació de residus d'antibacterians en aliments [Stolker i Brinkman, 2005]. Tot i això, algunes famílies d'antibiòtics, entre les quals cal esmentar els fenicols i els aminoglicòsids, que presenten una problemàtica analítica que afecta a la seva determinació. En aquesta tesi es planteja avaluar el potencial d'una de les tècniques analítiques avui dia més rellevants, l'espectrometria de masses, i el seu acoblament a la cromatografia de líquids, per a l'anàlisi d'aquestes dues famílies d'agents antibacterians, els fenicols i els aminoglicòsids. Aquestes famílies d'antibiòtics, tot i que no estan entre les més emprades avui dia, presenten una notable dificultat analítica degut a la seva polaritat que fa que, o bé no es disposi de metodologia analítica adequada per a la determinació conjunta de tota la família (com en el cas dels fenicols), o bé la metodologia analítica de què es disposa comporti unes condicions de separació cromatogràfica, l'ús de formadors

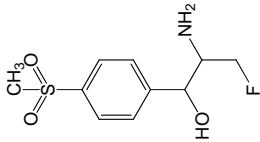
de parells iònics o elevades concentracions de sals, que dificulten l'acoblament a l'espectròmetre de masses (cas dels aminoglicòsids). Aquesta tesi pretén donar solució a la problemàtica relacionada amb la determinació d'aquestes famílies de compostos en matrius alimentàries i aportar nous mètodes ràpids, eficaços i amb la suficient sensibilitat exigida per la legislació vigent.

1.1. FENICOLS.

Els fenicols són una família d'antibacterians d'ampli espectre que presenten efectes bacteriostàtics i que comprèn el cloramfenicol (CAP) i els seus derivats tiamfenicol (TAP) y florfenicol (FF), les estructures químiques i propietats dels quals es mostren a la Taula 1.2. El cloramfenicol va ser aïllat d'una soca d'*Streptomyces venezuelae* [Ehrlich i cols., 1947] i va ser introduït en la pràctica clínica humana i veterinària l'any 1949. Es va convertir ràpidament en un dels antibiòtics més emprats, pel seu ampli espectre d'acció (és efectiu contra bacteris grampositius i gramnegatius, incloent bacteris anaerobis, i alguns fongs) i per la simplicitat i baix cost de producció. Originàriament, es va emprar per al tractament del tifus, tuberculosi i meningitis bacteriana en humans, així com per a certes infeccions ocasionades per alguns tipus d'enterococs i estafilococs. En animals, es va utilitzar per al tractament de diverses malalties ocasionades per bacteris anaerobis. Ara bé, degut a l'aparició de resistència bacteriana i, molt especialment, a la relació entre el tractament amb aquest antibacterià i el desenvolupament de danys en el teixit hematopoètic, el seu ús ha quedat restringit en humans a casos molt concrets de malalties greus sense teràpies alternatives. En veterinària, es va prohibir en animals destinats al consum humà [1430/94/EC] i només s'utilitza en animals de companyia. Alguns estudis [Rappeport i Bunn, 1994] indiquen que el grup *p*-nitro localitzat a l'anell aromàtic (Taula 1.2) pot ser el responsable dels efectes sobre la medul·la òssia (depressió de la funció hematopoètica i anèmia aplàstica) [Wongtavatchai i cols., 2004], la qual cosa ha portat a la síntesi del tiamfenicol (TAP), un anàleg amb un grup metilsulfonil en aquell mateix carboni. Aquest antibiòtic presenta el mateix espectre d'activitat que el CAP [Van Beers i cols., 1975; Sutter i Finegold, 1976] i cap efecte

Taula 1.2. Antibiótics de la família dels fenícols. Estructura i propietats físico-químiques.

Compost	Estructura	Fórmula Molecular	Nom IUPAC	Nº CAS	log $K_{o/w}$ ^a	pK _a ^a
Cloramfenicol (CAP)		C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	2,2-dicloro-N-[(1R,2R)-2-hidroxi-1-(hidroximetil)-2-(4-nitrofenil)etil]-acetamida	56-75-5	1,103 ± 0,354	cap entre 3 i 11 [Quiang i Adams, 2004] 11,03 ± 0,46 (acetilamida)
Tiamfenicol (TAP)		C ₁₂ H ₁₅ Cl ₂ NO ₅ S	2,2-dicloro-N-[(1R,2R)-2-hidroxi-1-(hidroximetil)-2-[4-(metilsulfonyl)fenil]etil]-acetamida	15318-45-3	-0,270 ± 0,448 -0,1 [Ignatova i cols., 2011]	11,05 ± 0,46 (acetilamida)
Florfenicol (FF)		C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ FNO ₄ S	2,2-dicloro-N-[(1S,2R)-1-(fluorometil)-2-hidroxi-2-[4-(metilsulfonyl)fenil]etil]-acetamida	73231-34-2	1,175 ± 0,597 -0,04 [Grabowski i cols., 2010]	no trobat [Boxall i cols., 2006] 10,73 ± 0,46 (acetilamida)

Florfenicol-amina (FFA)		$C_{10}H_{14}FNO_3S$	α -[(1S)-1-amino-2-fluoroetil]-4-(metilsulfonil)-, ($\alpha R'$)-benzenmetanol	76639-93-5	-0,398 \pm 0,417	7,59 \pm 0,29 (amina)
----------------------------	---	----------------------	---	------------	--------------------	-------------------------

^a Valors estimats amb ACD/Labs v11.02, excepte en els casos indicats.

secundari sobre el teixit hematopoètic [Yunis i cols., 1973]. Tot i tenir originalment algunes aplicacions en medicina humana, l'ús del TAP ha quedat restringit al tractament veterinari de malalties del tracte respiratori i gastrointestinal d'origen bacterià en bestiar porcí, oví i boví i també en aus [Dowling, 2013a]. El florfenicol (FF) és un altre anàleg sintètic introduït a mitjans dels anys noranta en qual el grup hidroxil del C-3 del TAP ha estat substituït per un fluor (Taula 1.2), la qual cosa comporta que sigui actiu contra soques bacterianes resistents al CAP i al TAP [Syriopoulou i cols., 1981]. El FF s'utilitza principalment en medicina veterinària per al tractament de malalties del tracte respiratori en bestiar boví i porcí i especialment en aqüicultura [Dowling, 2013a].

1.1.1. FARMACOCINÈTICA I TOXICITAT.

Els fenicols presenten una ràpida absorció i àmplia distribució en l'organisme després del subministrament, ja que degut a les seves propietats fisicoquímiques, la distribució depèn poc del pH del medi i no s'ha observat que s'adhereixin selectivament a cap teixit [Dowling, 2013a]. Pel que fa referència al metabolisme d'aquests compostos, el CAP es metabolitza en el fetge principalment per conjugació amb l'àcid glucurònic, i només entre un 5 i un 15% del compost original s'excreta sense metabolitzar a través de l'orina, amb un temps de vida mitjana d'unes poques hores [Plumb, 2002] mentre que el TAP s'excreta pràcticament sense metabolitzar, excepte en porcs on el metabolisme també es basa en glucuronidació. Pel que respecta al FF, també s'excreta en gran mesura com compost actiu, però en part es metabolitza a florfenicol-amina (FFA), que, com és més persistent, s'empra com a marcador per al control del temps d'eliminació de l'antibiòtic.

Com ja s'ha mencionat prèviament, en pacients tractats amb CAP s'ha observat amb freqüència una disminució del teixit hematopoètic, que dona lloc a un procés d'anèmia. Aquest procés depèn de la dosi i finalitza en cessar el tractament, encara que en alguns casos es pot desenvolupar una anèmia aplàstica amb dany sever del teixit de la medul·la òssia, que pot desembocar en leucèmia [Dollery, 1999]. Malgrat no es coneixi el mecanisme concret responsable del desenvolupament d'aquesta greu malaltia, es creu que pot ser deguda al dany en l'ADN causat per un metabòlit minoritari (nitrosocloramfenicol) [Festing i cols., 2001]. El CAP sembla produir hematotoxicitat en totes les espècies animals, però no

s'ha observat anèmia aplàstica en cap altra espècie a part dels humans. Atesa la possible relació entre el tractament amb CAP i el desenvolupament d'anèmia aplàstica i leucèmia, l'Agència Internacional de Recerca contra el Càncer (IARC) ha catalogat el CAP com a probable carcinogen (grup 2A) [IARC, 1990].

Cap altre dels anàlegs del CAP ha estat relacionat amb la inducció d'anèmia aplàstica en humans o animals però sí que presenten un cert efecte de supressió del teixit hematopoètic [Dowling, 2013a]. No obstant això, cap dels estudis realitzats han pogut demostrar carcinogenicitat o mutagenicitat per als anàlegs TAP i FF.

1.1.2. LEGISLACIÓ.

El comitè de productes mèdics d'ús veterinari de l'agència europea per a l'avaluació de productes medicinals (EMA) s'encarrega de l'avaluació científica d'aquells productes mèdics dels quals se'n vol fer un ús controlat dins del territori europeu. Els seus informes són emprats per la Comissió Europea per a l'acceptació o prohibició de l'ús d'aquests compostos i l'establiment dels MRLs i MRPLs, així com d'altres mesures de control. A partir d'estudis de toxicitat que determinen el nivell sense efecte observable (NOEL) o el nivell sense efecte advers observable (NOAEL), es determina un valor d'ingesta diària admissible (ADI) aplicant a aquests nivells un factor de seguretat i s'estableix el MRL de l'antibiòtic en cada producte d'origen animal prenent en consideració el consum mitjà de cadascun dels productes.

Per al TAP i el FF, s'han estimat uns ADIs de 2,5 i 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ pes corporal respectivament [EMA, 2006; EMA, 1999a]. Val a dir que aquests ADIs no es van estimar a partir dels NOELs o NOAELs dels compostos, sinó que es va emprar la concentració mínima inhibidora que pot afectar a la flora bacteriana humana, ja que aquest valor és molt inferior al NOEL en animals i, per tant, el valor resultant d'ADI és més restrictiu. A la Taula 1.3 es recullen els valors de MRL establerts per al TAP i el FF en cada producte d'origen animal segons la Regulació de la Comissió Europea 37/2010. Com es pot observar, els MRLs per al TAP ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) són inferiors als del FF i iguals per a tots els productes animals. Per al FF, en canvi, oscil·len entre els $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en múscul de pollastre fins als $3.000 \mu\text{g kg}^{-1}$ en fetge boví. A més, la legislació

especifica que en el cas del FF també s’han de controlar els metabòlits expressats com a FFA. Això no obstant, la major part dels residus en productes d’origen animal continuen sent del compost actiu i la presència d’altres metabòlits fora de la FFA és minoritària (menys del 10%) [EMEA, 1999a].

Taula 1.3. Límits màxims de residu (MRL) de TAP i FF.

Compost	Marcador	Matriu	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Altres provisions
FF	Suma de FF i metabòlits expressats com a FFA	Vedella, xai i cabrit	200 (múscul)	No permès en animals dels quals se'n consumeixi la llet
			300 (ronyó)	
			3.000 (fetge)	
		Porc	300 (múscul)	
			500 (pell, greix i ronyó)	
			2.000 (fetge)	
Aus	100 (múscul)	No permès en animals dels quals se'n consumeixin els ous		
	200 (pell i greix)			
	750 (ronyó)			
	2.500 (fetge)			
Peix		1000 (múscul i pell)		
Resta d'animals		100 (múscul)		
		200 (greix)		
		300 (ronyó)		
		2.000 (fetge)		
TAP	TAP	Totes les espècies	50 (múscul, greix, fetge, ronyó i llet)	No permès en animals dels quals se'n consumeixin els ous

Pel que fa al CAP, l’efecte secundari més greu associat al tractament amb aquest compost (anèmia aplàstica) no depèn de la dosi, la qual cosa fa impossible determinar-ne un NOAEL i, per tant, un ADI [EMEA, 1996]. Això comporta que no s’estableixi un MRL i, per tant, aquest compost queda inclòs al llistat de substàncies prohibides en la Regulació de la Comissió Europea 37/2010. Segons la Decisió de la Comissió 2003/181/EC, el MRPL que s’ha establert és de $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ per al CAP en carns, llet, ous, mel, orina i productes d'aqüicultura [2003/181/EC].

L'ús del CAP en animals destinats al consum humà ha estat també prohibit en molts altres països, com ara Estats Units [CFR 522.390], Japó o Canadà [Food and drug regulation B.01.048]. No obstant això, recentment han aparegut alguns estudis que posen de manifest la presència de CAP en productes d'origen animal provinents de països asiàtics, especialment en mel i productes d'aqüicultura [Santos i cols., 2005]. Aquest fet va portar a la Unió Europea i a altres països a augmentar la vigilància en productes d'origen animal importats del continent asiàtic [Impens i cols., 2003]. Altres treballs suggereixen que més que fruit d'un ús fraudulent, la presència de petites quantitats de residus de CAP en teixits animals, especialment en bestiar boví, oví i porcí, pot ser deguda a la presència d'aquest compost en el sòl i que pot provenir de bacteries presents de manera natural [Berendsen i cols., 2010]. En qualsevol cas, i sigui pel motiu que sigui, la presència d'aquests compostos en aliments d'origen animal ha de ser controlada.

1.1.3. MÈTODES D'ANÀLISI.

Els fenicols presenten unes característiques fisicoquímiques semblants a la majoria d'antibiòtics: són compostos relativament poc polars ($\log K_{O/W}$ entre -0.4 i 1) i són neutres a pHs entre 1 i 12 (pK_a estimats per a l'espècie acetilamida $\sim -1,7$; Taula 1.2). Ara bé, el metabòlit principal del FF, la FFA, en tenir una amina primària en l'estructura, té unes característiques fisicoquímiques diferents a la resta de compostos nadius (pK_a estimat per a l'espècie amino de 7,59; Taula 1.2), està carregada a pH àcids i neutres i és més polar que els altres fenicols. Això dificulta l'anàlisi conjunta de tota la família, ja que tant el procediment d'extracció com la preconcentració, purificació i separació han de tenir en compte aquesta diferència de polaritat. A la Taula 1.4 es recullen els mètodes de tractament de mostra emprats en l'anàlisi de fenicols en aliments on s'especifica el mètode d'extracció i de purificació, el mètode de determinació, la recuperació obtinguda i el límit de detecció.

Degut a l'ús extensiu del CAP a meitat del segle passat i posteriorment a la seva prohibició, la major part dels mètodes analítics existents han estat desenvolupats per al control d'aquest antibiòtic, tal i com es pot observar a la Taula 1.4. En pocs casos, i recentment, els mètodes incorporen la determinació dels anàlegs TAP i FF o el metabòlit FFA. En els apartats següents

es comenten les característiques més rellevants dels principals mètodes analítics desenvolupats per a la determinació de fenicols en aliments.

EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ

El tractament de la mostra i l'extracció dels anàlits de la matriu són etapes importants del procés analític. En l'anàlisi d'aliments, abans de la extracció, s'ha de procedir a l'homogeneïtzació de la mostra per tal d'assegurar-ne la representativitat i s'han de prendre mesures de conservació, generalment congelació. Un cop la mostra ha estat preparada adequadament, es realitza l'extracció dels anàlits. En la major part dels mètodes descrits a la literatura per a l'anàlisi de fenicols, l'extracció es duu a terme amb solvents orgànics o hidroorgànics [Stolker i Brinkman, 2005; Santos i Ramos, 2006]. Tal i com es pot observar a la Taula 1.4, per a matrius com ara els teixits animals, els ous o la llet els dissolvents més emprats són l'acetat d'etil, l'acetonitril o solucions amortidores de fosfats. També s'empren barreges de solvents, com per exemple acetonitril:aigua, acetat d'etil:amoníac, ditioritrol:acetat d'etil i mesclades d'acetona amb cloroform, diclorometà o aigua, a diferents proporcions. Generalment es prefereixen els solvents orgànics, atesa la baixa polaritat dels antibiòtics nadius. L'acetat d'etil és el més emprat, ja que permet un major rendiment d'extracció, tot i que presenta el desavantatge d'extreure moltes més substàncies que poden ser possibles interferències. L'acetonitril és un altre solvent que es recomana freqüentment, ja que permet obtenir unes recuperacions acceptables i, en tenir menys capacitat d'extracció que l'acetat d'etil, la co-extracció de compostos de la matriu és menor i, a més, ajuda a precipitar les proteïnes [Kinsella i cols., 2009]. Per a l'anàlisi de mel, la major part dels autors proposen dissoldre la mostra en aigua abans d'extraure els anàlits a fi de facilitar l'extracció. Per a l'anàlisi de matrius sòlides, alguns autors empren la tècnica de dispersió en fase sòlida (*matrix solid phase dispersion*, MSPD); per exemple s'ha utilitzat fase C18 i elució amb acetat d'etil:acetonitril:amoníac 25% per a l'anàlisi de fenicols (inclòs el FFA) en productes d'aqüicultura [Tao i cols., 2014], així com l'extracció amb fluids supercrítics [Liu i cols., 2010]. Tal com s'ha esmentat a l'apartat anterior, el CAP es metabolitza mitjançant la conjugació amb àcid glucurònic en el teixit hepàtic. Per tant, en l'anàlisi de matrius com ara fetge o

Taula 1.4. Mètodes d'anàlisi per a fenicols en mostres d'aliments d'origen animal.

Anàlit	Matriu	Extracció	Purificació	Recuperació	Separació	Columna	Fase mòbil (LC o GC) / Electròlit de suport (CZE)	Detecció (anàlitzador)	Límit de detecció	Cita
CAP	Mel	Dissolució amb aigua	SPE (supelMIP)	69 ± 1%	LC	Ascentis C18 (100x2,1 mm; 3 µm)	Gradient acetonitril:acetat d'amoni 10 mM	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,02 ng g ⁻¹ (CCα)	Boyd i cols., 2007
CAP	Mel	Dissolució amb aigua, extracció amb acetat d'etil:NH ₃ 98:2	SPE (C18)	97-101%	LC	Xterra MS C18 (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,11 ng g ⁻¹ (CCα)	Baggio i cols., 2009
CAP	Peix	Extracció amb acetat d'etil:NH ₃ 98:2	Desgreixat amb hexà, SPE (C18)	No indicat	LC	C18 (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient metanol:aigua	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,11 ng g ⁻¹ (CCα)	Biancotto i cols., 2009
CAP	Pròpolis	Extracció amb acetat d'etil:aigua 1:1	No	80-99%	LC	Gemini-C18 (100x2,0 mm; 5 µm)	Gradient metanol:aigua	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,05 ng g ⁻¹ (CCα)	Bononi i Tateo, 2007
CAP	Jalea	Extracció amb CH ₂ Cl ₂ :acetona 1:1	SPE (C18)	101-105%	LC	Luna ODS C18 (75x4,6 mm; 3 µm)	Metanol:acetat d'amoni 5 mM 60:40	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,15 ng g ⁻¹ (CCα)	Calvarese i cols., 2006
CAP	Carn	Extracció amb aigua	Desgreixat amb hexà	No indicat	GC	HP-5MS (50 m x 0,2 mm; 0,33 µm)	He	ECD	0,07 ng g ⁻¹ (CCα)	Cerkvenik-Flajs, 2006
CAP	Mel	Dissolució amb aigua, DLLME amb acetonitril i tetracloroetà	No	90-92%	LC	Pursuit-C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Metanol:aigua 55:45	UV	0,6 ng g ⁻¹ (CCα)	Chen i cols., 2008
CAP	Mel	Extracció dispersiva amb MIP magnètic	SPE (C18)	86-94%	LC	Hypersil ODS (250x4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril:àcid acètic 0,3% 50:50	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,046 ng g ⁻¹ (CCα)	Chen i Li, 2013
CAP	Mel	Extracció amb CH ₂ Cl ₂ :acetona 1:1	SPE (C18)	98-102%	LC	Luna ODS C18 (75x4,6 mm; 3 µm)	Metanol:acetat d'amoni 5 mM 60:40	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,07 ng g ⁻¹ (CCα)	Forti i cols., 2005
CAP	Pol·len	Extracció amb metanol:HPO ₃ 1% 3:2	SPE (HLB-Alumina-N) en tàndem	74-76%	LC	XR ODS (100x2,0 mm; 2,2 µm)	Acetonitril:formiat d'amoni 10 mM 70:30	(-)ESI- MS/MS (QqQ)	0,05-0,07 ng g ⁻¹ (CCα)	Fujita i cols., 2008
CAP	Llet	Extracció amb acetonitril	Cromatografia d'afinitat amb α-1- glicoproteïna àcida	78-83%	LC	Synergi MAX- RP (250x3,0 mm; 4 µm)	Acetonitril:acetat d'amoni 20 mM 40:60	(-)ESI-MS ² (IT)	No indicat	Gallo i cols., 2005

CAP	Carn	Extracció amb acetat d'etil-0,5 g L ⁻¹ ditiotretitol	Desgreixat per congelació i hexà, SPE (C18)	86-103%	LC	Hypersil BDS C8 (50x4,6 mm; 5 µm) HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	Acetonitril:acetat d'amoni 25 mM-àcid fòrmic 0,3% 50:50	(-)JAPCI-MS/MS (QqQ)	0,02 ng g ⁻¹	Gantverg i cols., 2003
CAP	Marisc	Extracció amb acetat d'etil	SPE (HLB)	91-116%	LC	Xterra MS C18 (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Acetonitril:NH ₃ 2% 40:60	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,02 ng g ⁻¹	Gikas i cols., 2004
CAP	Peix	Dispersió en fase sòlida de la matriu amb MIP		90-101%	LC	C18 (150x4,6 mm)	Acetonitril:aigua 50:50	UV	1,2 ng g ⁻¹	Guo i cols., 2008
CAP	Llet en pols	Extracció amb TCA 10%	SPE (HLB), desproteïnitació amb acetonitril:CH ₂ Cl ₂ 4:1	30 ± 4%	LC	Symmetry Shield RP18 (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,02 ng g ⁻¹ (CCa)	Guy i cols., 2004
CAP	Llet	Desproteïnitació amb TCA 15%, extracció amb líquids iònics	No	97-102%	LC	Eclipse XDB-C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Metanol:aigua 45:55	UV	0,1 ng mL ⁻¹	Han i cols., 2011a
CAP	Mel	Extracció amb líquids iònics	No							
CAP	Llet	Desproteïnitació amb TCA 15%, extracció amb líquids iònics	No	90-103%	LC	Eclipse XDB-C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Metanol:aigua 45:55	UV	0,3 ng mL ⁻¹	Han i cols., 2011b
CAP	Mel	Dissolució amb aigua, extracció amb líquids iònics	No							
CAP	Mel, llet, ous	Dissolució en tampó fosfats 20 mM pH 4,0	Microextracció amb polímer monolític (PMME)	85-102%	LC	Xterra MS C18 (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient metanol:aigua	(-)ESI-MS (Q)	0,02-0,04 ng g ⁻¹	Huang i cols., 2006
CAP	Peix	Extracció amb aigua, hidròlisi amb β-glucuronidasa	No	90%	LC	Discovery C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril:formiat d'amoni 10 mM pH 3,0 30:70	UV	15 ng g ⁻¹	Huang i cols., 2009
CAP	Gambes	Extracció amb tampó fosfats pH 6	Desgreixat amb hexà, SPE (C18)	No indicat	GC	BPX-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	NICI-MS ² (IT)	0,018 ng g ⁻¹ (CCa)	Impens i cols., 2003
CAP	Gambes	Extracció amb tampó fosfats pH 6	SPE (Chem-Elut), desproteïnitació isoocetà:CHCl ₃ 2:3	No indicat	LC	Genesis C18 (150x2,1 mm; 3 µm)	Metanol:àcid acètic 1% 55:45	(-)ESI-MS ² (IT)	0,011 ng g ⁻¹ (CCa)	

CAP	Mel, ronyó	Extracció amb tampó acetat de sodi pH 5,2; hidròlisi enzimàtica amb β -glucuronidasa	SPE (Extrelut)	95-120%	LC	Acquity BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7 μ m)	Gradient acetonitril:aigua amb 0,025% NH_3 a ambdós	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,007-0,019 ng g^{-1} (CC α)	Kaufmann i Butcher, 2005
CAP	Llet, llet en pols	Extracció amb CHCl_3 :acetona 2:1	Desgreixat amb hexà	94%	LC	ODS Hypersil (100x2,1 mm; 3 μ m)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS (Q)	0,1 ng g^{-1}	Krivohlavek i cols., 2007
CAP	Porc	Extracció amb acetat d'etil	Desgreixat amb hexà, SPE (C18)	91-104%	LC	Inertsil ODS-2 (150x4,6 mm; 5 μ m)	Acetonitril:aigua 40:60	(-)ESI-MS (Q)	No indicat	Li i cols., 2002
CAP	Ous, mel, llet	Extracció amb aigua 60°C	SPE (nanotubs de carboni)	96-102%	LC	DB-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 μ m)	He	EI-MS (Q)	20 ng g^{-1}	
CAP	Llet, llet en pols	Centrifugació	SPE (MIP4SPE)	48-87%	LC	Halo C18 (50x2,1 mm; 2,7 μ m)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,1%	(-)ESI-MS/MS (QTRAP)	0,003-0,004 ng g^{-1}	Lu i cols., 2010
CAP	Carn, marisc	Extracció amb tampó acetat de sodi 0,1 M pH 5, reextracció amb acetat d'etil:èter dietílic 3:1	SPE (MIP4SPE)	60 \pm 5%	LC	Symmetry Shield RP18 (150x2,1 mm; 3,5 μ m)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,06 ng g^{-1} (CC α)	Mohamed i cols., 2007
CAP	Llet	Extracció amb acetat d'etil	No	95-99%	LC	Symmetry Shield RP18 (150x2,1 mm; 3,5 μ m)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,01 ng g^{-1}	Mottier i cols., 2003
CAP	Mel	Dissolució amb aigua, extracció amb acetat d'etil	SPE (C18)	58-74%	LC	Pursuit-C18 (100x2,0 mm; 5 μ m)	Gradient acetonitril:aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic a ambdós	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	0,05 ng mL^{-1} (CC α)	Nicolich i cols., 2006
CAP	Mel	Extracció amb acetat d'etil	Desgreixat amb hexà	86-103%	LC	Nucleosil100-5 C18 HD (70x2,0 mm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,2 ng g^{-1}	Ortelli i cols., 2004
CAP	Llet, ous	Extracció amb acetoneitril	Desgreixat amb hexà	78-92%	LC	Eclipse C18 (150x2,1 mm; 2,1 μ m)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,05-0,09 ng g^{-1} (LOQ)	Ozcan i Aycan, 2013
CAP	Mel	Dissolució amb aigua, QuEChERS (acetonitril, PSA)	Extracció amb acetoneitril	78-92%	LC	RP-18e monolítica (100x4,6 mm)	Metanol:acetat d'amoni 0,2% 45:55	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,2 ng g^{-1}	Pan i cols., 2006

CAP	Crustacis	Extracció amb acetoneitril:NaCl 4% en aigua 1:1	Desgreixat amb hexà, SPE (C18), SPE (Silica)	95%	GC	ZB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	NICI-MS (Q)	0,074 ng g ⁻¹ (CCα)	Poizer i cols., 2006
CAP	Gambes	Extracció amb tampó fosfats 0,05 M pH 7,0	SPE (C18)	No indicat	LC	Symmetry Shield RP8 (150x3,9 mm; 5 µm)	Acetonitril:aigua 25:75	(-)ESI-MS (Q)	0,02 ng g ⁻¹ (CCα)	Ramos i cols., 2003
CAP	Mel Llet	Dissolució amb aigua Centrifugació	SPE (SupelMIP)	No indicat	GC	HP-1IMS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	NICI-MS (Q)	0,03-0,06 ng g ⁻¹ (CCα)	Rejtharová i Rejthar, 2009
CAP	Carn, ous, marisc	Extracció amb tampó fosfats 0,01 M pH 7,3	Extracció amb acetat d'etil	51-100%	LC	C18 (100x2,1 mm; 4 µm)	Gradient metanol:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,03 ng g ⁻¹ (CCα)	Rocha-Siqueira i cols., 2009
CAP	Llet en pols	Dissolució amb aigua, extracció amb acetat d'etil	Desgreixat amb hexà	No indicat	LC	Luna C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoneitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,08 ng g ⁻¹ (CCα)	Rodziewicz i Zawadzka, 2008
CAP	Carn, marisc, ous, mel, llet	Extracció amb acetoneitril	Extracció amb CHCl ₃	No indicat	LC	Purospher Star RP-18 (55x4,0 mm; 3 µm)	Gradient metanol:àcid fòrmic 0,15%	(-)ESI-MS/MS (QTRAP)	0,003-0,035 ng g ⁻¹ (CCα)	Ronning i cols., 2006
CAP	Mel	Dissolució amb aigua	SPE (HLB)	84-104%	GC	ZB-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	EI-MS (Q)	0,05 ng g ⁻¹ (CCα)	Sánchez-Brunete i cols., 2005
CAP	Peix	Extracció amb tampó fosfats pH 6,0 0,1 M	Desgreixat amb hexà, SPE (C18)	No indicat	GC LC	Permapbond OV (150 m x 0,25 mm; 0,25 µm) Eclipse XDB-C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	He Gradient acetoneitril:aigua amb 0,1% d'àcid acètic a ambdós	EI-MS (Q) (-)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat 0,267 ng g ⁻¹ (CCα)	Santos i cols., 2005
CAP	Mel	Dissolució amb NaCl 4%, extracció amb acetat d'etil	SPE (MIP sintètics)	90,7 ± 1,8%	LC	Superspher 100 RP-18 (125x4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril:aigua 30:70	UV	No indicat	Schirmer i Meisel, 2008
CAP	Mel	Dissolució amb aigua, extracció amb acetoneitril	No	No indicat	LC	Hypersil C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	Gradient metanol:aigua	(-)TS-MS/MS (QqQ)	0,08 ng g ⁻¹ (CCα)	Serra-Bonvehí i Lacalle-Gutiérrez, 2009
CAP	Marisc, carn, mel	Extracció amb tampó fosfats pH 6,88:acetat d'etil 1:1	Desgreixat amb hexà, SPE (silica), SPE (C18)	75-120%	GC	HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	NICI-MS (Q)	0,1 ng g ⁻¹ (CCα)	Shen i Jiang, 2005

CAP	Llet, gambes	Extracció amb tampó fosfats pH 7	Desproteïnitització amb TCA 15%, SPE (MIP sintètic)	LC	96-101%	ODS Hypersil (100x2,1 mm; 3 µm)	Metanol:aigua 40:60	UV	5 ng g ⁻¹	Shii i cols., 2007
CAP	Llet	QuEChERS (acetonitril, PSA+C18)		LC	85-92%	Synergi C18 (50x2,0 mm; 4 µm)	Etanol:àcid acètic 0,1% amb 5% isopropanol a ambdós, 15:85	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,11 ng g ⁻¹ (CCa)	Sniegocki i cols., 2014
CAP	Pollastre	Extracció amb tampó fosfats pH 7,2	Desproteïnitització amb TCA 15%, SPE (C18)	LC	63-88%	ODS C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Metanol:aigua 40:60	UV	No indicat	Tajik i cols., 2010
CAP	Mel	Extracció amb acetat d'etil	No	LC	90-102%	Luna C18 (50x2,0 mm; 5 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 2 mM	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,04 ng g ⁻¹	Taka i cols., 2012
CAP	Peix	Extracció amb acetat d'etil	Desgreixat amb hexà	LC	87-103%	Zorbax XDB C18 (150x3,0 mm; 5 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 10 mM	(-)JAPPI-MS (Q)	0,1 ng g ⁻¹	Takino i cols., 2003
CAP	Gambes	Extracció amb acetat d'etil	Desgreixat amb èter de petroli	LC	96-97%	Unisil C18 (150x4,0 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,057 ng g ⁻¹ (CCa)	Tyagi i cols., 2008
CAP	Mel	Extracció amb tampó acetat de sodi 0,1 M pH 5	SPE (HLB)	LC	No indicat	Symmetry Shield RP18 (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,014 ng g ⁻¹ (CCa)	Verzegnassi i cols., 2003
CAP	Carn	Extracció amb acetonitril	Desgreixat amb hexà	LC	81-104%	Synergi MAX-RP (250x3,0 mm; 4 µm)	Acetonitril:acetat d'amoni 20 mM 40:60	(-)ESI-MS ² (IT)	0,15 ng g ⁻¹ (CCa)	Vinci i cols., 2005
CAP	Mel	Dissolució amb aigua	Extracció líquid-líquid suportada sobre terra de diatomees	LC	87%	Symmetry C18 (150x4,6 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,05 ng g ⁻¹	Vivekanandan i cols., 2005
CAP	Productes d'aqüicultura		SPE (grafè)	LC	92-103%	Pinnacle C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	Acetonitril:aigua 30:70	(-)ESI-MS/MS (QTRAP)	0,032 ng g ⁻¹	Wu i cols., 2012
CAP, CAP-glucurònid	Mel, ronyó	Extracció amb tampó acetat de sodi pH 5,2; hidròlisi enzimàtica amb β-glucuronidasa	SPE (Chem-Elut) SPE (Bond Elut-NH2)	LC	No indicat	Nucleodur C18 (125x2,0 mm; 5 µm)	Metanol:acetat d'amoni 10 mM 45:55	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,05-0,09 ng g ⁻¹ (CCa)	Ashwin i cols., 2005

CAP, CAP-glucurònid	Marisc, pollastre Mel	Extracció amb acetat d'etil Extracció amb dissolució amb (NH ₄) ₂ CO ₃ pH 9.3	Desgreixat amb isoocetà-CHCl ₃ 2:3 SPE (C18)	46 ± 9% 63 ± 4%	LC	Superspher RP-18 (12.5x3 mm; 4 µm)	Acetonitril:tampó formiat d'amoni 10 mM pH 3 40:60	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,1 ng g ⁻¹ 0,05 ng g ⁻¹	Bogusz i cols., 2004
TAP	Gall d'indi	Extracció amb acetonitril	No	79-86%	CZE		NaH ₂ PO ₄ 20 mM pH 5,73 + Na ₂ B ₄ O ₇ 25 mM pH 9,3	UV	70 ng mL ⁻¹	Kowalski, 2007
CAP, TAP	Mel	Dissolució amb aigua, extracció amb acetat d'etil		85-120%	LC	Luna C18 (150x4,6 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:aigua	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,02 ng g ⁻¹	Barreto i cols., 2012
	Peix, gambes	Extracció amb acetonitril	Desgreixat amb CHCl ₃							
CAP, TAP	Mel	Dissolució amb aigua, DLLME amb acetonitril i C ₂ H ₂ Cl ₄	no	90-94%	LC	Pursuit-C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Metanol:aigua 55:45	UV	0,1-0,6 ng g ⁻¹	Chen i cols., 2009
FF	Pollastre, peix Mel	Extracció amb metanol Dissolució amb aigua, extracció amb acetat d'etil	SPE (MIP sintètics) SPE (MIP sintètics)	89-96%	LC	C18 (250x4,6 mm)	Acetonitril:aigua 30:70	UV	No indicat	Sadeghi i Jahani, 2013
CAP, FF	Llet, vedella	Extracció amb acetat d'etil acidificat amb àcid fòrmic	DSPE (C18)	89-107%	LC	Luna C18 (50x2,0 mm; 5 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 5 mM	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,066-1,6 ng g ⁻¹	Rezende i cols., 2012
CAP, TAP, FF	Pollastre	Extracció amb acetonitril	SPE (C18)	82-87%	MEKC		Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mM, 25 mM SDS	UV	1,5 - 7,4 ng g ⁻¹	Kowalski i cols., 2008
CAP, TAP, FF	Gambes	SFE (CO ₂)	No	66-92%	GC	TR-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	NICI-MS (Q)	0,0087-0,0174 ng g ⁻¹	Liu i cols., 2010
CAP, TAP, FF	Peix	Extracció amb acetat d'etil	Desgreixat amb hexà, SPE (Florisil)	62-82%	GC	HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	EI-MS (Q)	5 ng g ⁻¹	Nagata i Oka, 1996
CAP, TAP, FF	Llet	Extracció amb acetonitril	SPE (C18)	92-104%	GC	DB-5 (30 m x 0,2 mm; 0,33 µm)	He	ECD	1,0-2,1 ng g ⁻¹	Pfenning i cols., 1998
CAP, TAP, FF	Gambes	Extracció amb acetat d'etil:acetonitril 1:1	Desgreixat amb hexà, SPE (C18)	70 ± 17%	LC	Xterra phenyl (100x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,1%	(+/-)ESI-MS ² (IT)	0,5-1 ng g ⁻¹	Turnipseed i cols., 2003

CAP, TAP, FF, FFA	Gambes	Extracció amb acetat d'etil:NH ₃ 98:2	Desgreixat amb hexà, SPE (C18)	82-105%	GC	DB-5 (30 m x 0,322 mm; 1 µm)	He	ECD	0,7-1,3 ng g ⁻¹	Pfenning i cols., 2000
CAP, TAP, FF, FFA	Carn	Extracció amb acetat d'etil:NH ₃ 98:2	Desgreixat amb hexà, SPE (HLB)	79-106%	GC	HP-5MS (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	NICI-MS (Q)	0,1-0,5 ng g ⁻¹	Shen i cols., 2009
CAP, TAP, FF, FFA	Gambes	Extracció amb acetoneitril	Desgreixat en fred (-20°C), SPE (MIP sintètics)	92-99%	LC	Acquity BEH C18 (100x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient acetoneitril:aigua amb 0,3% NH ₃ a ambdós	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,016-0,10 ng g ⁻¹	Shi i cols., 2012
CAP, TAP, FF, FFA	Gambes, peix	Dispersió en fase sòlida de la matriu (C18, acetat d'etil:acetoneitril:NH ₃ 25%, 10:88:2)		84-99%	LC	Hypersil ODS C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 1 mM-àcid fòrmic 0,05%	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,01-0,09 ng g ⁻¹ (CCα)	Tao i cols., 2014
CAP, TAP, FF, FFA	Peix	Extracció amb acetona:aigua 8:2	Extracció amb CH ₂ Cl ₂ , desgreixat amb hexà	No indicat	LC	Hypersil C18 BD (150x2,0 mm; 5 µm)	Gradient acetoneitril:aigua amb 0,1% d'àcid acètic a ambdós	(+/-)ESI-MS (Q)	0,1-0,5 ng g ⁻¹	Tittlemier i cols., 2007
CAP, TAP, FF, FFA	Peix	Extracció amb acetona:aigua 8:2	extracció CH ₂ Cl ₂ , desgreixat amb hexà	71-107%	LC	Hypersil C18 BD (150x2,0 mm; 5 µm)	Gradient acetoneitril:aigua amb 0,1% d'àcid acètic a ambdós	(+/-)ESI-MS (Q)	0,1-1,0 ng g ⁻¹	Van de Riet i cols., 2003
CAP, TAP, FF, FFA	Pollastre	Extracció amb acetat d'etil:NH ₃ 98:2	Desgreixat amb hexà, SPE (MCX)	95-107%	LC	Xterra C18 (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoneitril:aigua	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,1-1,0 ng g ⁻¹	Zhang i cols., 2008
TAP, FF, FFA	Porc	Extracció amb també fosfats 0,02 M pH 7,4 + TCA 0,062 M:metanol 90:10	Cromatografia d'immunoafinitat	85-99%	LC	Symmetry Shield RP8 (150x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoneitril:aigua	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,12-1,2 ng g ⁻¹	Luo i cols., 2010
FF, FFA	Gambes, peix Porc	Extracció amb acetat d'etil:acetoneitril 1:1 Extracció amb acetat d'etil:NH ₃ 98:2	Desgreixat amb hexà, SPE (MCX)	72-110%	GC	HP-1 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	µECD	0,5-1,0 ng g ⁻¹	Zhang i cols., 2006
CAP, altres drogues veterinàries	Llet Mel	Extracció amb acetoneitril Dissolució amb aigua, extracció amb acetoneitril	No Desproteïnitització amb hexà	91-109%	LC	Zorbax Eclipse Plus C18 (100x2,0 mm; 1,8 µm)	Gradient acetoneitril:aigua amb 0,1% d'àcid acètic a ambdós	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,07 ng g ⁻¹ (CCα) 0,08 ng g ⁻¹ (CCα)	Cronly i cols., 2010
CAP, altres drogues veterinàries	Mel	Dissolució amb aigua	SPE (Strata-X)	93-97%	LC	Polar-RP Synergi C18 (50x2,0 mm; 4 µm)	Gradient acetoneitril:aigua	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	López i cols., 2008

CAP, altres drogues veterinàries	Llet	Extracció amb metanol amb 30% TCA, reextracció amb tampó McIlvaine pH 4	SPE (HLB)	100-107%	LC	Xterra C18 (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril/metanol (3/1):acetat de sodi 35 mM, EDTA 35 mM, CaCl ₂ 75 mM	UV	20 ng mL ⁻¹	Mamani i cols., 2009
CAP, altres drogues veterinàries	Llet	Desproteïnitització amb TCA 20%	SPE (C18)	92-99%	CZE		KH ₂ PO ₄ 0,027 M + Na ₂ B ₄ O ₇ 0,043 M pH 8	UV	720 ng mL ⁻¹	Santos i cols., 2007
CAP, altres drogues veterinàries	Mel	Hidròlisi àcida HCl 2 M 50°C	SPE (HLB)	78%	LC	XTerraMS C18 (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient metanol:aigua amb 0,15% d'àcid acètic a ambdós	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,2 ng g ⁻¹	Sheridan i cols., 2008
CAP, altres drogues veterinàries	Productes d'aquicultura	Extracció amb acetonitril:àcid acètic 1% 2:1	No	85-163%	LC	YMC ODS-aQ (100x2,0 mm; 3 µm)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,1%	(+/-)ESI-MS/HRMS (QTOF)	0,04 ng g ⁻¹	Turnipseed i cols., 2012
CAP, altres drogues veterinàries	Llet	Desproteïnitització amb TCA saturat, extracció amb CH ₂ Cl ₂	SPE (HLB)	87-100%	CZE		Na ₂ B ₄ O ₇ 20 mM pH 9,51	UV	29 ng mL ⁻¹	Vera-Candiotti i cols., 2010
CAP, altres drogues veterinàries	Mel	Dissolució amb EDTA 0,1 M i 0,12 g SDS; extracció amb líquids iònics		86-111%	LC	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150x4,6 mm; 3,5 µm)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,8%	UV	4,2 ng g ⁻¹	Yang i cols., 2014
CAP, altres drogues veterinàries	Llet	Extracció amb acetonitril	SPE (C18)	74-87%	LC	SB C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	Gradient metanol:àcid fòrmic 0,2%	(-)ESI-MS/MS (IT)	0,3 ng g ⁻¹	Tian, 2011
CAP, altres drogues veterinàries	Productes de pastisseria	QuEChERS (acetonitril, PSA)		70-110%	LC	Acquity BEH C18 (100x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 1 mM amb 0,05% d'àcid acètic a ambdós	(-)ESI-HRMS (Orbitrap)	> 1 ng g ⁻¹	De Dominicis i cols., 2012
CAP, TAP, altres drogues veterinàries	Llet, ronyó	Extracció amb aigua:acetonitril 1:1	No	No indicat	TLC	amino F254S	Metanol:acetonitril 4:6	(+/-)ESI-MS (Q)	No indicat	Chen i Schwack, 2014
CAP, TAP, altres drogues veterinàries	Peix, musclos	Extracció amb sonda enzimàtica amb proteïnasa K	Extracció amb CH ₂ Cl ₂	68-93%	LC	Gemini C18 (150x4,6 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,1%	UV	90-100 ng g ⁻¹	Fernández-Torres i cols., 2010
CAP, TAP, altres drogues veterinàries	Peix, musclos	Extracció enzimàtica amb microones	Extracció amb CH ₂ Cl ₂	66-88%	LC	Gemini C18 (150x4,6 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,1%	(-)ESI-MS/MS (QqQ)	2-5 ng g ⁻¹	Fernández-Torres i cols., 2011

CAP, TAP, altres drogues veterinàries	Mel	Dissolució amb tampó fosfats 0,1 M pH 8, extraccions successives amb acetonitril, TCA 10%:acetonitril 1:2, NFPA en acetonitril 0,04%	No	91-118	LC	Zorbax SB-C18 (50x2,1 mm; 1,8 µm)	Gradient acetonitril/metanol(1/1):NFPA 1 mM amb 0,5% àcid fòrmic a ambdós	(+JESI-MS/MS (QTRAP)	35,9-41,3 ng g ⁻¹	Hammel i cols., 2008
CAP, TAP, altres drogues veterinàries	Llet	Desproteïnitació amb TCA 20%, extracció tampó McIlvaine: metanol 8:2	SPE (HLB)	52-93%	LC	Acquity BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient acetonitril:àcid oxàlic 10 mM	UV	4-7 ng g ⁻¹	Wang i Li, 2009
CAP, TAP, altres drogues veterinàries	Mel	Dissolució amb aigua, extracció amb acetonitril-1% àcid fòrmic	No	68-109%	LC	Hypersil Gold aQ (100x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient metanol:aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic i 4 mM de format d'amoni a ambdós	(-JESI-HRMS (Orbitrap)	1-5 ng g ⁻¹	Gómez-Pérez i cols., 2012
CAP, FF, altres drogues veterinàries	Llet	Desproteïnitació amb HCl 3 M	SPE (C18)	80-109%	MEKC		Na ₂ B ₄ O ₇ 10 mM, SDS 25 mM, etanol 6% i nanotubs de carboni 2 mg L ⁻¹	UV	6,8-8,1 ng mL ⁻¹	Springer i Lista, 2012
TAP, FF, altres drogues veterinàries	Ous, peix, carn	Extracció amb acetonitril:aigua 6:4	SPE (Strata-X)	89-121%	LC	Acquity BEH C18 (100x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient acetonitril:aigua amb 0,1% d'àcid fòrmic a ambdós	(+JESI-HRMS (TOF)	No indicat	Peters i cols., 2009
FFA, altres drogues veterinàries	Peix	Extracció amb acetonitril	Desgreixat amb hexà	No indicat	LC	YMC fenil S-3 (50x4,0 mm; 3 µm)	Gradient acetonitril:àcid fòrmic 0,1%-hidròxid de sodi 10 µM	(+JESI-MS ³ (IT)	10-100 ng g ⁻¹	Smith i cols., 2009
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Llet	Extracció amb acetonitril	SPE contínua (HLB)	91-104%	GC	DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	EI-MS (Q)	0,0002 ng g ⁻¹	Azzouz i cols., 2011a
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Carn, peix	Extracció amb acetonitril:aigua 6:4	SPE contínua (HLB)	92-101%	GC	DB-5 (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm)	He	EI-MS (Q)	0,0004-0,0005 ng g ⁻¹	Azzouz i cols., 2011b
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Peix	Extracció amb aigua:acetona 1:1	SPE (HLB)	96-104%	LC	Inertsil C8 (250x4,0 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:acetat d'amoni 50 mM	UV	11,0-14,8 ng g ⁻¹	Evangelopoulou i Samanidou, 2013

CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Carn	Extracció amb acetoni-tril:aigua 86:14, bany d'aigua 60°C	Desgreixat amb hexà	83-90%	LC	Atlantis guard C18 (20x3,9 mm; 3 µm)	Gradient acetoni-tril:àcid fòrmic 0,1%	(-)/ESI-MS/MS (QqQ)	2 ng g ⁻¹	Martos i cols., 2010
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Ous, llet, mel, carn	Extracció amb acetoni-tril	No	No indicat	LC	Acquity HSS T3 (150x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient acetoni-tril:aigua amb addició post-columna 2% NH ₃	(-)/ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Robert i cols., 2013
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Carn	Extracció amb acetoni-tril:metanol 95:5	Desgreixat amb hexà	76-115%	LC	TSKgel ODS-100S (150x2,1 mm)	Gradient acetoni-tril/metanol(2/8):acetat d'amoni 10 mM-àcid acètic 0,3%	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	1-3 ng g ⁻¹	Yamada i cols., 2006
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries	Llet infantil	Extracció amb acetoni-tril	Centrifugació en fred (-40°C)	71-110%	LC	Acquity HSS T3 (100x2,1 mm; 1,8 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 2,5 mM	(-)/ESI-MS/MS (QqQ)	0,2-1,0 ng g ⁻¹ (LOQ)	Zhan i cols., 2013a
CAP, TAP, FF, altres drogues veterinàries i pesticides	Porc	Extracció amb acetoni-tril:retanol 5:1 i hexà (dues fraccions)	SPE dispersiva (PSA-C18)	62-139%	LC	Acquity HSS T3 (100x2,1 mm; 1,8 µm)	Gradient metanol:acetat d'amoni 1,5 mM	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,5-1,0 ng g ⁻¹ (LOQ)	Zhan i cols., 2013b
CAP, TAP, FF, FFA, altres drogues veterinàries	Llet	Extracció amb acetoni-tril	Ultracentrifugació amb filtre molecular 3.000 Da	No indicat	LC	YMC ODS-aQ (100x2,0 mm; 3 µm)	Gradient acetoni-tril:àcid fòrmic 0,1%	(+/-)ESI-MS/HRMS (QTOF)	5-100 ng mL ⁻¹	Turnipseed i cols., 2014
CAP, TAP, FF, FFA, altres drogues veterinàries	Porc	Extracció amb acetat d'etil i acetat d'etil:NH ₃ 98:2	Desgreixat amb hexà, SPE (MCX)	52-109%	LC	Acquity BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient acetoni-tril:aigua amb 0,1% d'àcid acètic a ambdós	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	0,008-0,03 ng g ⁻¹	Xia i cols., 2013

ronyons es recomana realitzar una digestió enzimàtica amb β -glucuronidasa per tal d'alliberar el CAP conjugat [Kaufmann i Butcher, 2005; Mottier i cols., 2003], etapa que no és necessària en l'anàlisi de teixit muscular [Cooper i cols., 1998]. Alguns autors proposen alliberar els compostos conjugats durant el procés d'extracció emprant sonicació enzimàtica [Fernández-Torres i cols., 2010] o extracció enzimàtica assistida per microones [Fernández-Torres i cols., 2011]. Entre els nous agents extractants cal esmentar els líquids iònics. Així, recentment s'ha proposat la utilització del bromur de 1-octil-3-metilimidazoli [Yang i cols., 2014], del clorur de 1-butil-3-metilimidazoli [Han i cols., 2011a] o del tetrafluoroborat de 1-butil-3-metilimidazoli [Han i cols., 2011b] per a l'extracció de CAP de mel i llet amb l'objectiu de minimitzar l'ús de solvents orgànics i aconseguir així mètodes d'anàlisi més ecològics, mantenint uns valors de recuperació semblants als d'altres mètodes més convencionals (>90%). També s'han emprat altres procediments d'extracció com la microextracció líquid-líquid dispersiva [Chen i cols., 2009] utilitzant una barreja d'acetonitril:tetracloroetà per a l'anàlisi de CAP i TAP en mel, obtenint recuperacions per sobre del 90%, encara que aquest mètode no arriba a la sensibilitat necessària per a la detecció de CAP en aquesta matriu segons la legislació vigent. Sigui quin sigui el procediment d'extracció emprat i degut a la gran quantitat de compostos que es poden co-extreure, en molts casos és necessària una etapa de purificació de l'extracte. En matrius amb un elevat contingut de greix (carns, peixos, llet) molts autors recomanen desgreixar la mostra amb hexà, èter de petroli o isoactà:cloroform.

Pel que fa referència a l'etapa de purificació i preconcentració, l'extracció en fase sòlida (SPE) és el procediment més utilitzat ja que permet obtenir extractes molt nets si hom selecciona la fase estacionària adequada. Per a l'anàlisi dels antibiòtics CAP, TAP i FF generalment s'utilitzen cartutxos de SPE de C18 o de balanç hidrofílic-lipofílic (HLB, Strata-X) (Taula 1.4), atesa l'afinitat d'aquests compostos per aquestes fases. Alguns autors proposen emprar altres sorbents com, per exemple, el grafè [Wu i cols., 2012]; però els resultats tant de recuperacions (properes al 100%) com de sensibilitat (per sota dels ng g^{-1}), encara que bons, són semblants als obtinguts amb els cartutxos convencionals i en general es prefereix la simplicitat d'emprar cartutxos comercials. No obstant això, quan els fenicols s'analitzen simultàniament amb el metabòlit FFA, els cartutxos de fase invertida no permeten obtenir

recuperacions adequades i la major part dels autors recomanen emprar cartutxos mixtos de fase invertida-bescanvi catiònic (MCX) [Zhang i cols. 2008; Zou i cols., 2013; Xia i cols., 2013] aprofitant que el metabòlit FFA es pot protonar i retenir amb el bescanviador catiònic. Ara bé, atès l'ampli ventall de compostos que poden ser retinguts amb aquests cartutxos, els extractes finals solen contenir un nombre elevat de compostos co-extrets, fet que s'agreuja quan es vol obtenir un factor de preconcentració gran.

Un altre tipus de cartutxos de SPE que s'han emprat en l'anàlisi de fenicols en mostres d'aliments són els polímers d'empremta molecular (MIPs) sintetitzats específicament per al CAP [Levi i cols., 1997] o pel FF [Sadeghi i Jahani, 2013] que presenten una elevada selectivitat aconseguint bones recuperacions i extractes nets. Recentment s'ha sintetitzat una variant magnètica de MIP amb òxids de ferro que facilita la separació del sorbent amb l'anàlit adsorbit [Chen i Li, 2013] i que es pot emprar com a fase dispersiva. Tot i els seus aparents avantatges en la selectivitat de la purificació, l'ús d'aquests cartutxos sol comportar problemes en l'anàlisi a concentracions baixes ($\mu\text{g kg}^{-1}$) degut a la dificultat d'eliminar tota resta de molècula plantilla (*template*) del polímer produint problemes de blancs i consegüentment límits de detecció relativament elevats [Levi i cols., 1997]. En el cas del CAP, aquest fet és especialment problemàtic atès el baix límit de detecció que es requereix (MRPL de $0,3 \mu\text{g kg}^{-1}$), cosa que restringeix l'aplicació d'aquests cartutxos [Boyd i cols., 2007]. Per a evitar aquests problemes, alguns autors proposen utilitzar molècules anàlogues com a plantilla, com ara el TAP. Aquesta estratègia és la seguida en la fabricació de cartutxos MIP comercials (com ara els SupelMIP® de Sigma-Aldrich) que utilitzen TAP com a plantilla [Boyd i cols., 2007; Rejtharová i Rejthar, 2009]. Aquests MIPs s'han utilitzat per a la purificació i preconcentració de tota la família de fenicols [Shi i cols., 2012], obtenint unes recuperacions iguals o lleugerament inferiors a les dels cartutxos HLB. En el cas de voler preconcentrar selectivament només un fenicol es recomana utilitzar el MIP obtingut emprant-lo com a plantilla i optimitzar adequadament els solvents de neteja dels cartutxos. D'aquesta manera es poden aconseguir recuperacions properes al 100% per al fenicol escollit [Shi i cols., 2007]. No obstant això, Baggiani i cols. [Baggiani i cols., 2012] suggereixen que les eficàcies de les recuperacions amb els cartutxos MIP podrien estar més relacionades amb els polímers escollits per a fer el sorbent que no pas amb la molècula seleccionada com a plantilla, ja que

l'elecció de la plantilla adequada proporciona només una lleugera millora en la selectivitat respecte a un cartutx SPE convencional.

També s'han emprat altres tècniques menys comunes per a la purificació dels extractes. Per exemple, Huang i cols. [Huang i cols., 2006] han proposat emprar una columna capil·lar monolítica de polímer d'àcid metacrílic-metacrilat d'etilenglicol per a la microextracció de CAP en mel, llet i ous. Els autors proposen aquest mètode alternatiu a la SPE, ja que s'aconsegueixen bones recuperacions (85-102%) i límits de detecció 0,02-0,04 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i absència de compostos interferents amb un cost de material molt inferior. Les columnes d'immunoafinitat també han estat proposades per a la purificació dels extractes en l'anàlisi de CAP en llet [Gallo i cols., 2005] o en productes d'aqüicultura [Zhang i cols., 2013].

El mètode QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) és una variant de l'extracció en fase sòlida dispersiva (DSPE) descrita inicialment per a l'anàlisi de pesticides en vegetals [Majors, 2007]. No obstant, la versatilitat d'aquest procediment d'extracció i la seva simplicitat ha comportat que s'hagi aplicat també per a l'anàlisi de residus de drogues veterinàries en aliments, com ara l'anàlisi de CAP en mel [Pan i cols., 2006], llet [Sniegocki i cols., 2014] i molt sovint en mètodes multi-residu [De Dominicis i cols., 2012; León i cols., 2012]. El procediment es basa en una extracció i partició amb una barreja acetonitril i aigua que es torna immiscible per l'addició de sals (principalment NaCl), de manera que els anàlits (generalment poc polars) queden a la fase orgànica. Posteriorment es duu a terme una extracció en fase sòlida dispersiva emprant sorbents adequats com ara C18, propilamina primària i secundària (PSA), carboni grafitat o mescles dels anteriors, segons la matriu. El mètode QuEChERS comporta una reducció important del temps requerit per al tractament de mostra, tot i que en general la purificació de l'extracte és molt pitjor que l'aconseguit emprant SPE convencional. No obstant això, per a l'anàlisi d'un gran nombre d'anàlits de característiques molt diferents (mètodes multi-residu) on no es poden escollir les condicions òptimes per a tots els compostos estudiats, el mètode QuEChERS ofereix resultats acceptables amb l'avantatge d'una major simplicitat i velocitat de processament de mostres.

DETERMINACIÓ

L'anàlisi de fenicols en aliments requereix emprar un mètode de separació que permeti la separació entre els diferents compostos i dels possibles components de la matriu no eliminats en el procés de purificació. A més, en l'anàlisi de compostos regulats i molt especialment en el de compostos prohibits (com ara el CAP) és necessari aportar suficient informació estructural per poder confirmar la presència d'un determinat anàlit en la mostra, la qual cosa es pot aconseguir emprant l'espectrometria de masses. Així, la major part dels mètodes analítics emprats per a la determinació de fenicols en aliments es basen en tècniques cromatogràfiques acoblades a l'espectrometria de masses (Taula 1.4).

Tradicionalment, la cromatografia de gasos ha estat una tècnica de separació molt emprada per a l'anàlisi de CAP i altres fenicols en qualsevol tipus de matriu [Santos i Ramos, 2006; Stolker i Brinkman, 2005]. Això no obstant, la baixa volatilitat dels fenicols obliga a una derivatització prèvia dels anàlits. Aquesta derivatització es realitza principalment per sililació amb *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida i trimetilclorosilà 99:1 o hexametildisilazà, trimetilclorosilà i piridina (3:1:9). Tot i que Shen i Jiang [Shen i Jiang, 2005] van comparar ambdós procediments de derivatització i van observar resultats més ràpids i reproduïbles amb el primer agent derivatitzant, es continuen publicant treballs utilitzant els dos procediments. Pel que fa a les columnes cromatogràfiques, les més emprades són les capil·lars de baix sagnat amb fase estacionària de 5% fenil 95% dimetilpolisiloxà [Azzouz i cols., 2011a; Azzouz i cols., 2011b; Sánchez-Brunete i cols., 2005] o de 5% difenil 95% dimetilpolisiloxà [Gantverg i cols., 2003; Shen i Jiang, 2005]. Pel que fa referència a la detecció, la presència d'àtoms d'halògens en l'estructura dels antibiòtics facilita la seva detecció per captura d'electrons (ECD) i permet aconseguir uns bons límits de detecció, per sota del MRPL [Cerkvenik-Flajs, 2006]. No obstant això, la majoria d'autors prefereixen emprar l'espectrometria de masses, ja que a més d'una gran selectivitat i una bona sensibilitat, permet detectar el metabòlit FFA. Alguns autors utilitzen ionització electrònica, i obtenen un espectre amb l'ió radical del derivat sililat i una sèrie de fragments que proporcionen prou informació estructural com per poder confirmar la presència dels compostos. En general utilitzen quatre ions i monitorització selectiva d'ions (*selected ion monitoring*, SIM) normalment emprant analitzadors quadrupolars [Azzouz i cols., 2011a;

Azzouz i cols., 2011b; Sánchez-Brunete i cols., 2005], encara que degut a l'elevada fragmentació la sensibilitat per al CAP pot no ser suficient [Gantverg i cols., 2003] i es requereix una elevada preconcentració de les mostres per a arribar al MRPL [Azzouz i cols., 2011a; Azzouz i cols., 2011b]. Altres autors utilitzen ionització química negativa i l'espectre resultant presenta un ió radical molt més abundant i menys fragmentació. Aquest fet unit al característic clúster isotòpic dels antibiòtics nadius degut a la presència de dos àtoms de clor fa que la sensibilitat augmenti entre un i dos ordres de magnitud [Shen i Jiang, 2005], per la qual cosa aquest és el mètode més recomanable per a la determinació de fenicols en aliments per GC-MS [Shen i cols., 2009; Rejtharova i Rejthar, 2009; Liu i cols., 2010; Shen i Jiang, 2005].

Els mètodes per cromatografia de gasos presenten l'inconvenient de necessitar una derivatització per a l'anàlisi de compostos poc volàtils. Les derivatitzacions requereixen reaccions químiques d'estequiometria coneguda i fixa, ràpides i d'elevat rendiment i que no donin lloc a subproductes indesitjats. Tot i que és possible aconseguir aquests requeriments, la cromatografia de líquids de fase invertida és una alternativa que permet evitar l'etapa de derivatització i analitzar els compostos directament, la qual cosa simplifica molt el tractament de mostra. A més, a partir del desenvolupament de la font d'ionització d'electrosprai, l'acoblament entre la cromatografia de líquids i l'espectrometria de masses es va popularitzar i ha permès una gran millora en sensibilitat, selectivitat i simplicitat dels mètodes. És per aquesta raó que la major part dels mètodes confirmatoris utilitzats per a l'anàlisi de fenicols en aliments es basen en l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses. La majoria d'autors proposa columnes convencionals amb fases estacionàries de tipus octadecil per a l'anàlisi de CAP, TAP i FF, donada la relativament baixa polaritat dels antibiòtics nadius (Taula 1.4). L'ús d'aquestes columnes amb fases mòbils compostes per una mescla d'acetonitril o metanol i aigua o dissolucions amortidores d'acetat o format d'amoni permeten una bona separació dels compostos. No obstant això, en l'anàlisi conjunta dels antibiòtics nadius i el metabòlit FFA, les columnes de fase invertida presenten una baixa retenció de la FFA, la qual cosa comporta que la matriu interfereixi en la determinació d'aquest compost [Turnipseed i cols., 2003]. Tot i així, alguns autors han proposat mètodes per a la determinació de fenicols incloent la FFA amb columnes octadecil

[Zhang i cols., 2008; Tittlemier i cols., 2007; Van de Riet i cols., 2007; Shi i cols., 2012; Tao i cols., 2014], octil [Luo i cols., 2010] o fenil [Smith i cols., 2009], encara que és difícil saber si la retenció de la FFA en aquests mètodes és com a mínim dues vegades el temps mort, condició que requereix el reglament 657/2002/EC. Pel que fa a l'acoblament a l'espectrometria de masses, la font d'electrosprai (ESI), en mode positiu per a la FFA i negatiu per a CAP, TAP i FF, és amb molta diferència la més emprada atesa la relativa polaritat dels compostos. Els ions observats corresponen sempre a l'espècie desprotonada $[M-H]^-$ per als antibiòtics nadius i a la protonada $[M+H]^+$ per al metabòlit FFA. Això implica que quan s'analitza conjuntament tota la família sigui necessari realitzar un canvi de polaritat a meitat del cromatograma. Altres fonts d'ionització a pressió atmosfèrica també han estat utilitzades en l'anàlisi de fenicols, però de manera molt minoritària. Així, Gantverg i cols. [Gantverg i cols., 2003] van emprar la ionització química a pressió atmosfèrica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*, APCI) per a l'anàlisi de CAP en carns, aconseguint una molt bona sensibilitat per al CAP (límit de detecció de $0,02 \text{ ng g}^{-1}$), i Takino i cols. [Takino i cols., 2003], en comparar aquesta font amb la fotoionització a pressió atmosfèrica (*Atmospheric Pressure Photoionization*, APPI) emprant acetona com a dopant per a la determinació de CAP en peix, van observar que amb l'APPI l'efecte de la matriu en la ionització era despreciable, de manera que es guanyava molta sensibilitat i selectivitat independentment de la matriu, i es podia realitzar la quantificació per calibratge extern. En general la majoria d'autors recorren a l'espectrometria de masses en tàndem (MS/MS) amb analitzadors de triple quadrupol o amb fragmentació en etapes successives (MS^2) en analitzadors de trampa d'ions (IT), [Gallo i cols., 2005; Impens i cols., 2003; Vinci i cols., 2005; Turnipseed i cols., 2003; Smith i cols., 2009], i per tal d'aconseguir la màxima sensibilitat i selectivitat s'utilitza l'adquisició de dades en mode de monitorització de múltiples reaccions (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) quan s'empren analitzadors de triple quadrupol (QqQ) (Taula 1.4). L'espectrometria de masses d'alta resolució (*High Resolution Mass Spectrometry*, HRMS) també s'ha utilitzat per a l'anàlisi de fenicols en mètodes multi-residu, ja sigui emprant analitzadors de temps de vol (TOF) [Peters i cols., 2009], orbitrap [De Dominicis i cols., 2012; Gómez-Pérez i cols., 2012] o híbrids quadrupol-temps de vol (Q-TOF) [Turnipseed i cols., 2012; Turnipseed i cols., 2014]. Aquests mètodes presenten l'avantatge

d'aconseguir amb un *full-scan* en alta resolució una selectivitat equivalent al MRM sense necessitat de monitorar tantes transicions.

A part de les tècniques cromatogràfiques convencionals, també s'han utilitzat altres tècniques de separació. Per exemple, l'electroforesi capil·lar, tècnica basada en la diferència de les mobilitats dels ions en un capil·lar quan s'aplica una diferència de potencial entre l'entrada i la sortida del mateix, ha estat proposada per alguns autors. No obstant això, i atesos els baixos límits de detecció requerits especialment per al CAP, aquesta tècnica no s'ha aplicat gaire a l'anàlisi de fenicols. Com exemples es poden citar els treballs de Santos i cols. [Santos i cols., 2007], que van proposar un mètode de d'electroforesi capil·lar de zona (CZE) amb detecció UV per a la determinació de CAP i cinc antibiòtics més en llet emprant dihidrogenfosfat de potassi i tetraborat de sodi (pH 8) com a tampó de separació, i de Kowalski [Kowalski, 2007], que proposà un mètode CZE-UV emprant el mateix tipus de tampó per determinar TAP en sèrum de gall d'indi. El mateix autor [Kowalski i cols., 2008] també va desenvolupar un mètode per a l'anàlisi de CAP, TAP i FF per cromatografia electrocinètica micel·lar (MEKC) amb detecció UV emprant dodecilsulfat de sodi com a surfactant i tetraborat de sodi com a tampó de separació. Aquesta tècnica també va ser proposada per Springer i Lista [Springer i Lista, 2012] per a l'anàlisi de CAP i FF i dos antibiòtics més en llet, encara que en aquest cas l'electròlit de suport contenia nanotubs de carboni a més de tampó (tetraborat de sodi) i surfactant (dodecilsulfat de sodi), metodologia que es coneix amb el nom de *micellar nanoparticle dispersed electrokinetic chromatography* (MiNDEKC). D'aquesta manera els autors aconseguen millorar sensiblement la resolució sense necessitat d'incrementar els temps de migració.

1.2. AMINOGLICÒSIDS.

Els aminoglicòsids (AGs) són una família d'antibiòtics d'efecte bactericida actius contra bacteris aeròbics grampositius i estafilococs. Els aminoglicòsids més comuns i les seves propietats es recullen a la Taula 1.5 i a la Figura 1.1 es mostren les seves estructures. El primer aminoglicòsid introduït en el tractament de malalties humanes i animals va ser l'estreptomina els anys 1940, i va suposar un gran avenç per al tractament de la

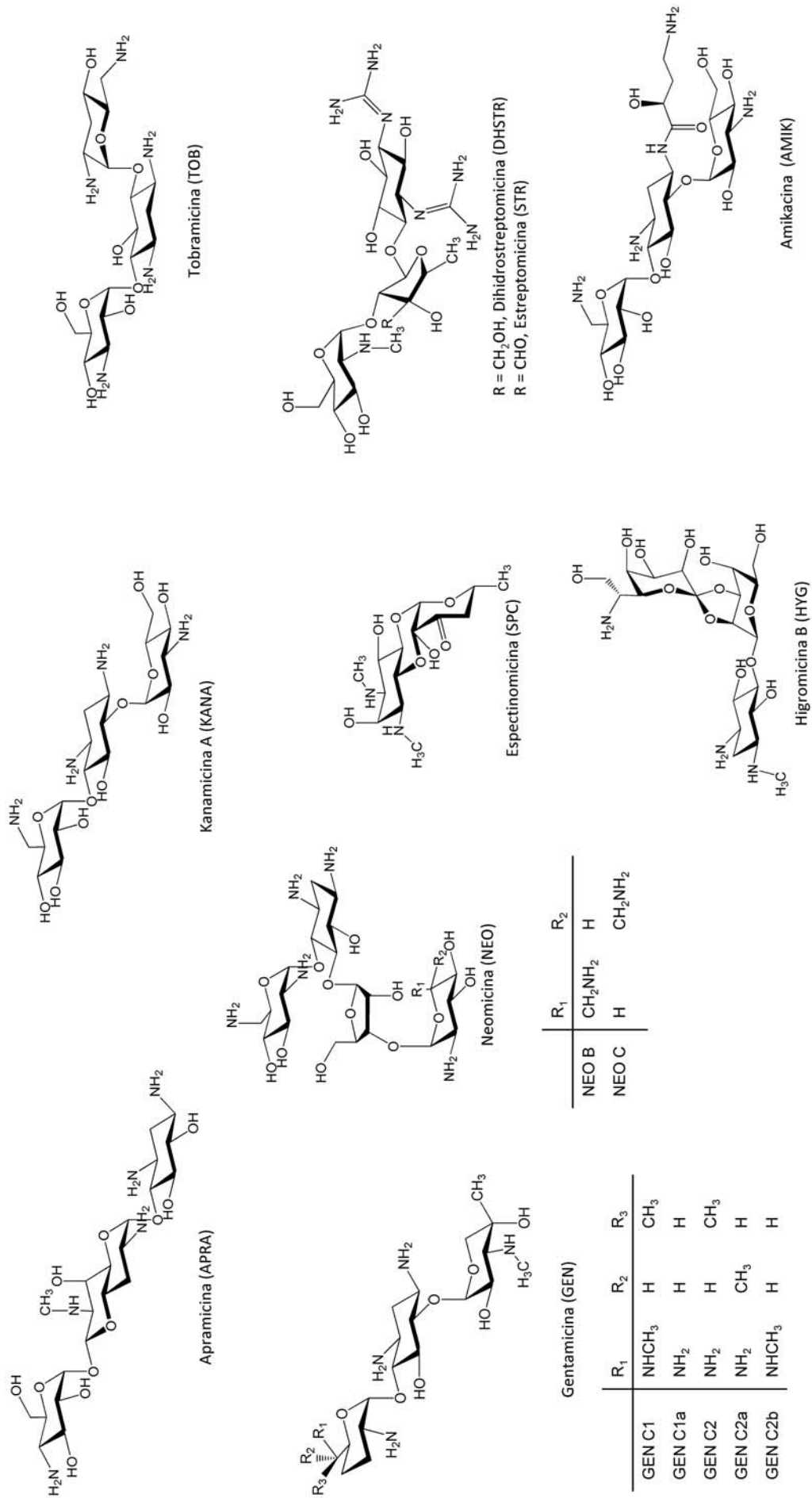


Figura 1.1. Estructures dels antibiòtics de la família dels aminoglicòsids.

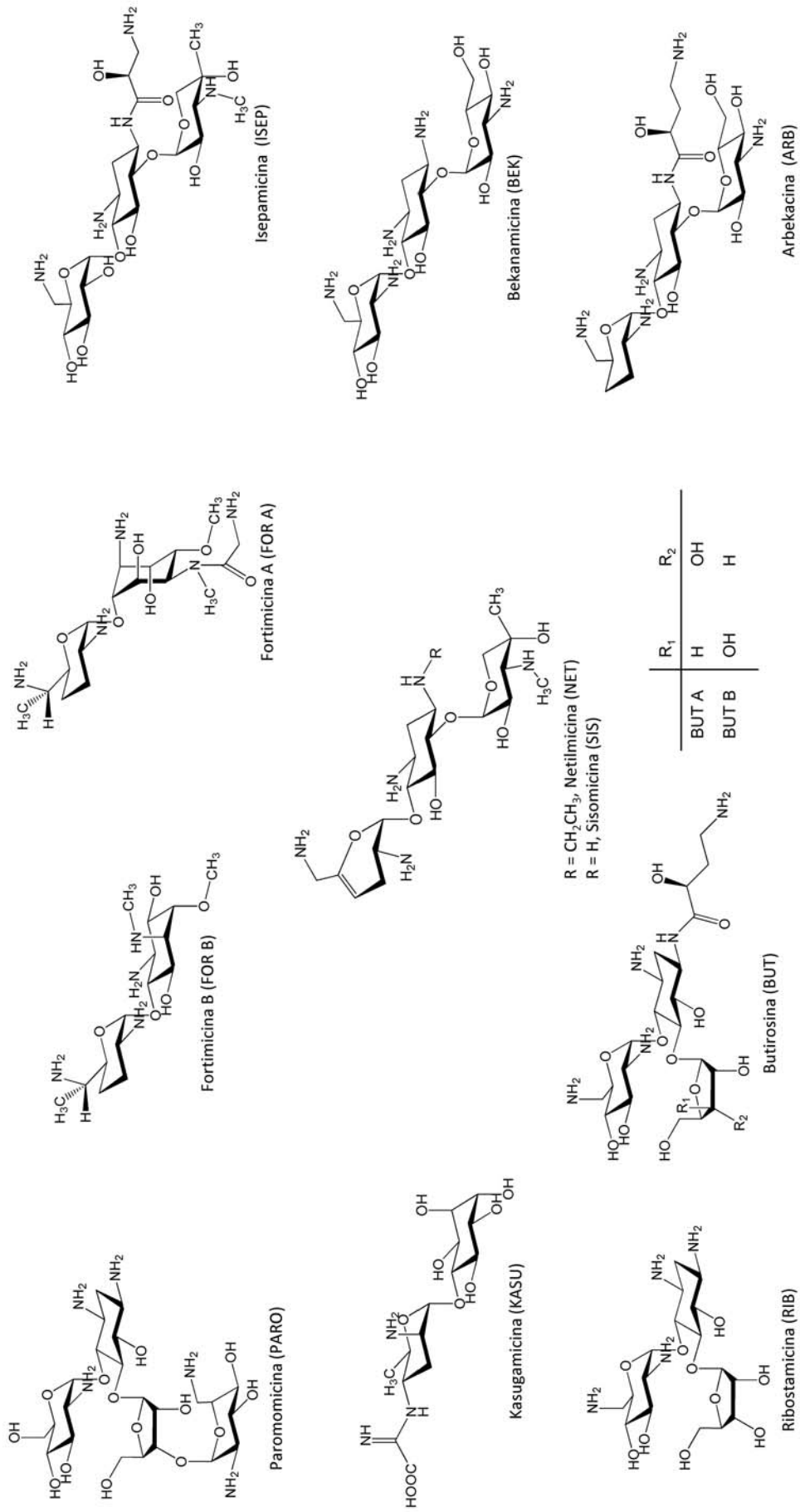


Figura 1.1. (cont.) Estructures dels antibiòtics de la família dels aminoglicòsids.

tuberculosi, que en aquell moment representava un greu perill per a la salut de la població humana [Odell, 2012]. Posteriorment es van descobrir altres aminoglicòsids com ara la gentamicina o la neomicina, les quals han estat àmpliament emprades en medicina humana i veterinària. Químicament, els aminoglicòsids estan formats per unitats d'aminosucre unides per enllaços glicosídics a un aminociclitol i es poden classificar en diferents grups depenent de la identitat d'aquest aminociclitol (Figura 1.2):

- Derivats de l'estreptidina: estreptomomicina (STR) i dihidroestreptomomicina (DHSTR)
- Derivats de l'estreptamina: espectinomomicina (SPC)
- Derivats de la desoxistreptamina 4,5-disubstituïda: neomicina (NEO), paromomicina (PARO), butirosina (BUT) i ribostamicina (RIB)
- Derivats de la desoxistreptamina 4,6-disubstituïda: gentamicines (GEN), kanamicina (KAN), amikacina (AMIK), tobramicina (TOB), arbekacina (ARB), bekanamicina (BEK), isepamicina (ISEP), netilmicina (NET) i sisomicina (SIS)
- Altres: apramicina (APRA), fortimicina (FOR), higromicina (HYG) i kasugamicina (KAS)

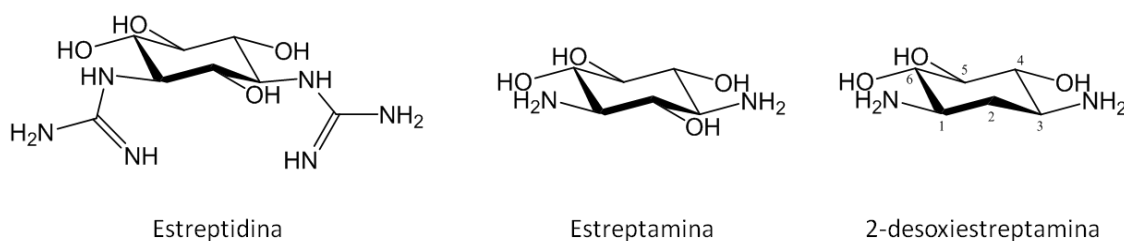


Figura 1.2. Aminociclitolos dels quals deriven els aminoglicòsids.

La majoria d'aminoglicòsids s'obtenen de fermentos de diferents espècies de bacteris dels gèneres *Streptomyces* o *Micromonospora*. El sufix del nom en anglès de cada aminoglicòsid marca a quin gènere pertany originalment, sent “-mycin” per aquells obtinguts de soques de *Streptomyces* o “-micin” per als provinents de *Micromonospora*. Tot i que avui dia existeixen mètodes per sintetitzar la majoria d'aminoglicòsids, l'obtenció mitjançant el procés de fermentació continua essent econòmicament més rendible. Això fa que alguns d'aquests

Taula 1.5. Antibiótics de la família dels aminoglicòsids. Propietats físico-químiques.

Compost	Fórmula molecular	Nom IUPAC	Nº CAS	log K _{o/w} ^a	pK _a ^a
Amikacina (AMIK)	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃	O-3-amino-3-desoxi-α-D-glucopiranosil-(1→6)-O-[6-amino-6-desoxi-α-D-glucopiranosil-(1→4)]-N1-[(2S)-4-amino-2-hidroxi-1-oxobutyl]-2-desoxi-D-streptamina	37517-28-5	-5,262 ± 0,912	8,4 [Fujita i cols., 2011] 9,52 ± 0,29 (amina)
Apramicina (APRA)	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃	O-4-amino-4-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→8)-O-(8R)-2-amino-2,3,7-trideoxy-7-(methylamino)-D-glycero-α-D-allo-octodialdo-1,5,8,4-dipyransyl-(1→4)-2-deoxy-D-streptamina	37321-09-8	-8,12 [Grabowski i cols., 2010]	9,48 ± 0,70 (amina)
Arbekacina (ARB)	C ₂₂ H ₄₄ N ₆ O ₁₀	O-3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-O-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetraideoxy-α-D-erythro-hexopyranosyl-(1→4)]-N1-[(2S)-4-amino-2-hydroxy-1-oxobutyl]-2-deoxy-D-streptamine	51025-85-5	-4,230 ± 0,890	9,52 ± 0,29 (amina)
Beknamicina (BEK)	C ₁₈ H ₃₇ N ₅ O ₁₀	O-3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-O-[2,6-diamino-2,6-dideoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)]-2-deoxy-D-streptamina	4696-76-8	-4,015 ± 0,885	6,34 ± 0,03 [Kaul i cols., 2007] 9,52 ± 0,29 (amina)
Butirosin A (BUT)	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₁₂	O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-[β-D-xylofuranosyl-(1→5)]-N1-[(2S)-4-amino-2-hydroxy-1-oxobutyl]-2-deoxy-D-streptamina	34291-02-6	-4,484 ± 0,870	9,52 ± 0,29 (amina)
Dihidrostreptomícina (DHSTR)	C ₂₁ H ₄₁ N ₇ O ₁₂	O-2-deoxy-2-(methylamino)-α-L-glucopyranosyl-(1→2)-O-5-deoxy-3-C-(hydroxymethyl)-α-L-lyxofuranosyl-(1→4)-N1,N3-bis(aminoiminomethyl)-D-streptamina	128-46-1	-9,05 [Grabowski i cols., 2010]	13,40 ± 0,70 (guanidina)
Espectinomicina (SPC)	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇	(2R,4aR,5aR,6S,7S,8R,9S,9aR,10aS)-decahydro-4a,7,9-trihydroxy-2-methyl-6,8-bis(methylamino)-4H-Pyrano[2,3-b][1,4]benzodioxin-4-one	1695-77-8	-2,30 [Grabowski i cols., 2010]	8,56 ± 0,70 (amina)
Estreptomícina (STR)	C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂	O-2-deoxy-2-(methylamino)-α-L-glucopyranosyl-(1→2)-O-5-deoxy-3-C-formyl-α-L-lyxofuranosyl-(1→4)-N1,N3-bis(aminoiminomethyl)-D-streptamina	57-92-1	-9,07 [Grabowski i cols., 2010]	13,40 ± 0,70 (guanidina)

Fortimicina A (FOR)	C ₁₇ H ₃₅ N ₅ O ₆	4-amino-1-[(2-aminoacetyl)methylamino]-1,4-dideoxy-3-O-(2,6-diamino-2,3,4,6,7-pentadeoxy-β-L-lyxohexopyranosyl)-6-O-methyl-L-chiro-inositol	55779-06-1	-2,208 ± 0,757	9,99 ± 0,29 (amina)
Gentamicina C1a (GENC1a)	C ₁₉ H ₃₉ N ₅ O ₇	O-3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-β-L-arabinopyranosyl-(1→6)-O-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetradeoxy-α-D-erythro-hexopyranosyl-(1→4)]-2-deoxy-D-streptamina	26098-04-4	-2,36 [Grabowski i cols., 2010]	9,52 ± 0,29 (amina)
Higromicina B (HYG)	C ₂₀ H ₃₇ N ₃ O ₁₃	O-6-amino-6-deoxy-L-glycero-D-galacto-heptopyranosylidene-(1→2-3)-O-β-D-talopyranosyl-(1→5)-2-deoxy-N3-methyl-D-streptamina	31282-04-9	-3,827 ± 0,890	6,92 [Gaggelli i cols., 2010] 9,50 ± 0,70 (amina)
Isepamicina (ISEP)	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₂	O-6-amino-6-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-[3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-β-L-arabinopyranosyl-(1→6)]-N1-[(2S)-3-amino-2-hydroxy-1-oxopropyl]-2-deoxy-D-streptamina	58152-03-7	-4,679 ± 0,861	8,3 [Fujita i cols., 2011] 9,52 ± 0,29 (amina)
Kanamicina A (KANA)	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁	O-3-amino-3-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→6)-O-[6-amino-6-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)]-2-deoxy-D-streptamina	59-01-8	-4,604 ± 0,869	9,52 ± 0,29 (amina)
Kasugamicina (KAS)	C ₁₄ H ₂₅ N ₃ O ₉	3-O-[2-amino-4-[(carboxyiminomethyl)amino]-2,3,4,6-tetradeoxy-α-D-arabino-hexopyranosyl]-D-chiro-inositol	6980-18-3	-2,832 ± 0,665	-0,62 ± 0,41 (carboxilat) 11,57 ± 0,50 (amina)
Neomicina B (NEO B)	C ₂₃ H ₄₆ N ₆ O ₁₃	O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-β-L-idopyranosyl-(1→3)-O-β-D-ribofuranosyl-(1→5)-O-[2,6-diamino-2,6-dideoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)]-2-deoxy-D-streptamina	119-04-0	-9,41 [Grabowski i cols., 2010]	6,16 ± 0,03 [Kaul i cols., 2007] 9,52 ± 0,29 (amina)
Netilmicina (NET)	C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₇	O-3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)-β-L-arabinopyranosyl-(1→6)-O-[2,6-diamino-2,3,4,6-tetradeoxy-α-D-glycero-hex-4-enopyranosyl-(1→4)]-2-deoxy-N1-ethyl-D-streptamina	56391-56-1	-1,840 ± 0,784	10,84 ± 0,29 (amina)
Paromomicina (PARO)	C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O ₁₄	O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-β-L-idopyranosyl-(1→3)-O-β-D-ribofuranosyl-(1→5)-O-[2-amino-2-deoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)]-2-deoxy-D-streptamina	7542-37-2	-9,29 [Grabowski i cols., 2010]	6,50 ± 0,03 [Barbieri i Plich, 2006] 9,52 ± 0,29 (amina)
Ribostamicina (RIB)	C ₁₇ H ₃₄ N ₄ O ₁₀	O-2,6-diamino-2,6-dideoxy-α-D-glucopyranosyl-(1→4)-O-[β-D-ribofuranosyl-(1→5)]-2-deoxy-D-streptamina	25546-65-0	-3,948 ± 0,857	9,52 ± 0,29 (amina)

Sisomicina (SIS)	$C_{19}H_{37}N_5O_7$	<i>O</i> -3-deoxy-4-C-methyl-3-(methylamino)- β -L-arabinopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- <i>O</i> -[2,6-diamino-2,3,4,6-tetra-deoxy- α -D-glycero-hex-4-enopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-deoxy-D-streptamina	32385-11-8	-3,325 \pm 0,760	10,84 \pm 0,29 (amina)
Tobramicina (TOB)	$C_{18}H_{37}N_5O_9$	<i>O</i> -3-amino-3-deoxy- α -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)- <i>O</i> -[2,6-diamino-2,3,6-trideoxy- α -D-ribo-hexopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-2-deoxy-D-streptamine	32986-56-4	-4,224 \pm 0,848	9,52 \pm 0,29 (bàsic)

^a Valors estimats amb ACD/Labs v11.02, excepte en els casos indicats.

antibacterians, com ara la GEN, siguin en realitat una barreja de compostos molt semblants (Figura 1.1). Altres aminoglicòsids com ara l'AMIK són derivats semisintètics, que s'obtenen amb la finalitat de millorar les seves propietats i fer-los actius contra soques resistents.

El mecanisme d'acció dels aminoglicòsids es basa en el seu enllaç a la subunitat ribosomal 30S, la qual cosa produeix la interrupció de la síntesi de proteïnes del bacteri i provoca la mort. Ara bé, per tal de poder actuar cal que l'aminoglicòsid penetri dins la membrana cel·lular del bacteri i això fa que moltes vegades els aminoglicòsids s'administrin conjuntament amb altres antibacterians que actuen sobre la membrana cel·lular, com per exemple les beta-lactames (penicil·lines), produint-se així un efecte sinèrgic entre els dos tipus d'antibiòtics [Winstanley i Hastings, 1989]. No obstant això, les diferents característiques fisicoquímiques dels aminoglicòsids i les beta-lactames fan que les dues famílies siguin incompatibles i, per tant, la seva administració s'ha de fer per separat.

La utilització dels aminoglicòsids en medicina, tant humana com veterinària, va ser molt estesa durant els anys 70 i 80, però posteriorment el seu ús es va restringir degut als efectes nocius que presenten sobre l'oïda i especialment els ronyons i al descobriment d'altres antibiòtics com les beta-lactames de quarta generació i les cefalosporines, amb menys efectes secundaris i un espectre més ampli d'activitat [Drusano i cols., 2007]. Això no obstant, recentment s'està reconsiderant la seva utilització en medicina humana per al tractament de malalties nosocomials ocasionades per patògens gramnegatius multi-resistents, com ara *Pseudomonas aeruginosa* o *Acinetobacter spp.* [Pagkalis i cols., 2011]. En medicina veterinària, els aminoglicòsids són emprats en el tractament oral de malalties del tracte gastrointestinal en ruminants, porcs i aus, en el tractament tòpic de malalties causades per enterobacteris i per al tractament per via parenteral de sèpsia, mastitis (inflamació de les glàndules mamàries), pneumònia i altres malalties causades per soques resistents, especialment d'estafilococs. A més, L'STR i la KAS estan permeses en alguns països com ara els Estats Units per al tractament de malalties causades per fongs en fruiters i hortalisses [Worthington, 1988]. En conseqüència, els aminoglicòsids, en tenir una gran varietat d'usos, es poden trobar com a residus en una gran varietat de matrius, no només d'origen animal.

1.2.1. FARMACOCINÈTICA I TOXICITAT.

Els aminoglicòsids no s'absorbeixen a través del tracte intestinal (menys de 1%), la qual cosa fa poc útil la seva administració oral si no és per al tractament de la inflamació de l'intestí prim (enteritis) provocada per bacteris patògens o per a la desinfecció del tracte intestinal prèvia a intervencions quirúrgiques. Si s'administren per via intravenosa (parenteral), els aminoglicòsids mostren una bona absorció i distribució pels fluids sinovial, pleural, peritoneal, limfàtic i pericardíac [Dowling, 2013b]. No obstant, degut a la seva estructura química (molècules grans i amb grups ionitzats a valors de pH fisiològic), tenen molt poca solubilitat en el teixit lipídic i poca capacitat de penetració a través de les barreres cel·lulars. Un cop a l'organisme, els aminoglicòsids no pateixen biotransformació i s'excreten sense cap modificació a través de l'orina o de la femta [McGlinchey i cols., 2008], de manera que el compost designat com a marcador de l'ús d'aminoglicòsids és el propi antibiòtic natiu.

El temps de vida dels aminoglicòsids en els animals varia segons l'espècie i el teixit, però generalment es troba entre unes poques hores (KAN A per via parenteral) i entre 14 i 28 dies (APRA per via parenteral i oral). En teixits musculars, greix i pell, les acumulacions d'aquests compostos són molt baixes i només són importants en el fetge i els ronyons. De fet, degut a que la seva excreció per via renal és relativament lenta i que el procés de filtració és ràpid, l'acumulació d'aquests antibacterians en el teixit renal és molt important. Això comporta que els residus d'aquests antibiòtics en els ronyons poden persistir durant força temps (per sobre d'un mes després del tractament en alguns casos). La nefrotoxicitat dels aminoglicòsids sembla estar lligada al transport i acumulació d'aquests compostos en els lisosomes i altres orgànuls de les cèl·lules epitelials dels túbuls renals [López-Novoa i cols., 2011], i és diferent pels compostos de la pròpia família, essent molt gran per a la NEO, més baixa per a la TOB i inexistent per l'SPC. A més, molts aminoglicòsids, i especialment la DHSTR, poden afectar al teixit auditiu (ototoxicitat) [Torres-Ruiz i cols., 2011]. Les conseqüències de l'acumulació en els teixits de l'oïda interna pot afectar tant a la funció auditiva com a l'equilibri dels animals tractats.

Degut als efectes secundaris en els diferents teixits, la concentració en sang dels aminoglicòsids ha de ser estrictament vigilada durant el tractament per tal d'evitar danys en

els òrgans compromesos. Donat que l'efecte bactericida dels aminoglicòsids és directament dependent de la concentració, des d'un punt de vista d'efectivitat és més adient administrar aquests antibacterians en elevades dosis inicials i posteriorment en repetides dosis per a mantenir la concentració en sang per sobre del nivell terapèutic [Dowling, 2013b]. Tot i així, per tal d'evitar la sobreacumulació dels antibiòtics en els teixits afectats, és més recomanable una dosi diària elevada en comptes de en repetides dosis durant el dia. Finalment, i a diferència del que passa amb els fenicols, cap dels aminoglicòsids ha mostrat efecte mutagènic, teratogènic o carcinogènic fefaent en els estudis realitzats per l'Agència europea d'avaluació de productes medicinals (EMA), la qual cosa comporta que la seva perillositat sigui menor.

Un fet rellevant de la teràpia amb aminoglicòsids és que està subjecta a una resistència adaptativa dels organismes patògens [Barclay i Begg, 2001], és a dir, que després d'una dosi i encara que s'hagi superat el nivell de concentració considerat terapèutic (que afecti als patògens), un cert percentatge dels bacteris que sobreviuen desenvolupen resistència durant un temps. En termes generals, aquesta resistència arriba a nivells màxims unes 16 hores després de l'administració per tornar a poc a poc a les condicions inicials de susceptibilitat passades 40 hores [Dowling, 2013b]. Això també fa que sigui més recomanable emprar dosis diàries elevades enlloc de dosis repetides al llarg del dia, de manera que aquest mecanisme no es vegi afavorit.

1.2.2. LEGISLACIÓ.

Com ja s'ha comentat, els aminoglicòsids presenten una tendència a generar resistència adaptativa que pot ser transferida dels animals als humans. De fet, aquest és un dels motius pel qual es desaconsella el seu ús si no és en casos molt concrets. Tot això unit a la toxicitat que poden arribar a presentar, ha fet que la Unió Europea hagi establert legislació per al control dels residus d'aquests antibacterians en aliments d'origen animal.

L'EMA ha realitzat i recollit nombrosos estudis *in-vitro* i *in-vivo*, tant en animals com en humans, per tal d'avaluar la perillositat dels residus d'aminoglicòsids en els teixits animals, tenint en compte la seva toxicitat i la farmacocinètica. En general, els valors d'ADI s'han

establert també en aquest cas, en base a la sensibilitat dels microorganismes de la flora bacteriana intestinal a aquests antibiòtics, més que no pas a partir de la toxicitat directa (NOEL), ja que el valor obtingut és més restrictiu. Tot i així, i atès que l'STR, la DHSTR i la NEO presenten una toxicitat més alta, el seu ADI es va establir en base a la toxicitat directa observada en estudis amb animals controlats [EMEA, 2007]. Pel que fa als MRLs establerts per als aminoglicòsids (Taula 1.6), l'ús de l'AMIK s'ha aprovat sense establir cap MRL, donat que la seva toxicitat és molt baixa i la seva eliminació és prou ràpida com per no deixar residus apreciables o que representin un valor significatiu en funció de la ingesta (taula 1 de l'annex de la Regulació de la Comissió Europea 37/2010).

De la resta d'antibiòtics de la família, alguns tenen establerts MRL mentre que d'altres, com ara l'HYG, la KAS o la RIB, no han estat considerats per ara. Tal i com s'indica a la Taula 1.6, els marcadors legislats per al control dels residus d'aminoglicòsids són sempre els antibiòtics nadius, ja que com s'ha comentat més amunt no pateixen metabolització apreciable. En el cas de les GEN, i atès que es tracta d'una mescla de compostos molt similars, el marcador emprat és la suma dels components majoritaris de la mescla (GEN C1, C1a, C2 i C2a) mentre que en altres casos, com la NEO i la KAN, s'escull com a marcador el compost més abundant (NEO B i KAN A, respectivament). Els valors de MRL depenen tant del teixit com de l'espècie animal i acostumen a ser molt més elevats en ronyons i fetge atès que, com ja s'ha comentat, es produeix una acumulació dels residus principalment en aquests dos teixits. El valor més baix és per a les GEN en múscul animal ($50 \mu\text{g kg}^{-1}$) i el més elevat és per a l'APRA en ronyó boví ($20.000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Com es pot observar, aquests valors són força elevats en comparació amb altres antimicrobians com ara els fenicols, ja que els aminoglicòsids s'absorbeixen molt malament a través del tracte intestinal. Cal esmentar que l'ús d'APRA en animals productors de llet o en aus productores d'ous no està aprovat [EMEA, 1999b] i que per als altres aminoglicòsids s'han establert valors de MRLs en llet principalment per l'acció inhibidora que poden tenir els seus residus en les soques bacterianes emprades en els productes fermentats com ara iogurt o formatge.

Com ja s'ha comentat anteriorment, l'STR i la KAS també són emprats com a pesticides d'efecte fungicida en cultius de fruiters i hortalisses. No obstant això, aquest ús no està

Taula 1.6. Límits màxims de residu (MRL) per als aminoglicòsids legislats.

Compost	Marcador	Matriu	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Altres provisions
APRA	APRA	Vedella	1.000 (múscul i greix) 10.000 (fetge) 20.000 (ronyó)	No permès en animals dels quals se'n consumeixi la llet
DHSTR	DHSTR	Ruminants, porc i conill	500 (múscul, greix i fetge) 1.000 (ronyó)	
		Ruminants	200 (llet)	
GEN	Suma de les gentamicines C1, C1a, C2 i C2a	Vedella i porc	50 (múscul i greix) 200 (fetge) 750 (ronyó)	
		Vedella	100 (llet)	
KAN	KAN A	Totes les espècies excepte peix	100 (múscul i greix) 150 (llet) 600 (fetge) 2.500 (ronyó)	No permès en animals dels quals se'n consumeixin els ous
NEO	NEO B	Totes les espècies	500 (múscul, greix, fetge i ous) 1.500 (llet) 5.000 (ronyó)	
PARO	PARO	Totes les espècies	500 (múscul) 1.500 (fetge i ronyó)	No permès en animals dels quals se'n consumeixi la llet o els ous
SPC	SPC	Xai	200 (llet) 300 (múscul) 500 (greix) 2.000 (fetge) 5.000 (ronyó)	No permès en animals dels quals se'n consumeixin els ous
		Resta d'animals	200 (llet) 300 (múscul) 500 (greix) 1.000 (fetge) 5.000 (ronyó)	
STR	STR	Ruminants, porc i conill	500 (múscul, greix i fetge) 1.000 (ronyó)	
		Ruminants	200 (llet)	

generalitzat a tot arreu. A Europa, tant la STR com la KAS no estan permeses [2004/129/EC; 2005/303/EC], encara que la KAS s'utilitza en països com Espanya, Grècia o Hongria en aplicacions concretes fins que es trobi un substitut millor [2005/303/EC]. Per tant, d'acord amb el Reglament 396/2005 [EC/396/2005] els residus d'aquests compostos queden subjectes a un MRL per defecte de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la majoria de països de la Unió Europea. A Espanya, on l'ús de la KAS està permès per al tractament de malalties bacterianes i fúngiques en tomàquets, cogombres, mongetes verdes, pomers, perers, xiprers i maduixers, el MRL fixat és de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ per a aquest aminoglicòsid [RD 280/1994]. Als Estats Units, el seu ús com a pesticides està permès i tenen establerts uns MRLs per a la KAS de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ en hortalisses i $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ en pomes [CFR 180.614], mentre que per la STR els MRLs varien des dels 250 fins als $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ en funció de la matriu [CFR 180.245]. A més, s'ha de considerar que de resultes de la seva utilització en plantes en floració, residus d'aquests aminoglicòsids poden acabar també a la mel degut a l'acció pol·litzadora de les abelles. Per aquest motiu, el Laboratori de Referència Comunitari de Fougères (França) recomana aplicar un MRL per a l'estreptomicina en mel de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ per tal d'harmonitzar a nivell europeu els MRL en matrius no descrites oficialment per part de les autoritats [*European Union Reference Laboratory for Antimicrobial and Dye Residues in Food*, 2007].

1.2.3. MÈTODES D'ANÀLISI.

Els aminoglicòsids presenten unes característiques fisicoquímiques (Taula 1.5) molt diferents de la majoria de drogues veterinàries. En primer lloc, i degut a la seva estructura formada per unitats glicosídiques amb un cert nombre de grups amina tant primaris com secundaris, la seva polaritat és molt elevada (valors de $\log K_{O/W}$ inferiors a -2) i generalment es troben en forma catiònica a valors de pH inferiors a 8. A més, no posseeixen grups cromòfors o fluoròfors de manera que la detecció directa d'aquests compostos per mètodes espectrofotomètrics no és possible. Aquests fets units a la gran varietat de matrius, tant d'origen animal com vegetal en les quals aquests compostos podrien estar presents, dificulten molt els mètodes analítics per a la seva determinació.

Un altre factor a tenir en compte en l'anàlisi d'aquest compostos és que, degut a la seva elevada polaritat, els aminoglicòsids tenen una gran afinitat per les superfícies de vidre, de

manera que durant tot el procés analític cal emprar altres materials (com, per exemple, tefló) per evitar pèrdues per adsorció. A la Taula 1.7 es recullen els mètodes proposats a la literatura per a l'anàlisi d'aminoglicòsids en aliments d'origen animal, on s'indica el procediment d'extracció i de purificació (si s'escau), així com el mètode de determinació, les recuperacions i els límits de detecció assolits. A continuació es comenten les característiques més importants.

EXTRACCIÓ I PURIFICACIÓ

En general, l'extracció de drogues veterinàries de matrius d'origen animal o de pesticides de matrius vegetals es porta a terme emprant dissolvents orgànics. Això no obstant, l'elevada polaritat dels aminoglicòsids fa que els dissolvents emprats comunament no siguin adients per a l'extracció d'aquests compostos i es recorre normalment a l'ús de solucions aquoses tamponades. Així, els dissolvents d'extracció més emprats són solucions aquoses de fosfat de sodi o de potassi, com per exemple KH_2PO_4 10 mM, K_2HPO_4 20 mM, o solucions amortidores preparades mesclant les anteriors (*Phosphate Buffer Solution*, PBS). També s'han emprat dissolucions d'acetat d'amoni 10 mM o de citrat de sodi. Això no obstant, els dissolvents orgànics també s'han emprat en el cas de mètodes multi-residu, on es pretén extreure tant els aminoglicòsids com altres antibiòtics de polaritat més baixa. Ara bé, aquests mètodes multi-residu sovint combinen diferents etapes d'extracció, primer amb un solvent orgànic (normalment acetonitril), per tal d'extreure els antibiòtics menys polars, i després amb barreges hidro-orgàniques [Hurtaud-Pessel i cols., 2011], o bé directament amb una barreja hidro-orgànica com ara d'acetonitril i aigua [Martos i cols., 2010], o d'acetonitril i una solució d'àcid tricloroacètic (TCA) al 2% [ChiaoChan i cols., 2010; Bousova i cols., 2013] per tal d'extreure els AGs. Atès que els aminoglicòsids tenen molts grups hidroxil i amina amb parells d'electrons lliures presenten una gran tendència a complexar metalls. Per aquest motiu es recomana addicionar agents complexants, com per exemple l'àcid etilendiamintetraacètic (EDTA), a la solució d'extracció per tal de millorar-ne la recuperació. A més, els aminoglicòsids tenen una certa tendència a adherir-se a les proteïnes, de manera que la major part dels autors afegeixen àcids com ara el TCA a concentracions entre el 2% i el 10% per tal de precipitar les proteïnes i alliberar els compostos adherits. Quan s'analitzen mostres de llet, normalment es realitza directament la precipitació i l'extracció afegint

Taula 1.7. Mètodes d'anàlisi per a aminoglicòsids en mostres d'origen animal.

Anàlit	Matriu	Extracció	Purificació	Recuperació	Separació	Columna	Fase mòbil (LC o GC) / Electròlit de suport (CZE)	Detecció (anàlitzador MS)	Límit de detecció	Cita
AMIK, APRA, DHSTR, GEN, HYG, KANA, NEO, porc SPC, STR, TOB	Ronyó de porc	Extracció amb KH ₂ PO ₄ , TCA, EDTA	Desgreixat amb hexà, SPE (CBX)	87-107%	LC	XTerra MS C18 (100x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient metanol: HFBA 0,1M	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Almeida i cols., 2012
SPC, DHSTR, STR, PARO, KANA, GEN, NEO	Llet	Extracció amb aigua calenta	No	73-91%	LC	Altima HP C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Gradient metanol:aigua amb 1 mM d'HFBA a ambdós	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	2-13 ng g ⁻¹	Bogliatti i cols., 2005
STR, DHSTR, SPC, GEN, NEO, APRA, KANA, PARO, TOB	Vedella, porc, llet	Extracció amb TCA 2%, EDTA 0,1%	SPE (HLB)	94-103%	LC	ZIC-HILIC (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoniitril:acetat d'amoni 200 mM, àcid fòrmic 0,1%	(+)ESI-MS/MS (QTRAP)	No indicat	Bohm i cols., 2013
NEO	Porc	Extracció amb tampó fosfats 10mM pH 7,4:TCA 10% amb EDTA 0,04 mM 1:5	SPE (MCX)	81-95%	LC	Symmetry C18 (150x3,9 mm; 5 µm)	Metanol:aigua 93:7	Fluorescència, derivatització prèvia amb FMOG-Cl	60-160 ng g ⁻¹	Chen i cols., 2010
GEN	Vedella, porc	Extracció amb KH ₂ PO ₄ 10 mM, TCA 2%	SPE (CBA)	> 60%	LC	Nucleosil (10x3 mm; 5 µm)	Acetonitril:NFPA 20 mM 20:80	(+)ESI-MS ² (IT)	0,5-2,5 ng g ⁻¹	Cherlet i cols., 2000
DHSTR	Vedella	Extracció amb KH ₂ PO ₄ 10 mM, TCA 2% Desproteïnitització amb TCA 20%	SPE (CBA) SPE (CBA)	61-86%	LC	Nucleosil (10x3 mm; 5 µm)	Gradient acetoniitril:NFPA 20 mM	(+)ESI-MS ² (IT)	0,5-2,5 ng g ⁻¹ (LOQ)	Cherlet i cols., 2007
STR	Mel	Dilució amb aigua	SPE (HLB) amb parell iònic (HSA)	85%	LC	Gemini C18 (50x2 mm; 5 µm)	Acetonitril:HFBA 5 mM 15:85	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	3 ng g ⁻¹ (CCa)	Granja i cols., 2009
STR, DHSTR	Llet	Extracció amb TCA 30%	SPE (WCX)	56-85%	LC	XTerra MS C18 (50x2,1 mm; 5 µm) Fortis HILIC (100x3 mm; 3 µm)	Gradient acetoniitril:aigua amb 10 mM d'HFBA a ambdós Acetonitril:tampó formiat 150 mM pH 4,5 65:35	(+)ESI-MS (Q)	31-109 ng g ⁻¹ (LOQ) 14 ng g ⁻¹ (LOQ)	Gremilgianni i cols., 2010

STR, DHSTR	Mel	Dilució amb aigua	SPE (HLB) amb parell iònic (HFBA)	86-89%	LC	TSK-GEL ODS (100x2 mm; 3 µm)	Acetonitril:HFBA 5 mM 12:88	(+)ESI-MS (IT)	10 ng g ⁻¹ (LOQ)	Horie i cols., 2005
SPC	Vedella	Extracció amb tampó citrat 0,025 M pH4, TCA 10%, CH ₂ Cl ₂ 10%	SPE (CBA)	80-81%	LC	Zorbax SB-C18 (250x4,6 mm)	Gradient acetonitril:HFBA 0,2%	Fluorescència, derivatització post-columna amb fluoroalèhid	0,1 ng g ⁻¹ (LOQ)	Hornish i Wiest, 1998
SPC, DHSTR, STR, KANA, APRA, GEN, NEO	Vedella, porc	Extracció amb KH ₂ PO ₄ 10 mM, TCA 2%, EDTA 0,4 mM	SPE (GBX)	70-113%	LC	Zorbax SB-C18 (150x2,1 mm)	Metanol:àcid acètic 1% 8:92	(+)APCI-MS/MS (QqQ)	25-100 ng g ⁻¹ (LOQ)	Ishii i cols., 2008
STR, GEN, SPC, DHSTR	Mel	Extracció amb tampó fosfats 10 mM pH 7,4 sintètics)	SPE (MIP)	91-110%	LC	HILIC X-amide (150x4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril:formiat d'amoni 20 mM pH 3 60:40	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	1,8-6 ng g ⁻¹	Ji i cols., 2013
GEN	Preparats	Directe	No	--	CZE	Metanol:tampó bórax 30 mM pH 10,0 + β-ciclodextrina 0,75 mM 15:85	UV, derivatització prèvia amb OPA		100-500 ng mL ⁻¹	Kaale i cols., 2000
TOB	Preparats	Directe	No	--	CZE	Acetonitril:tampó bórax 30 mM pH 10,2 30:70	UV, derivatització prèvia amb OPA		10.000 ng mL ⁻¹ (LOQ)	Kaale i cols., 2002
SPC, STR, DHSTR, AMIK, KAN, PARO, APRA, TOB, SIS, NEO, GEN	Peix, vedella	Extracció amb TCA 5%, EDTA 4 mM	SPE (MCX)	27-93%	LC	Kinetex C18 (150x2,1 mm; 2,6 µm)	Gradient acetonitril:aigua amb 0,13% d'HFBA a ambdós	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	29-73 ng g ⁻¹	Kaufmann i cols., 2011
STR	Ous	Extracció amb acetonitril	Extracció amb acetat d'etil	72%	CZE	NaH ₂ PO ₄ 30 mM, H ₃ BO ₃ 5 mM, Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O 5 mM	UV		120 ng g ⁻¹	Kowalski i cols., 1999
STR, DHSTR, SPC, APRA, PARO, KANA, GEN, NEO	Mel	Dilució amb aigua	SPE (Accell Plus CM)	68-112%	LC	ZIC-HILIC (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient acetonitril, àcid fórmic 0,2%:formiat d'amoni 175 mM pH 4,5	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	20-150 ng g ⁻¹ (LOQ)	Kumar i cols., 2011
APRA, DHSTR, PARO, SPC, STR, KANA, NEO, GEN	Ronyó	Dilució amb aigua Extracció amb acetat d'amoni 10mM, EDTA 0,4 mM, NaCl 1%, TCA 2%	SPE (WCX)	18-117%	LC	ZIC-HILIC (150x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient acetonitril,0,4% d'àcid fórmic:formiat d'amoni 175 mM pH 4,5	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	2-264 ng g ⁻¹	Kumar i cols., 2012

NEO, SPC, DHSTR, STR, AMIK, APRA, GEN, HYG, KANA	Extracció amb acetat d'amoni 10mM, EDTA 0,4 mM, NaCl 1%, TCA 2%	Extracció en pipeta (WCX)	62-115%	LC	BEH C18 (50x2,1 mm; 1,7 µm)	Gradient acetoni:tril:igua amb HFBA 20 mM a ambdós	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Lehotay i cols., 2013
KANA, BEK, PARO, TOB	Extracció amb acetoni:tril	No	92-105%	CZE		Tampó bórax 30 mM pH 9,0	LIF, derivatització prèvia amb 6-carboxifluoresceïna succinimidil èster	14,4-24 nM	Lin i cols., 2008
NEO	Extracció amb HFBA 10%	No	No indicat	LC	Columna capilar reblerta C18; 3 µm	Metanol:HFBA 40 mM 75:25	(+)ESI-MS/HRMS (QTOF)	100 ng mL ⁻¹	Lu i Feng, 2006
TOB	Dilució amb tampó fosfats 20 mM pH 7,4	SPE (CBA)	98-99%	LC	Luna C18 (150x4,6 mm; 5 µm)	Acetoni:tril:Metanol:àcid acètic:igua 420:60:5:515	Fluorescència, derivatització prèvia amb isotiocianat de fluoresceïna	70 ng mL ⁻¹	Mashat i cols., 2008
NEO	Directe	SPE (MCX)	No indicat	LC	ZIC-HILIC (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoni:tril:àcid fòrmic 0,2%, acetat d'amoni 10 mM	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Oertel i cols., 2004a
AMIK, GEN, PARO, NEO, KANA, TOB	Dilució amb àcid fòrmic 9%	SPE (MCX)	100%	LC	ZIC-HILIC (100x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoni:tril:àcid fòrmic 0,2%, acetat d'amoni 2 mM	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	0,18-0,8 ng mL ⁻¹	Oertel i cols., 2004b
APRA, KANB, TOB	Productes de fermentació	Extracció amb HCl	89-92%	LC	XTerra MS C18 (50x2,1 mm; 3,5 µm)	Acetoni:tril:HFBA 10 mM 30:70	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	0,18 ng mL ⁻¹	Park i cols., 2010
STR, DHSTR	Fluid de carn	Extracció amb HClO ₄	80%	LC	Hypersil XDB C18 (150x4,6 mm; 3,5 µm)	Acetoni:tril:pentanosulfonat de sodi 3 mM, NQS 0,4 mM 7:93	Fluorescència, derivatització post-columna amb NQS	100-150 ng mL ⁻¹	Pyun i cols., 2008
PARO	Gall d'indi	Extracció amb KH ₂ PO ₄ 10 mM	50%	LC	Spherisorb ODS-2 C18 (100x2 mm; 3 µm)	Gradient acetoni:tril:NFPA 5 mM	(+)ESI-MS (Q)	100-200 ng g ⁻¹	Róna i cols., 2009
KANB, AMIK, NEO, PARO	Llet	Extracció amb TCA 30%	89-93%	MEKC		Acetoni:tril:tampó bórax 35 mM pH 9,2, SDS 55 mM 20:80	LIF, derivatització post-columna amb sulfoindocianina succinimidil èster	0,5-1,5 ng g ⁻¹	Serrano i Silva, 2006

STR, DHSTR	Llet	Extracció amb àcid oxàlic, TCA i HSA	SPE (C18) amb parell iònic (HSA)	87-95%	LC	Superspher 60 RP (125x3 mm, 4 µm)	Acetonitril:HSA-NQS 0,01 M 12:88	Fluorescència, derivatització post-columna amb NQS	8-12 ng g ⁻¹	Suhren i Knapstein, 1998
AMIK, APRA, DHSTR, GEN, HYG, KANA, KASU, NEO, PARO, RIB, ISO, SPC, STR, TOB	Vedella, pollastre, llet, ous	Extracció amb KH ₂ PO ₄ 10 mM, EDTA 0,4 mM	Desproteïnitzzació amb TCA 5%, desgreixat amb hexà, SPE automàtica (CBA)	71-106%	LC	Capcell PakST (150x2 mm; 3 µm)	Gradient acetonitril:TFA 0,1%	(+ESI-MS/MS (QqQ)	5-10 ng g ⁻¹	Tao i cols., 2012
STR, DHSTR	Llet	Extracció amb HSA 50 mM i tampó fosfats pH 2	SPE (C18) amb parell iònic (HSA)	99-102%	LC	Altima C18 (150x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:NFPA 2 mM	(+ESI-MS/MS (QqQ)	5-10 ng g ⁻¹	Van Bruijnsvoort i cols., 2004
	Mel	Extracció amb àcid sulfosalicilic	Desproteïnitzzació amb HSA	81-84%					1-2 ng g ⁻¹	
KANA	Plasma	Extracció amb acetonitril	No	96%	LC	Eclipse XDB C8 (150x4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril:aigua 30:70	Fluorescència, derivatització prèvia amb FMOC-Cl	10 ng mL ⁻¹	Wang i Peng, 2009
KANA, AMIK, TOB	Llet	Extracció amb TCA 10%	No	81-93%	CZE		tampó acetat 50 mM pH 5, bromur de cetiltrimetilamoni 0,05 mM	LIF, derivatització post-columna amb naftalen-2,3-dicarboxaldehid	7-20 ng mL ⁻¹	Yu i cols., 2009
KANA	Pinso	Extracció amb HCl 0,1%	SPE (MCX)	>98%	LC	Xterra RP-18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril:tampó acetat 50:50	Fluorescència, derivatització prèvia amb OPA	5.000 ng g ⁻¹	Zhou i cols., 2007
TOB, NEO, PARO, GEN, APRA, HYG, KANA, AMIK, STR, DHSTR, SPC, APRA, DHSTR, GEN, KANA, NEO, PARO, SPC, STR, altres drogues veterinàries	Carn	Extracció amb TCA 5%	SPE (HLB, dos cartutxos) amb parell iònic (HFBA)	61-116%	LC	Capcell Pak C18 UG120 (150x2 mm; 5 µm)	Gradient acetonitril:aigua amb 20 mM d'HFBA a ambdós	(+ESI-MS/MS (QqQ)	8-40 ng g ⁻¹	Zhu i cols., 2008
	Mel, llet	Extracció amb TCA 5%, HFBA 0,2 M								
GEN, KANA, NEO, PARO, SPC, STR, altres drogues veterinàries	Carn	Extracció amb tampó fosfats, TCA, EDTA	SPE (CBX)	No indicat	LC	Symmetry C18 (150x3 mm, 5 µm)	Gradient metanol:aigua amb 0,065% HFBA a ambdós	(+ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Berendsen i cols., 2011
STR, DHSTR, SPC, altres drogues veterinàries	Pollastre	PLE (aigua)	No	75-95%	LC	Luna C18 (250x4,6 mm; 5 µm)	Gradient metanol:aigua amb 1 mM d'HFBA a ambdós	(+ESI-MS/MS (QqQ)	1-6 ng g ⁻¹	Berrada i cols., 2010

KANA, NEO, altres drogues veterinàries	Pollastre	Extracció amb acetoni-tril:TCA 2% 45:55	Purificació en línia amb flux turbulent (Cyclone P)	71-120%	LC	Betasil Phenyl-Hexyl (50x2,1 mm; 3 µm)	Gradient acetoni-tril/metanol(1/1):HFBA 1 mM amb 0,5% d'àcid fòrmic a ambdós	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	10-40 ng g ⁻¹	Bousova i cols., 2013
SPC, DHSTR, STR, altres drogues veterinàries	Pollastre	Extracció amb acetoni-tril:TCA 2% 1:1	Desgreixat amb hexà	72-88%	LC	ZIC-HILIC (100x2,1 mm; 3,5 µm)	Gradient acetoni-tril:tampó format 50 mM pH 2,5	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	10-20 ng g ⁻¹	Chiaoehan i cols., 2010
SPC, STR, DHSTR, KANA, PARO, GEN, NEO, APRA, altres drogues veterinàries	Llet	Extracció amb TCA 5%	No	No indicat	LC	Symmetry C18 (150x3,9 mm; 5 µm)	Gradient acetoni-tril:NFPA 0,1%	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	0,2-66 ng g ⁻¹	Gaugain-Juhel i cols., 2009
STR, DHSTR, SPC, NEO, GEN, altres drogues veterinàries	Peix	Extracció amb EDTA 0,1 M, H ₃ PO ₄ 3%, HFBA 0,02 M, TCA 20%; reextracció amb acetoni-tril	SPE (WGX)	101-107%	LC	Luna C18 (50x4,6 mm; 3 µm)	Gradient acetoni-tril:HFBA 0,025%	(+)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Gbylik i cols., 2013
STR, DHSTR, NEO, altres drogues veterinàries	Mel	Dissolució amb tampó fosfats 0,1 M pH 8, extraccions successives amb acetoni-tril, TCA 10%:acetoni-tril 1:2, NFPA en acetoni-tril 0,04%	No	24-297%	LC	Zorbax SB-C18 (50x2,1 mm; 1,8 µm)	Gradient acetoni-tril/metanol(1/1):NFPA 1 mM amb 0,5% àcid fòrmic a ambdós	(+)ESI-MS/MS (QTRAP)	27,1-32,1 ng g ⁻¹	Hammel i cols., 2008
SPC, STR, DHSTR, KANA, PARO, GEN, NEO, APRA, altres drogues veterinàries	Vedella	Extraccions successives amb acetoni-tril i TCA 5% en acetoni-tril:aigua 7.5:0.5	SPE (C18) amb parell iònic (HFBA)	No indicat	LC	Purospher RP18e (125x3 mm; 5 µm)	Gradient acetoni-tril/metanol(1/1):HFBA 1 mM amb 0,5% d'àcid fòrmic a ambdós	(+)ESI-HRMS (IT-Orbitrap)	1-308 ng g ⁻¹	Hurtaud-Pessel i cols., 2011
STR, SPC, NEO, GEN, KANA, AMIK, altres drogues veterinàries	Vedella	Extraccions successives amb acetoni-tril:aigua 86:14 i aigua	Desgreixat amb hexà	No indicat	LC	ZIC-HILIC (50x2,1 mm; 5 µm)	Gradient acetoni-tril:HCOOH 0,4% (dos gradients diferents)	(+/-)ESI-MS/MS (QqQ)	No indicat	Martos i cols., 2010

directament una solució de TCA a concentracions més elevades (5-50%) o d'altres àcids com per exemple l'àcid heptasulfònic (HSA), l'àcid heptafluorobutíric (HFBA) o una barreja d'àcids oxàlic, HSA i TCA. Alguns autors també proposen la dispersió de la matriu en fase sòlida (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD) per a l'anàlisi de matrius líquides com ara la llet, emprant sorra tractada amb EDTA com a dispersant i aigua calenta com a extractant [Bogialli i cols., 2005], o l'extracció amb líquids pressuritzats (*Pressurized Liquid Extraction*, PLE) per exemple, emprant metanol a 80°C i 1.500 psi per a l'anàlisi multi-residu de STR, DHSTR, SPC i tres macròlids en mostres de pollastre [Berrada i cols., 2010].

Pel que fa referència a la purificació, normalment no cal desgreixar els extractes ja que no es fan servir dissolvents orgànics. No obstant això, alguns autors continuen realitzant el desgreixat amb hexà o diclorometà, especialment en mètodes multi-residu on és més recomanable emprar dissolvents orgànics com ara l'acetoneitril per a poder extreure a la vegada els altres compostos menys polars [Martos i cols., 2010; ChiaoChan i cols., 2010]. En general l'etapa de purificació i preconcentració es duu a terme per SPE. Tradicionalment, els rebliments més emprats han estat els de fase invertida (C18 i HLB), tot i que en principi no semblen ser els més adients per als aminoglicòsids donada la seva elevada polaritat. Ara bé, com que els mètodes de cromatografia de líquids més habituals es basen en la formació de parells iònics amb els àcids trifluoroacètic (TFA) o HFBA, aquests ja s'afegeixen en l'etapa d'extracció de manera que la purificació amb SPE es duu a terme per formació de parells iònics. Una altra possibilitat és emprar rebliments de bescanvi catiònic aprofitant la naturalesa catiònica dels aminoglicòsids a pH àcid. No obstant, l'STR i la DHSTR tenen uns valors de pK_a molt elevats (Taula 1.5) degut al grup guanidina present a la seva estructura que fa que es comportin com a bases fortes, mentre que la resta d'aminoglicòsids tenen uns valors de pK_a més baixos i es poden considerar bases febles. Això fa que l'elecció del tipus de rebliment del cartutx de bescanvi catiònic sigui molt dependent dels aminoglicòsids a analitzar. En concret, la majoria d'autors recomanen cartutxos de bescanvi catiònic feble (WCX) per a la preconcentració de l'STR i la DHSTR per tal de facilitar elució d'aquests compostos del cartutx [Gremilogianni i cols., 2010], tant si aquests dos aminoglicòsids s'analitzen sols com si s'analitzen conjuntament amb altres compostos de la mateixa família. En aquest últim cas, és molt important controlar les condicions de pH i força iònica tant de la

solució de càrrega com de la d'elució per tal d'aconseguir recuperacions òptimes per a tots els compostos [Ishii i cols., 2008] a més de no utilitzar un pH massa elevat per a l'elució, ja que els aminoglicòsids es degraden en medis fortament bàsics [Kaufmann i cols., 2012]. Per contra, quan no s'analitzen aquests dos aminoglicòsids s'empren resines de bescanvi catiònic fort (SCX) per tal d'evitar problemes de pèrdues degut a un pH inadequat en l'elució. Això no obstant, alguns autors proposen utilitzar resines de bescanvi catiònic fort en l'anàlisi d'STR i DHSTR, però emprant per a l'elució una dissolució d'elevada força iònica [Kaufmann i cols., 2012] o amb un formador de parells iònics com ara l'àcid pentafluoropropiònic [Cherlet i cols., 2007] per tal d'aconseguir l'elució complerta dels aminoglicòsids més bàsics. A més de rebliments de fase invertida, també s'han emprat MIPs sintetitzats amb l'STR com a plantilla [Ji i cols., 2013] per a l'anàlisi de GEN, STR, DHSTR i SPC, aconseguint, per exemple en mels, recuperacions per sobre del 91%. Per últim, alguns autors opten per obviar l'etapa de purificació i preconcentració i procedeixen a l'anàlisi directa dels extractes obtinguts, ja que és difícil triar una bona estratègia per a aquesta etapa, i com que els nivells legiscats per a la majoria d'aminoglicòsids són força elevats (Taula 1.6) no cal arribar a uns límits de detecció molt baixos.

DETERMINACIÓ

La cromatografia de gasos ha estat poc aplicada a l'anàlisi d'aminoglicòsids degut a la gran complexitat del procés de derivatització que cal realitzar per tal d'augmentar la volatilitat dels compostos, encara que continua sent el mètode de referència a la farmacopea europea per a la SPC [Stead, 2000]. En general, el procés de derivatització es basa en la sililació dels grups hidroxil i amino dels aminoglicòsids, ja sigui amb hexametildisilazà o amb N,O-bis(trimetilsilil)acetamida:1-(trimetilsilil)imidazol: trimetilclorosilà [Stead, 2000]. No obstant, els derivats dels grups amino primaris (molt comuns en els aminoglicòsids) acostumen a ser poc estables i a hidrolitzar-se fàcilment, donant lloc a diferents subproductes de derivatització [Preu i cols., 1998]. Per aquest motiu Mayhew i Gorbach [Mayhew i Gorbach, 1978] van proposar un mètode de derivatització en dues etapes en les quals es procedeix primer a sililar els grups hidroxil amb trimetilsililimidazol i posteriorment es duu a terme l'acilació dels grups amino amb heptafluorobutirilimidazol. D'aquesta manera es pot aprofitar la presència d'halògens en el derivat format per tal de millorar la sensibilitat del

mètode quan s'empra detecció per captura d'electrons (ECD). Amb tot, alguns autors prefereixen la selectivitat de l'espectrometria de masses amb ionització electrònica, ja que els àtoms d'halogen provenen de l'agent derivatitzant i no del propi aminoglicòsid, la qual cosa fa augmentar el risc d'interferències [Preu i cols., 1998].

Per contra, la cromatografia de líquids és amb molta diferència la tècnica de separació més emprada en l'anàlisi d'aquests compostos. En aquest cas, tot i l'elevada polaritat dels anàlits que fa que no es retinguin en columnes de fase invertida, l'ús de cromatografia de bescanvi iònic, cromatografia de fase invertida amb formadors de parells iònics o cromatografia d'interacció hidrofílica (*Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC) permeten l'anàlisi dels aminoglicòsids sense necessitat de derivatitzacions prèvies [Stead, 2000]. A més, l'absència de grups cromòfors en les estructures d'aquests compostos fa que l'espectrometria de masses sigui la tècnica de detecció més adequada per a la seva determinació. Tradicionalment, la cromatografia de líquids de fase invertida amb formadors de parells iònics (IPLC) acoblada a espectrometria de masses ha estat la tècnica més emprada per a l'anàlisi d'aminoglicòsids en mostres alimentàries. D'entre els formadors de parells iònics volàtils més utilitzats destaquen l'àcid heptafluorobutíric (HFBA) i l'àcid nonafluoropentanoic (NFPA). No obstant, l'ús de formadors de parells iònics pot provocar problemes en l'acoblament a l'espectrometria de masses per contaminació del sistema i supressió de la ionització. Per aquest motiu, recentment aquesta tècnica cromatogràfica està sent substituïda per la cromatografia d'interacció hidrofílica, que permet la retenció de compostos polars amb fases mòbils compatibles amb l'espectrometria de masses. Gremilogianni i cols. [Gremilogianni i cols., 2010] van comparar ambdues metodologies per a l'anàlisi de STR i DHSTR en llet i van observar una millora de la sensibilitat en el mètode HILIC respecte del IPLC (amb HFBA) degut a la reducció de la supressió de la ionització provocada pel formador de parell iònic. Tot i aquest avantatge, els mètodes que utilitzen HILIC també presenten alguns inconvenients, com per exemple la seva poca selectivitat davant els aminoglicòsids, atès que la majoria d'ells tenen una estructura molt similar. Això comporta que generalment no s'aconsegueixin separacions a línia de base [Martos i cols., 2010; Oertel i cols., 2004b]. A més, en molts casos cal emprar fases mòbils amb elevades concentracions de solucions amortidores, com per exemple format d'amoni 150 mM [Ishii i cols., 2008;

Gremilogianni i cols., 2010], format d'amoni 175 mM [Kumar i cols., 2011; Kumar i cols., 2012] o acetat d'amoni 200 mM [Bohm i cols., 2013], cosa que també pot produir supressió de la ionització i obturacions de la sonda de l'acoblament a l'espectròmetre de masses. Pel que fa referència a l'espectrometria de masses, i tal i com succeeix amb els fenicols, l'ESI és la font d'ionització més emprada, donada l'elevada polaritat dels aminoglicòsids i la seva facilitat per ionitzar-se en fase líquida. Tot i així, Grahek i Zupancic-Kralj [Grahek i Zupancic-Kralj, 2009] van proposar l'ús de l'APCI per tal de reduir l'efecte de supressió de la ionització provocat per la presència d'àcid trifluoroacètic com a formador de parells iònics en l'anàlisi de GEN en productes de fermentació. Atès que els aminoglicòsids tenen a la seva estructura més d'un grup protonable, generalment s'observa una barreja d'ions protonats $[M+H]^+$ i doblement protonats $[M+2H]^{2+}$ en els seus espectres de masses [Kotretsou, 2004], la qual cosa comporta una divisió del senyal i per tant una pèrdua de sensibilitat. En el cas de la STR i la SPC, s'observa a més un adducte amb aigua molt intens que correspon a la forma hidratada del grup cetona (SPC) o aldehid (STR) [Kotretsou, 2004], que en molts casos arriba a ser el pic base de l'espectre. Respecte a l'adquisició de dades, hom acostuma a treballar en mode MRM quan s'empren analitzadors de triple quadrupol.

A més de l'espectrometria de masses, també s'ha emprat la fluorescència com a tècnica de detecció en l'anàlisi d'aminoglicòsids per cromatografia de líquids, encara que és necessària una derivatització que pot tenir lloc abans o després de la separació cromatogràfica. Quan aquesta derivatització es duu a terme abans de la separació cromatogràfica es pot aprofitar per disminuir la polaritat dels aminoglicòsids i millorar la retenció en una columna cromatogràfica convencional de fase invertida [Chen i cols., 2010; Mashat i cols., 2008; Wang i Peng, 2009; Zhou i cols., 2007]. Així s'aconsegueix també simplificar el muntatge instrumental, ja que la derivatització no es realitza en línia i, per tant, no cal emprar una bomba peristàtica per tal d'afegir el reactiu derivatitzant. A més, la reacció de derivatització es pot realitzar en les condicions més adequades obtenint així millors rendiments i reproductibilitats. Malgrat tot, alguns autors prefereixen realitzar la derivatització post-columna per tal de simplificar el tractament de la mostra i aconseguir que el mètode sigui més ràpid [Hornish i Wiest, 1998; Pyun i cols., 2008; Suhren i Knappstein, 1998]. Com a agents derivatitzants més emprats destaquen l'àcid 1,2-naftoquinona-4-sulfònic (NQS), el

cloroformiat de fluoroenilmetil (FMOC-Cl) i l'*o*-ftalaldehid (OPA) [Stead, 2000], que reaccionen amb les amines primàries dels aminoglicòsids per donar compostos fluorescents.

Per últim, una altra tècnica de separació que ha estat aplicada a l'anàlisi d'aminoglicòsids és l'electroforesi capil·lar, aprofitant la hidrofilitat i les característiques àcid-base d'aquests compostos. Ara bé, l'aplicabilitat dels mètodes basats en separacions electroforètiques es veu afectada per la dificultat de detectar directament els aminoglicòsids mitjançant tècniques espectrofotomètriques. A més, el fet que en electroforesi capil·lar el camí òptic disponible per a la detecció sigui molt menor que en les tècniques cromatogràfiques fa que disminueixi encara més la sensibilitat. Per aquest motiu l'aplicació principal de l'electroforesi capil·lar per a la determinació d'aminoglicòsids és l'anàlisi de formulacions farmacèutiques, on les concentracions d'aquests compostos són elevades i la presència d'impureses és molt menor [Stead, 2000]. Els mètodes desenvolupats empen bàsicament detecció per UV i derivatitzen els aminoglicòsids amb OPA i àcid mercaptoacètic per tal d'augmentar-ne l'absortivitat [Kaale i cols., 2002; Kaale i cols., 2000]. No obstant, si es fan servir electròlits de suport que contenen un tampó de borat es poden formar complexos entre el borat i els grups hidroxil que permet que els aminoglicòsids puguin ser analitzables directament per UV [Flurer, 1995]. Aquesta estratègia també ha estat emprada per Kowalski i cols. [Kowalski i cols., 1999] en l'anàlisi d'STR en ous. A part de la detecció per UV, també s'ha emprat la fluorescència induïda per làser (LIF) per a l'anàlisi d'aminoglicòsids en llet [Yu i cols., 2009; Serrano i Silva, 2006] i plasma [Lin i cols., 2008], realitzant la derivatització amb naftalen-2,3-dicarboxialdehid i mercaptoetanol o bé amb 6-carboxifluoresceïna succinimidil èster i sulfoindocianina succinimidil èster. L'acoblament de l'electroforesi capil·lar a l'espectrometria de masses no s'ha utilitzat per a l'anàlisi d'aquests compostos, però sí s'ha fet servir per estudiar la basicitat dels grups amino de l'AMIK emprant un espectròmetre de masses de ressonància ciclòtrica [Kane i cols., 2001].

CAPÍTOL 2

Cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria
de masses per a l'anàlisi de drogues veterinàries

Com ja s'ha comentat a la introducció, avui dia la cromatografia de líquids és la tècnica de separació més emprada per a la determinació dels compostos estudiats en aquesta tesi. No obstant això, l'elevada polaritat dels aminoglicòsids i d'alguns dels fenicols comporta que presentin una baixa retenció en les fases estacionàries convencionals d'octadecilsilà, raó per la qual la major part dels mètodes proposats a la literatura addicionen formadors de parells iònics a la fase mòbil per a afavorir la seva retenció en columnes de fase invertida. Un dels objectius d'aquesta tesi és aportar noves propostes per a l'anàlisi per cromatografia de líquids dels compostos en estudi. En aquest context, per una banda s'ha avaluat el comportament de fases estacionàries alternatives a les d'octadecilsilà, que permeten afavorir la retenció sense necessitat d'emprar formadors de parells iònics que normalment dificulten l'acoblament a l'espectrometria de masses i, per altra banda, s'han aprofitat els avenços en el desenvolupament de les partícules del rebliment cromatogràfic (partícules sub-2 μm i de nucli sòlid) per tal d'aconseguir millorar tant les eficàcies com les resolucions obtingudes.

Aquest capítol està estructurat de la següent manera: una introducció, una part experimental i la discussió de resultats. En la introducció es comenten els avantatges i els inconvenients de les columnes amb partícules de sub-2 μm i de nucli sòlid, així com de les fases estacionàries alternatives a les d'octadecilsilà, i es discuteix l'aplicabilitat d'aquestes noves columnes cromatogràfiques per a l'anàlisi d'aminoglicòsids i fenicols en aliments d'origen animal. En l'apartat experimental s'inclou el desenvolupament d'un mètode de cromatografia de líquids d'ultraalta eficàcia (UHPLC) per a l'anàlisi de fenicols en matrius alimentàries. També es proposa un nou mètode que utilitza una fase estacionària de mode mixt per a l'anàlisi de 13 aminoglicòsids en matrius càrnies i l'aplicació d'aquest mètode a l'anàlisi dels dos aminoglicòsids emprats com a pesticides i fungicides (KAS i STR) en vegetals. Finalment, es discuteixen els resultats del treball experimental.

2.1. INTRODUCCIÓ.

La gran versatilitat que presenta la cromatografia de líquids ha propiciat que avui dia sigui una de les tècniques de separació més rellevants i sens dubte, la més aplicada. Entre les últimes innovacions relacionades amb les columnes emprades en cromatografia de líquids n'hi ha dues d'essencials. La primera prové de la millora continuada que des de la implantació de la cromatografia de líquids s'ha produït en la fabricació de les partícules de rebliment i que ha portat a disposar avui dia de partícules esfèriques, de petit diàmetre i de mida molt uniforme i amb suports de sílice d'elevada qualitat i puresa. La segona innovació es refereix al desenvolupament de noves fases estacionàries que han permès proporcionar una alternativa a les columnes clàssiques de fase invertida i ampliar el ventall d'aplicacions de la cromatografia de líquids.

Una de les tendències en la història de la cromatografia de líquids des dels seus inicis ha estat la reducció progressiva de la mida de la partícula del rebliment per tal d'aconseguir augmentar l'eficàcia de la separació cromatogràfica. Aquesta reducció comporta una 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. En aquest sentit, s'ha anat passant de partícules d'entre 100 i 200 μm de diàmetre als anys 50 del segle passat a partícules esfèriques de 5 μm als anys 80, d'entre 3 i 3,5 μm als anys 90, i des de principis del segle XXI s'utilitzen partícules de menys de 2 μm de diàmetre (sub-2 μm). La disminució del diàmetre de la partícula del rebliment ha permès augmentar l'eficàcia de les columnes cromatogràfiques i, per tant, la capacitat de fraccionament, degut a una menor amplada de pic cromatogràfic. A més, i atès que el valor òptim de l'alçada de plat teòric (H_{min}) s'assoleix a velocitats lineals de fase mòbil més elevades i que l'efecte de la resistència a la transferència de massa és menor, es pot disminuir el temps d'anàlisi amb el consegüent estalvi en el consum de fase mòbil. Ara bé, la disminució de la mida de la partícula comporta també un considerable increment de la pressió, inversament proporcional al quadrat del diàmetre de partícula segons la llei de Darcy. A més, la contribució a l'eixamplament de banda cromatogràfica deguda a factors extra-columna, com poden ser els volums morts en l'injector i el detector, i la longitud i diàmetre de les connexions, passa a tenir un efecte molt important en

l'eficàcia de la separació. Per aquests motius, els instruments han evolucionat paral·lelament a la disminució del diàmetre de les partícules del rebliment cromatogràfic, desenvolupant-se sistemes UHPLC que permeten suportar pressions de treball per sobre dels 1.000 bar, que tenen volums morts molt petits i que disposen de detectors molt ràpids per tal de poder aconseguir suficients punts d'adquisició per a reconstruir el pic cromatogràfic adequadament. La rapidesa en la detecció és especialment important en l'acoblament a l'espectrometria de masses, ja que l'amplada del pic cromatogràfic limita el tipus d'escombratge i el nombre d'experiments que es poden dur a terme simultàniament.

Una altra opció per a millorar l'eficàcia sense disminuir la mida de partícula és emprar partícules de nucli sòlid. Aquestes partícules contenen 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. D'aquesta manera es disminueix la difusió de l'anàlit en els porus de les partícules de rebliment, i per tant es redueix la resistència a la transferència de massa a la fase mòbil estagnant. Ara bé, tot i que teòricament aquest hauria de ser l'efecte més important en la millora de l'eficàcia, alguns estudis indiquen que les partícules de nucli sòlid presenten una superfície més rugosa que les totalment poroses i així, la resistència a la transferència de massa pot arribar a ser fins i tot més elevada [Fekete i cols., 2009]. No obstant això, hi ha un altre efecte que, segons diversos autors, és un dels més importants en la millora de l'eficàcia en columnes de nucli sòlid, i és la disminució de la difusió aparent deguda essencialment a que les partícules del rebliment són molt més homogènies. Aquesta major homogeneïtat comporta una distribució de mides de partícula molt més estreta i un millor empaquetament [Guiochon i Gritti, 2011] que proporciona unes alçades de plat teòric menors.

Les partícules de nucli sòlid han estat emprades en cromatografia de líquid des dels seus inicis. Per exemple, partícules de 100 μm amb una capa porosa d'aproximadament el 5% del seu diàmetre ja van ser proposades per Horváth i cols. a finals dels anys 60 i han estat freqüentment utilitzades en cromatografia per bescanvi iònic, però no ha estat fins a aquesta última dècada que la tecnologia de fabricació ha avançat suficientment com per poder fabricar partícules de menys de 3 μm de diàmetre amb una àrea superficial suficientment gran (major profunditat de capa porosa) i una distribució de mides prou

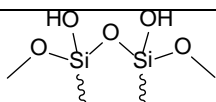
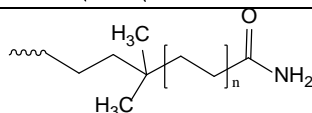
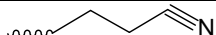
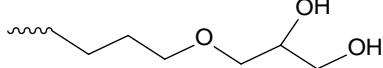
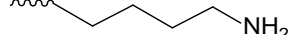
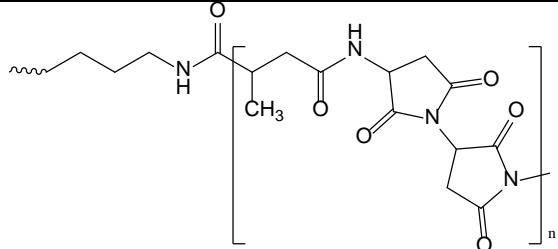
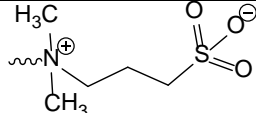
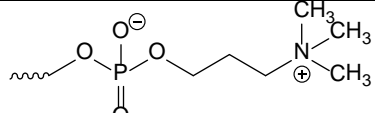
estreta, capaces de competir amb l'eficàcia de les partícules sub-2 μm . L'ús de partícules de nucli sòlid presenta l'avantatge de treballar a unes pressions comparables a les partícules convencionals (totalment poroses) del mateix diàmetre, i, per tant, no requereix d'equips UHPLC que suportin pressions elevades. La tendència a reduir el diàmetre de les partícules ha seguit vigent i de fet aquests últims anys s'han començat a desenvolupar partícules de nucli sòlid de menys de 2 μm de diàmetre, que permeten aconseguir eficàcies molt superiors (uns 500.000 plats/m) a les obtingudes amb partícules sub-2 μm totalment poroses (300.000 plats/m) [Fekete i Guillarme, 2013]. Tot i les grans prestacions que presenten aquestes noves partícules, avui dia la seva aplicabilitat està limitada per la necessitat de disposar d'instruments UHPLC que suportin pressions per sobre dels 1.500 bar [Sánchez i cols., 2015], i en el cas de les columnes de partícula de nucli sòlid més petita (Kinetex de 1,3 μm de Phenomenex), a vegades no es poden arribar a utilitzar en les condicions de cabal òptim degut a la seva baixa permeabilitat [Bobály i cols., 2014]. De totes maneres, ja s'han començat a aplicar en l'anàlisi de pèptids, on es necessiten separacions molt ràpides i de gran eficàcia cromatogràfica [Somella i cols., 2015; Fekete i Guillarme, 2013].

En el camp de la cromatografia de líquids en els últims anys també han tingut lloc avenços relacionats amb el desenvolupament de noves fases estacionàries amb l'objectiu d'ampliar el camp d'aplicació d'aquesta tècnica. En aquest context, un aspecte a destacar és la necessitat d'analitzar compostos d'elevada polaritat, els quals presenten una baixa retenció en les fases invertides convencionals d'octadecilsilà i d'octilsilà. Tot i que en aquests casos es poden utilitzar altres modes de separació, com ara la cromatografia en fase normal o la cromatografia de bescanvi iònic, aquests presenten diversos inconvenients. Per exemple, en cromatografia en fase normal s'utilitzen dissolvents orgànics poc polars, en els quals els anàlits molt polars no són solubles, mentre que en bescanvi iònic s'han d'emprar fases mòbils molt salines que són poc compatibles amb l'espectrometria de masses. En aquest sentit, la cromatografia d'interacció hidrofílica (HILIC) [Alpert, 1990] es presenta com una possible solució per tal de retenir i separar compostos molt polars i iònics emprant fases mòbils similars a les de cromatografia en fase invertida convencional i sense necessitat d'addicionar formadors de parells iònics a la fase mòbil. El mecanisme de retenció HILIC proposat inicialment per

Alpert per columnes de sílice pura es basa en una partició dels anàlits entre la fase mòbil (amb almenys un 2,5% d'aigua i un contingut elevat >60% de modificador orgànic, generalment acetonitril) i una capa superficial d'aigua adsorbida sobre la fase estacionària polar. Ara bé, el mecanisme real és més complex, ja que també hi poden intervenir fenòmens d'adsorció sobre la superfície, interaccions electrostàtiques per bescanvi iònic i dipol-dipol i interaccions per pont d'hidrogen amb el suport de sílice. Tot i que les columnes HILIC han permès l'anàlisi de compostos polars i iònics, amb freqüència les mostres a analitzar són complexes i poden contenir altres compostos polars, no polars, ionitzables, iònics i/o neutres que és desitjable analitzar conjuntament. Amb aquest objectiu, s'han sintetitzat fases estacionàries que poden treballar en mode mixt o multimodal (*mixed-mode chromatography*), és a dir, que permeten treballar simultàniament amb més d'un mode d'interacció. Aquestes columnes contenen cadenes alquíliques amb grups polars i/o iònics, de manera que poden tenir lloc interaccions hidrofòbiques, hidrofíliques o de bescanvi iònic. Les estructures dels grups funcionals més habituals en les columnes HILIC s'indiquen a la Taula 2.1. Com es pot observar en aquesta Taula, avui dia existeix un ampli ventall de grups funcionals de diversos tipus que permeten utilitzar la cromatografia d'interacció hidrofílica per a diferents aplicacions. La contribució de cadascuna de les possibles interaccions que es poden establir en mode HILIC depèn, a més de l'anàlit i del grup funcional, de la fase estacionària i de la composició de la fase mòbil, tant pel que fa al pH, a la força iònica o al percentatge de modificador orgànic, la qual cosa dóna lloc a selectivitats molt diferents [McCalley, 2010]. En general, les fases HILIC amb cadenes funcionalitzades presenten un apantallament parcial dels silanols del suport, fet que fa disminuir la interacció dels anàlits (especialment els catiònics) amb aquests [McCalley, 2010]. Ara bé, la coexistència de diversos tipus de interacció no es dóna tan sols en les columnes de mode mixt i de fet les adsorcions sobre el suport o la interacció per pont d'hidrogen amb la superfície de la sílice del suport dels rebliments cromatogràfics han estat temes freqüentment estudiats en cromatografia. Per exemple, les fases estacionàries de fase invertida poden en certs casos presentar interaccions de tipus HILIC. Així, s'ha descrit que la fase de pentafluorofenilsilà (PFP) presenta per a molècules de baix pes molecular carregades positivament un perfil de retenció en forma d'U, és a dir, que el temps de retenció primer disminueix i després augmenta en augmentar el

percentatge de modificador orgànic a la fase mòbil. Aquest fet implica que a percentatges elevats de modificador orgànic la columna es comporta segons un model de retenció tipus HILIC (la fase aquosa té la major força eluotrópica), mentre que a percentatges baixos de modificador orgànic el comportament és el d'una fase invertida convencional. Aquest comportament es pot explicar si hom considera que a percentatges elevats de modificador orgànic aquest mulla la fase estacionària de manera que les cadenes de pentafluorofenil s'obren i els silanols lliures del suport queden més accessibles, la qual cosa permet que es produeixin interaccions per bescanvi iònic amb anàlits catiónics [Zhang, 2008], mentre que els anàlits neutres o aniónics es comporten sempre seguint un comportament de fase invertida.

Taula 2.1. Fases estacionàries HILIC més habituals.

Fase estacionària	Grup Funcional	Aplicacions
Sílice pura		Compostos polars o iònics de baix pes molecular
Amida		aminoàcids, pèptids
Ciano		
Diol		monosacàrids, surfactants
Amino		aminoàcids, nucleòsids
Polisuccinimida		oligosacàrids
Sulfobetaina		nucleòsids, glicopèptids
Fosforilcolina		aminoàcids, pèptids, complexos metàl·lics

Aquestes noves columnes amb partícules de petit diàmetre i/o superficialment poroses i fases estacionàries no convencionals han estat molt poc utilitzades en l'anàlisi de fenicols i aminoglicòsids. En el cas dels fenicols, la major part de les publicacions que utilitzen columnes sub-2 μm de fase octadecilsilà fan referència a l'establiment de mètodes multi-residu aplicables a un gran nombre de compostos i que, pel que fa als fenicols, només inclouen els membres menys polars de la família [Cronly i cols., 2010; De Dominicis i cols., 2012; Hammel i cols., 2008; Wang i Li, 2009; Gómez-Pérez i cols., 2012; Peters i cols., 2009; Robert i cols., 2013; Zhan i cols., 2013a; Zhan i cols., 2013b]. En relació als aminoglicòsids, i atès que la disponibilitat de columnes sub-2 μm o de partícula parcialment porosa es troba limitada a fases estacionàries principalment d'octadecilsilà, els mètodes que es proposen utilitzen formadors de parells iònics per aconseguir una adequada retenció i separació [Kaufmann i cols., 2011; Lehotay i cols., 2013]. Tot i que també es troben disponibles en el mercat algunes columnes de tipus HILIC sub-2 μm o de partícula de nucli sòlid, aquestes no han estat emprades per a la separació d'aminoglicòsids. Pel que fa referència a la utilització de columnes de diàmetre de partícula convencional (d'entre 3 i 5 μm), la majoria d'estudis descrits a la literatura per a l'anàlisi d'aminoglicòsids (veure apartat 1.2.3) utilitzen cromatografia de líquids de fase invertida amb formadors de parells iònics o HILIC amb columnes funcionalitzades amb zwitterions (ZIC-HILIC). En aquest últim cas, per a l'elució generalment es requereix una concentració molt elevada de sals a la fase mòbil [Bohm i cols., 2013; Ishii i cols., 2008; Kumar i cols., 2011; Kumar i cols., 2012], la qual cosa pot afectar negativament a l'acoblament amb l'espectrometria de masses.

2.2. TREBALL EXPERIMENTAL.

Per tal de poder proposar un mètode LC-MS/MS ràpid i d'elevada eficàcia per a l'anàlisi conjunta dels fenicols i el metabòlit FFA en aliments s'ha avaluat l'aplicabilitat de columnes convencionals i de partícula de nucli sòlid amb diferents fases estacionàries. El treball experimental d'aquest estudi es troba recollit a l'article científic I intitulat "*Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods*" (apartat 2.2.1). D'altra banda, per tal de millorar l'acoblament dels mètodes LC-MS/MS disponibles per a l'anàlisi d'aminoglicòsids en aliments d'origen animal s'ha avaluat l'aplicabilitat de la cromatografia de líquids amb fases estacionàries de mode mixt amb l'objectiu d'obtenir una bona retenció i separació dels compostos, sense necessitat d'emprar formadors de parells iònics o elevades concentracions de solucions amortidores a la fase mòbil. El treball experimental realitzat està inclòs a l'article II intitulat "*Mixed-mode liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of aminoglycosides in meat*" (apartat 2.2.2). Les condicions cromatogràfiques proposades en aquest treball s'han pres com a punt de partida per al desenvolupament d'un mètode per a l'anàlisi de KAS i STR en vegetals. El treball experimental d'aquest estudi es recull en l'article científic III intitulat "*Simultaneous analysis of kasugamycin and streptomycin in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*" (apartat 2.2.3).

2.2.1. ARTICLE CIENTÍFIC I

Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Analyst (2012) **137**, 2486-2494

Cite this: *Analyst*, 2012, **137**, 2486

www.rsc.org/analyst

PAPER

Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of phenicol drugs and florfenicol-amine in foods

Élida Alechaga, Encarnación Moyano* and M. Teresa Galceran

Received 3rd November 2011, Accepted 2nd March 2012

DOI: 10.1039/c2an16052h

A method based on ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) is proposed for the determination of chloramphenicol (CAP), its related compounds, thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF), and the polar metabolite florfenicol-amine (FFA), in animal-derived foods (chicken and pork meat, fish, prawns and honey). For the retention of FFA and its simultaneous analysis with the parent compounds a phenyl-hexyl column is proposed. A fast separation is achieved in less than 2 minutes using a methanol : acetic acid–ammonium acetate buffer (5 mM, pH 5) and gradient elution. Under these conditions, the FFA is retained at more than twice the dead volume, as recommended by the legislation. For the coupling with mass spectrometry, heated-electrospray (H-ESI) is used as ionisation source improving vaporization efficiency. To prevent interferences using selected-reaction monitoring (SRM) both quantitation and confirmation transitions were carefully selected. Two different sample treatments based on solid-phase extraction with mixed-mode cartridges for fish and meat products and hydrophilic-lipophilic-balanced cartridges for honey are proposed, providing limits of quantitation (LOQs) below $\mu\text{g kg}^{-1}$ level.

Introduction

Chloramphenicol (CAP) is a wide-spectrum antibiotic originally isolated from the soil organism *Streptomyces venezuelae*, but now synthetically produced¹ and used in human and veterinary medicine. Nevertheless, since the application of CAP has been associated with many health side-effects,² this compound was banned in both USA and EU in 1994. New synthetic analogues, thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF), were proposed to replace CAP and these are nowadays widely used in veterinary medicine. Moreover, veterinary drugs are administered in modern husbandry, as feed additives or in drinking water, for either therapeutic or prophylactic purposes. The illegal use of prohibited medicines or the disregarding of withdrawal times prior to slaughtering may lead to the presence of low levels of these compounds in edible products of animal origin.³ Since the impact of the residues on human health is considered one of the biggest problems of the 21st century,⁴ maximum residue levels (MRLs) for veterinary residues in foodstuffs of animal origin have been established in many countries. In the European Community,⁵ the MRL for TAP is $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ and for the sum of FF and its metabolites (expressed as florfenicol-amine, FFA) it ranges from 100 to $2500 \mu\text{g kg}^{-1}$, depending on the food matrix. For CAP, no safe level has been established, since its toxic effects are not dose-dependent.⁶ Hence, a minimum required

performance level (MRPL) of $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ has been set⁷ to guarantee the same minimum safety level in official control within the EU.

Several confirmatory methods have been published for determining CAP in food and environmental matrices based on gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)^{8–11} and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).^{9,11–22} There are also various multiresidue methods that include CAP in the set of compounds to be analysed.^{23–27} However, for the simultaneous determination of CAP, the synthetic analogues TAP and FF and the metabolite FFA, only a few methods can be found in the literature.^{28–31} One of the methods²⁸ used GC-MS for the determination of the phenicol drug family in poultry and porcine muscle, but derivatization using bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) was required to improve volatility. Regarding LC-MS, several methods have been published.^{29–31} One used a phenyl column but the low retention of FFA and the lack of specificity of the quantitation transition made quantification of this compound difficult.²⁹ As a consequence, the method was only proposed for the analysis of the three parent drugs. Another method used single MS³⁰ and, as a result, did not meet the requirements of Commission Decision 2002/657/EC³² for the unequivocal confirmation of these compounds in food matrices. The third method used LC-MS/MS to improve selectivity, although the use of a C18 column resulted in very low retention of the FFA and its coelution with matrix components, not complying with the EU legislation that indicates that the minimum acceptable retention time for the analyte under examination must be twice the retention time

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 647, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: encarna.moyano@ub.edu; Fax: +34934021233; Tel: +34934021286

corresponding to the void volume of the column.³² Moreover, both LC-MS methods applied slow gradient elution programs providing long chromatographic analysis times (20–30 minutes). To the best of our knowledge, no fast LC-MS/MS methods for the determination of phenicols in food matrices have been reported.

The aim of this work is the development of an analytical method with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) for the simultaneous determination of CAP, TAP, FF and FFA providing a fast separation of the four phenicols and achieving adequate retention for the polar metabolite FFA. The proposed method was combined to a solid-phase extraction (SPE) procedure for the analysis of these compounds in foodstuffs of animal origin.

Experimental

Reagents and materials

Chloramphenicol (CAP) (98%), thiamphenicol (TAP) (98%), florfenicol (FF) (99%), ammonium acetate (98%) and ammonium formate (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Florfenicol-amine hydrochloride (analytical standard) (FFA) was obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada) and a 100 ng mL⁻¹ solution of deuterated-chloramphenicol (CAP-*d*₅) was purchased from Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Chemical structures for the compounds are shown in Fig. 1. LC/MS grade methanol, acetonitrile and water were obtained from Fluka (Steinheim, Germany) and acetic acid (98–100%), formic acid (98–100%) and aqueous ammonium hydroxide (33%) were provided by Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions (1000 µg g⁻¹ for CAP, TAP and FF and 100 µg g⁻¹ for FFA) were individually prepared by weight in acetonitrile and stored at -20 °C. Intermediate solutions were prepared monthly from stock standard solution by appropriate dilution in methanol. Mobile phases were prepared by mixing 5 mM acetic acid or formic acid solutions with 5 mM ammonium acetate or ammonium formate solutions till the pH was adjusted to the desired value, and were filtered through a 0.22 µm nylon membrane filter purchased from Whatman (Clifton, NJ, USA). Samples were filtered using 0.22 µm nylon membrane centrifuge filters obtained from Millipore (Billerica, MA, USA). Nitrogen (99.8% pure) used for the API source was supplied by the Claind Nitrogen Generator N2 FLO (Lenno, Italy). High-purity argon (ALPHAGAZ 1 Ar) purchased from

Air Liquide (Madrid, Spain) was used as collision-induced dissociation (CID) gas in tandem mass spectrometry experiments. Oasis MCX and HLB cartridges (60 mg, 3 cm³) and extraction manifold were from Waters (Milford, MA, USA); SupelMIP CAP cartridges (25 mg, 10 cm³) were kindly provided by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

UHPLC-MS/MS

UHPLC separation was performed on an Accela liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA), equipped with a quaternary pump, an autosampler and a column oven. An Ascentis Express phenyl-hexyl (100 × 2.1 mm, 2.7 µm) column provided by Sigma-Aldrich was used for the proposed method. Other liquid chromatography columns tested in this study were: Ascentis Express C18 (50 × 2.1 mm, 2.7 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA), Discovery HSF5 (150 × 2.1 mm, 3 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) and Ascentis Express HILIC (100 × 2.1 mm, 2.7 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA). The chromatographic conditions are given in Table 1.

Mass spectrometry was performed in a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) triple quadrupole mass spectrometer equipped with heated-electrospray (H-ESI) as ionisation source. Chromatograms were segmented in two time windows for polarity switching; during the first segment (0–1.45 min), FFA was monitored in positive mode and during the second time window (1.45–5 min), CAP, TAP and FF were acquired in the negative mode. For both positive and negative modes, temperatures of the ion transfer tube and the vaporizer were held at 350 °C and 250 °C, respectively. The sheath gas flow rate was 60 a.u. (arbitrary units) during the first segment and 50 a.u. during the second segment. Auxiliary gas and ion sweep gas flow rates were 10 and 8 a.u., respectively, for both segments. The electrospray voltage was 3.5 kV in positive mode and -3.0 kV when working in negative mode.

In tandem mass spectrometry experiments the collision gas was argon (1.5 mTorr) and the collision energy (CE) ranged from 9 eV to 26 eV. Two transitions were monitored for each compound, using a dwell time of 50 ms (1 scan per cycle time). Transitions for quantitation and confirmation purposes and the corresponding collision energies and ion ratios are listed in Table 2. Other instrument settings were optimized by infusion of standard solutions (5 mg L⁻¹) at a flow rate of 2 µL min⁻¹, using the built-in syringe pump and a zero dead volume T-piece to mix them with the mobile phase.

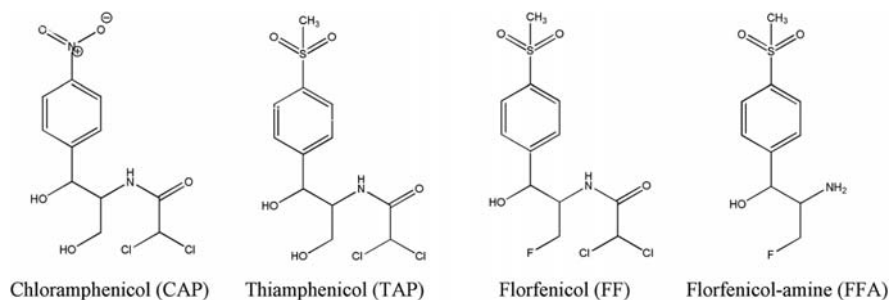


Fig. 1 Chemical structures and acronyms of the studied compounds.

Table 1 Chromatographic conditions for the different columns tested

Stationary phase	C18		HILIC		Pentafluorophenyl-propyl		Phenyl-hexyl	
Column dimension, particle size	50 × 2.1 mm, 2.7 μm		100 × 2.1 mm, 2.7 μm		150 × 2.1 mm, 3 μm		100 × 2.1 mm, 2.7 μm	
Flow-rate (μL min ⁻¹)	500		500		300		500	
Temperature (°C)	45		35		40		40	
Buffer	CH ₃ COOH/ CH ₃ COONH ₄ pH 5.5 5 mM		HCOOH/HCOONH ₄ pH 3.5 5 mM		CH ₃ COOH/ CH ₃ COONH ₄ pH 4.75 5 mM		CH ₃ COOH/ CH ₃ COONH ₄ pH 5.0 5 mM	
Organic modifier	Methanol		Acetonitrile		Methanol		Methanol	
Gradient elution	<i>t</i> (min)	%Organic	<i>t</i> (min)	%Organic	<i>t</i> (min)	%Organic	<i>t</i> (min)	%Organic
	0.0	2	0.0	95	0.0	40	0.0	7
	1.0	2	0.5	95	0.5	40	1.3	100
	2.2	70	3.5	50	2.0	66	2.1	100
	2.4	70	5.0	50	6.0	66		

Sample treatment

Over 30 food samples, including chicken, pork, fish, shrimp and prawns, imported from different countries, were analysed. These samples were cut, ground and homogenised with an Ultraturrax T25 basic (IKA-Werke, Staufen, Germany) and kept frozen at -20 °C until analysis. Subsamples of 2 g were weighed in a 15 mL polypropylene centrifuge tube and extracted in a Sonorex RK100 ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin, Germany) for 5 min with 1 mL of acetonitrile. After being centrifuged at 3500 rpm (Selecta-Macrotronic, J.P. SELECTA S.A., Abrera, Spain) for 5 min, 0.5 mL of the supernatant was transferred to another 15 mL polypropylene tube. Then, the solid residue was re-extracted with 3 mL of 0.1% acetic acid solution and again centrifuged for 5 min at 3500 rpm, before transfer of 2 mL of supernatant to the 15 mL polypropylene tube. The combined extracts were diluted to 14 mL with 0.1% acetic acid solution and loaded onto an Oasis MCX SPE cartridge previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. The cartridge was washed with 2 mL of 0.1% acetic acid solution, air-dried and eluted with 1 mL of methanol-ammonium hydroxide (33%) (95 : 5, v/v).

Four samples of different brands of honey (2 g) were directly diluted with 4 mL of 1% ammonium hydroxide solution, sonicated in the ultrasonic bath for 10 minutes and then centrifuged at 3500 rpm for 5 minutes. A 3 mL aliquot of the supernatant was loaded onto an Oasis HLB SPE cartridge previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of water. The washing step was

performed twice with 2 mL of 1% ammonium hydroxide and the analytes were eluted using 1 mL of methanol.

The SPE fractions collected were evaporated to dryness under nitrogen stream and the extract was reconstituted in 250 μL of methanol-acetic acid/ammonium acetate buffer (5 mM, pH 5) (20 : 80, v/v), fortified at 10 μg kg⁻¹ with the internal standard (CAP-*d*₅) and filtered through a 0.22 μm nylon membrane filter. Finally, 10 μL of the extract were injected into the UHPLC-MS/MS system.

Matrix-matched calibration standards were prepared by spiking blank matrix samples (pork muscle, chicken muscle, shrimps, fish muscle and honey) at 8 concentration levels ranging from 0.1 to 200 μg kg⁻¹. The same levels were used for the calibration standards prepared in the mobile phase. Calibration curves based on peak area ratio (analyte/internal standard) vs. concentration ratio (analyte/internal standard) were plotted for both solvent-based and matrix-matched-based standards.

Results and discussion

Liquid chromatography

Chloramphenicol-related drugs have been traditionally separated using reversed-phase liquid chromatography on C18 columns.^{30,31} In this paper, a C18 column using a methanol : water gradient (from 5% to 70% of methanol in 3 minutes) was tested for the simultaneous analysis of the metabolite FFA and the native compounds CAP, TAP and FF. The native drugs were

Table 2 Tandem mass spectrometry conditions

Compound	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i>	Transition	Collision energy (eV)	Ion assignment	Ion ratio
CAP	321.0	152.0	Quantification	15	[M - H - C ₄ H ₅ NO ₂ Cl ₂] ⁻	1.5
	321.0	257.0	Confirmation	9	[M - H - CHOCl] ⁻	
TAP	354.0	185.0	Quantification	20	[M - H - C ₄ H ₅ NO ₂ Cl ₂] ⁻	1.0
	354.0	290.0	Confirmation	11	[M - H - CHOCl] ⁻	
FF	356.0	336.0	Quantification	10	[M - H - HF] ⁻	1.4
	358.0	338.0	Confirmation	11	[M(³⁷ Cl) - H - HF] ⁻	
FFA	248.1	230.1	Quantification	12	[M + H - H ₂ O] ⁺	2.7
	248.1	130.0	Confirmation	26	[M + H - CH ₂ O ₃ FS] ⁺	
CAP- <i>d</i> ₅ (IS)	326.0	157.1		15	[M - H - C ₄ H ₅ NO ₂ Cl ₂] ⁻	

base-line separated, but under these conditions the FFA provided a broad and/or split peak, since its pK_a value (Table 3) is too close to the pH of the mobile phase. To improve the peak shape for FFA, the effect of the pH was evaluated. For this purpose, different buffered aqueous phases with pH ranging from 3.5 to 9.5 were tested. At pH values close to 9.5 (5 mM ammonia–ammonium formate buffer), FFA remained neutral thus yielding a non-split peak, but then tailing peaks were observed for the whole set of compounds. Decreasing the pH down to 3.5 led to a narrower single peak for FFA, but the retention time was always less than twice the dead time (t_0). As expected, for the native drugs (CAP, TAP and FF) no differences in retention time were observed when pH was modified. As a compromise between the retention time and peak shape for FFA, a methanol : acetic acid–ammonium acetate buffer (5 mM, pH 5.5) mobile phase was chosen. Nonetheless, as can be seen in Fig. 2A, the retention time for FFA was still short ($t_R \approx 2 \times t_0$), for which reason other LC columns were evaluated.

Due to the relatively low $\log K_{ow}$ values of the compounds (Table 3), the use of bare silica hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) was considered, since this chromatographic technique has been proved to be suitable for the separation of polar compounds.^{33,34} Under low HILIC elution strength conditions (70 : 30 acetonitrile : formic acid–ammonium formate 5 mM, pH 3.5 buffer), the protonated amine was retained. Nevertheless, the native drugs (CAP, TAP and FF) eluted in the chromatographic front, even when using 95% of acetonitrile in the mobile phase (Fig. 2B). The effect of the pH of the aqueous phase on separation was also studied, but no differences in the retention of the parent compounds were observed. For this reason, the HILIC column was discarded.

As another alternative, a pentafluorophenylpropyl (PFPP) column was also evaluated and a good separation was obtained using a mobile phase of methanol : acetic acid–ammonium acetate (5 mM, pH 4.75) in gradient elution mode. Under these chromatographic conditions (Fig. 2C), the native drugs were retained due to hydrophobic interactions with the stationary phase, as happened with the C18 column. In contrast, FFA showed a behaviour similar to that observed with the HILIC column, eluting after the parent compounds probably as a result of additional ion-exchange retention mechanisms between the charged amine and the ionised silanols of the silica support. The presence of available ionised silanol groups in the PFPP column can be explained by their low pK_a values, more similar to those of bare silica than to those of C18 columns.³⁵ Although a good separation could be obtained, it was observed that the retention time of FFA was strongly dependent on small variations in

buffer pH and concentration. As an example, Fig. 3 shows the chromatograms obtained using slightly different buffer concentrations, where it can be seen that the retention time of FFA decreased by 7.5% when the buffer concentration increased by only 1.6%. Because of the poor ruggedness of this method, the PFPP column was also discarded for this study.

Finally, a phenyl–hexyl column was evaluated and, as for the other columns, various methanol : aqueous buffer mobile phases with pHs ranging from 3.5 to 5.5 were tested. As happened with the C18 column, the peak shape of the amine compound was affected by the pH and the best peak shape was found when a 5 mM acetic acid–ammonium acetate aqueous buffer (pH 5) was used. Under these conditions, a faster and more efficient separation than that obtained on the other columns was achieved (Fig. 2D), with the FFA eluting far away enough from the elution front ($t_R = 2.28 \times t_0$). For this chromatographic method, retention time precision was calculated to provide evidence on reproducibility. A $10 \mu\text{g L}^{-1}$ standard solution was injected 10 times and relative standard deviations RSD(%) of the retention time better than 0.7% were obtained. Additionally, small variations in buffer concentration did not significantly affect the separation performance, as occurred with the PFPP column. Thus, the phenyl-hexyl column was proposed for the chromatographic separation of the phenicol drug family.

UHPLC-MS/MS

Electrospray was used as the ionisation source for coupling liquid chromatography to mass spectrometry and the ionisation of the chloramphenicol-related compounds was studied in both positive and negative polarities. The full-scan mass spectrum of CAP, TAP and FF showed the protonated molecule $[M + H]^+$ as base peak in positive ionisation mode and the deprotonated molecule $[M - H]^-$ in negative mode. The negative mode provided higher signal intensity and lower background noise level. Furthermore, other ions such as in-source fragments and HCl adducts were also observed, but at low relative abundances. Nevertheless, FFA could only be ionised in positive mode, with the protonated molecule $[M + H]^+$ being the ion that dominated the corresponding full-scan mass spectrum. These results indicated that, to monitor the whole set of compounds in a single run with satisfactory sensitivity, a polarity switch after the elution of FFA (~ 1.45 min) was needed. It must be pointed out that the chromatographic resolution between FFA and TAP ($R_s > 2.1$) was enough to perform the switching with no peak distortion.

The electrospray parameters were optimized through the direct infusion of 5 mg L^{-1} standard solutions of FFA for the

Table 3 Chemical properties of the studied compounds

Compound	Acronym	CAS no.	pK_a		$\log K_{ow}$		Molecular weight (g mol^{-1})	Molecular formula
			Value	Reference	Value	Reference		
Chloramphenicol	CAP	56-75-7	Not found in 3–11	42	1.14	45	323.13	$\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5$
			11.03	43				
			8.83	44				
Thiamphenicol	TAP	15318-45-3	9.00	44	-0.27	45 and 46	356.23	$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{Cl}_2\text{NO}_5\text{S}$
Florfenicol	FF	73231-34-2	8.31	44	-0.04	46 and 47	358.21	$\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{FNO}_4\text{S}$
Florfenicol-amine	FFA	76639-93-5	7.38	44	-1.18	44	247.29	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{FNO}_3\text{S}$

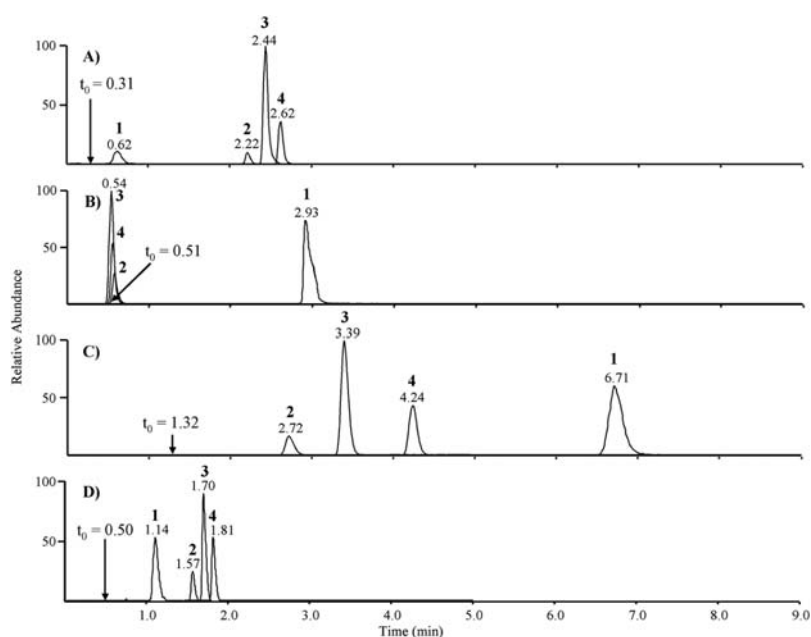


Fig. 2 LC-MS/MS chromatograms of a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ standard mixture of phenicols using columns of different stationary phases (working conditions specified in Table 1): (A) C18; (B) HILIC; (C) pentafluorophenylpropyl; and (D) phenyl-hexyl. Compounds: 1. FFA; 2. TAP; 3. FF; and 4. CAP.

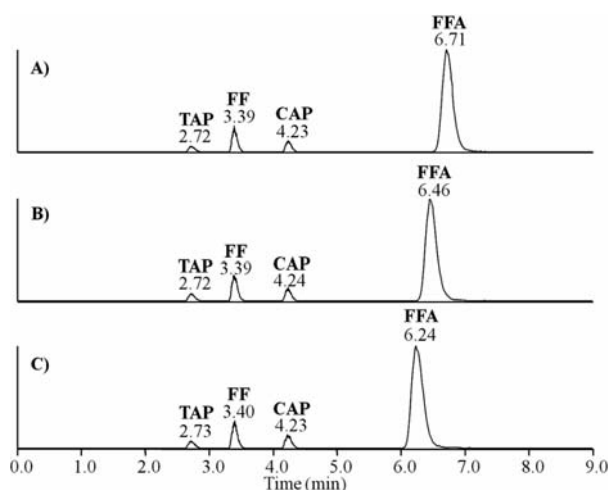


Fig. 3 Effect of a small variation of buffer concentration on the retention time of FFA using a pentafluorophenylpropyl column. Buffer concentration: (A) 5.0 mM; (B) 5.4 mM; and (C) 5.8 mM.

positive ionisation mode and CAP for the negative one under LC flow conditions. Two ionisation sources, standard electrospray (ESI) and thermally assisted electrospray (heated-electrospray, H-ESI), were studied and better responses (15–40%) were obtained with the H-ESI source. The highest improvement was observed for FFA, which is the compound eluting with higher water content in the mobile phase, in agreement with the more efficient desolvation of this source. However, the most common values for the vaporizer temperature used when working with H-ESI (350–400 °C) could not be applied, since it was observed that temperatures above 250 °C produced a decrease in the signal intensity of the $[\text{M} - \text{H}]^-$ of CAP together with an increase in the

intensity of some small ions, probably formed by thermal degradation of CAP. Vaporizer and capillary temperatures of 250 °C and 350 °C respectively were selected in order to achieve the highest sensitivity for CAP, since it requires a lower limit of detection.

In this study, tandem mass spectrometry (MS/MS) fragmentation of this family of compounds was studied to identify the most characteristic and intense product ions to be used for quantitation and confirmation purposes. Table 2 summarizes the precursor and product ions selected for quantitative analysis and for unequivocal confirmation when working in selected reaction monitoring (SRM), the ion assignment, the optimized collision energy and the ion ratio. The MS/MS fragmentation pattern was quite similar for CAP and TAP, showing the cleavage of the alkylic chain ($-\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_2\text{Cl}_2$) and the loss of CHOCl from the $[\text{M} - \text{H}]^-$. For FFA, the non-specific loss of water was used for quantitative purposes due to its high intensity, and a more selective fragmentation, in which the methylsulfonyl group was involved (loss of $\text{CH}_7\text{O}_3\text{FS}$), was selected for the confirmation of this compound. Regarding FF, the product ion generated from the loss of HF was selected for quantitative analysis. For confirmation, two transitions of similar intensities can be used: the product ion m/z 185.0 originated by the cleavage of the alkylic chain (m/z 356.0 \rightarrow 185.0) and the loss of HF from the ion m/z 358.0 ($[\text{M} - \text{H} + 2]^-$ for the $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ isotope of FF). In this study, the latter transition (m/z 358.0 \rightarrow 338.0) is preferred in order to prevent false negatives and interferences from TAP, eluting immediately before and presenting the same isobaric transition m/z 356.0 \rightarrow 185.0, arising from the precursor ion $[\text{M} - \text{H} + 2]^-$ for the $^{35}\text{Cl}^{37}\text{Cl}$ isotope of TAP.

A system suitability test was performed for the proposed method and the results are listed in Table 4. The run-to-run precision was determined by the analysis of 6 replicates and the

Table 4 Instrument quality parameters

		CAP	TAP	FF	FFA
Retention time precision RSD(%)		0.3	0.5	0.3	0.7
Run-to-run precision RSD(%)	Low-level (5 µg L ⁻¹)	3	5	4	4
	High-level (50 µg L ⁻¹)	3	5	5	4
	RSD(%) ion ratio	5	4	4	5
Day-to-day precision RSD(%)	Low-level (5 µg L ⁻¹)	5	9	6	6
	High-level (50 µg L ⁻¹)	4	6	6	5
	RSD(%) ion ratio	7	5	5	6
Limit of detection (injected pg)		0.3	0.7	0.2	10
Linearity (R ²)		0.9997	0.9997	0.9977	0.9975

day-to-day precision was calculated by the analysis of 6 replicates per day on 3 different days. Both run-to-run and day-to-day precisions were evaluated at two concentration levels, 5 and 50 µg L⁻¹. Good precision in terms of concentration values, RSD(%), lower than 10% for both high and low concentration levels was obtained. The best results were found for CAP, since the use of isotope dilution improved the precision in the quantitation of this compound. Ion ratio precision was also calculated and values (4–7%) far below the maximum tolerance threshold of 20% were obtained. The linearity of the calibration curves between the LOQ value and 100 µg L⁻¹ was good, providing regression coefficients (R²) higher than 0.997 for all the compounds. Finally, instrumental limits of detection (ILODs), based on a signal-to-noise ratio of 3 : 1 and expressed as injected pg, were calculated by the injection of standard solutions prepared at low concentration levels. For the compounds analysed in negative ionisation mode, ILODs were below the pg level (0.2–0.7 pg), whereas for FFA the ILOD increased tenfold. This might be a consequence of the higher background noise observed in the positive ionisation mode.

Sample treatment

The UHPLC-MS/MS method developed was used to determine chloramphenicol-related compounds in foodstuffs of animal origin. Extraction and clean-up procedures were developed to be suitable for the analysis of different food matrices. At an early stage, two food samples free of phenicol drugs (blank samples), chicken meat (low fat content) and pork meat (high fat content) were spiked at 50 ng kg⁻¹ level, homogenised and used to optimize the sample treatment procedure. Then, the same treatment was applied to other blank food matrices such as fish, prawns and honey and the sample treatment method was adjusted, if necessary.

Acetonitrile was chosen as the extraction solvent since it is generally recommended for food analysis as it helps to precipitate the proteins and to denaturalise enzymes.³⁶ Although good recoveries were obtained for the parent drugs, FFA was poorly extracted (~30%). To improve the recovery of FFA, the residue was re-extracted with 0.1% acetic acid aqueous solution to protonate the amine and thus to facilitate its extraction into the aqueous extracting solvent. This procedure allowed us to improve threefold FFA recovery. Both acetonitrile and acid extracts were combined and submitted to a clean-up procedure to reduce co-extractives.

As a first approach in the clean-up procedure, molecular imprinted polymer (MIP) cartridges specially designed for CAP (Oasis SupelMIP) were evaluated for the whole set of compounds, because of their similar chemical structure (Fig. 1). Before loading the combined extracts onto the SPE cartridge, the extract was diluted with 1% ammonium hydroxide to reduce the ACN percentage and change the pH. The analytes were eluted with methanol after two sequential washing steps (first with 1% ammonium hydroxide and second with dichloromethane), but it was observed that most TAP and FF and almost all FFA were lost. The elimination of the second washing step improved the recoveries for CAP, TAP and FF (>80%), although FFA was still not retained, so MIP cartridges were discarded.

As an alternative procedure, mixed-mode cationic exchange cartridges (Oasis MCX) were evaluated. The extract was also diluted to reduce the acetonitrile content, but in this case aqueous 0.1% acetic acid was used to protonate the FFA and to favour the cationic exchange retention mechanism. The same solvent (0.1% acetic acid) was used for the washing step, preventing the loss of FFA. For the elution step, different solvents (pure methanol, methanol : ammonium hydroxide 95 : 5 and methanol : ammonium hydroxide 90 : 10) and different volumes (0.5 mL; 1 mL; and 2 mL) were tested. Pure methanol provided poor recoveries for FFA, and for both methanol–ammonium hydroxide mixtures similar results were obtained. In order to increase recovery to 80–95% and facilitate the evaporation of the solvent, 1 mL of methanol : ammonium hydroxide 95 : 5 was chosen. Hence, mixed-mode Oasis MCX cartridges are proposed for the clean-up of the food samples.

When the optimized sample treatment was applied to fish and prawns, no significant differences in the recoveries of phenicol compounds were observed. However, for honey, extracts were not clean enough and high noise levels were observed, probably caused by sugars and other substances present in this matrix. Thus, for the analysis of honey samples, hydrophilic–lipophilic-balanced (HLB) cartridges were also evaluated. The sample treatment was adapted to the HLB cartridges by replacing the 0.1% acetic acid solution used throughout the sample treatment by 1% ammonium hydroxide to keep the FFA neutral. The compounds were fully eluted with 1 mL of pure methanol. The HLB honey extracts were much cleaner than those obtained when using MCX cartridges, and are recommended for the analysis of phenicols in this food commodity, although the recoveries achieved for FFA decreased to 50%. Finally, overall recoveries of the sample treatment were calculated by analyzing blank samples spiked at two concentration levels (10 µg kg⁻¹ and

100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) both before and after the sample treatment to avoid the matrix influence in the H-ESI response, with results ranging from 52% for FFA in honey to 106% for FF in fish (Table 5).

Method performance

In order to evaluate matrix effects, standard solution and blank extracts spiked post-treatment for all the studied matrices were prepared at the same concentration level (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and analysed by UHPLC-ESI-MS/MS. For FFA, no significant differences were observed, whereas a reduction in the signal intensity that ranged from ~30% for FF in fish to ~80% for CAP in chicken was obtained. These results indicated that the food matrix significantly affected the electrospray ionisation process in the negative mode, probably due to the lack of easily ionisable functional groups in the structure of CAP, TAP and FF. With the increase of the vaporizer temperature to 250 °C (H-ESI) the observed matrix effect was reduced, for instance, from 80% to 50% for CAP in chicken, and to below 10% for TAP and FF in fish meat. So, this source temperature has been used for the analysis of food samples. Nevertheless, since the matrix effect differed depending on the compound and the matrix, matrix-matched calibration was applied for the quantitation of phenolic drugs in different food commodities, as the labelled internal standard only corrected the signal suppression for CAP but not for the other compounds.

Quality parameters, such as relative retention time deviation, linearity in the working range, run-to-run precision, day-to-day precision and limits of quantitation (LOQs) based on a signal-to-noise ratio of 10 : 1, were calculated (Table 5). As can be seen in this table, LOQs at or below the MRPL (0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$) were obtained for CAP, and below the $\mu\text{g kg}^{-1}$ level for TAP, FF and FFA in most matrices. The run-to-run precision in terms of RSD(%) ($n = 6$) was calculated at the MRPL level for CAP, at the MRL for TAP (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and at the 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ level for FF and FFA, and values lower than 10% were obtained for all the compounds. For day-to-day precision (6 replicated analyses every day for 3 days), the RSD(%) values were below 14% for CAP and below 10% for TAP, FF and FFA.

Matrix-matched calibration standards were prepared between 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for CAP, TAP and FF and between 1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FFA. The matrix-matched calibration curves obtained for each matrix provided correlation coefficient values better than 0.993 within the working range studied. The relative retention time deviation, calculated as the tolerance of the ratio of the retention time of the analyte to that of the internal standard between the samples and the calibration standards, fell within the established margin of $\pm 2.5\%$.

Decision limit ($CC\alpha$) and detection capability ($CC\beta$) were calculated for CAP following the calibration graph approach (EU Decision 2002/657/EC³²). Blank samples were fortified at different concentration levels below, at and above the MRPL. The standard error of the y -intercept (S_y) was calculated from the response vs. concentration curve and used for calculation of $CC\alpha$ and $CC\beta$. For TAP, FF and FFA, these parameters were evaluated through the analysis of blank samples fortified at 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for TAP and at 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for FF and FFA. Table 5 summarizes the results and shows that for CAP all values were at or below the MRPL of 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Table 5 Method quality parameters

	Prawns			Pork			Chicken			Fish			Honey				
	CAP	TAP	FF	FFA	CAP	TAP	FF	FFA	CAP	TAP	FF	FFA	CAP	TAP	FF	FFA	
Linearity, R^2	0.999	0.995	0.999	0.999	0.999	0.996	0.998	0.999	0.997	0.999	0.994	0.997	0.999	0.998	0.999	0.998	0.998
Recovery (%) 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	65	59	68	90	66	82	89	90	79	88	76	90	69	62	85	89	84
100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	77	74	88	106	73	92	95	98	85	91	81	93	77	94	106	84	85
Run-to-run precision RSD(%)	9	8	6	4	9	6	2	4	8	4	6	4	7	6	5	6	9
Day-to-day precision RSD(%)	12	10	6	7	10	9	7	10	13	7	7	6	13	10	10	7	11
Decision limit, $CC\alpha$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.1	53	108	104	0.2	56	119	110	0.1	55	110	112	0.1	58	121	111	0.1
Detection capability, $CC\beta$ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.2	59	117	109	0.3	64	132	124	0.2	60	120	122	0.2	66	138	122	0.2
Limit of quantitation, LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	0.3	0.3	0.1	0.6	0.3	0.3	0.1	0.6	0.2	0.2	<0.1	1.0	0.2	0.1	<0.1	0.6	0.3

Finally, to check method performance a prawn-incurred material was analysed. This material was obtained from FAPAS (quality control test material T02150), which reported a concentration level of $1.45 \mu\text{g kg}^{-1}$ (satisfactory range between 0.81 and $2.09 \mu\text{g kg}^{-1}$) for CAP. The determination of CAP in this sample was carried out through matrix-matched calibration, using a blank sample of prawns spiked at different concentration levels and analyzed using the proposed method. The calculated concentration was $1.2 \pm 0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 3$), which falls within the satisfactory range. For TAP, FF and FFA, since no incurred material was available, quality control samples spiked at different concentration levels ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and $100 \mu\text{g kg}^{-1}$) were analysed and accuracies with relative errors below 10% for the low concentration level and 6% for the high concentration level were obtained.

The UHPLC-MS/MS method was also applied for the analysis of phenicols in several foodstuffs of animal origin bought at local supermarkets (Barcelona, Spain). The samples included several raw meat products (4 batches of chicken breast, 2 batches of chicken legs, chicken and pork hamburgers from 3 different brands, 3 batches of minced and stew pork meat and 1 Catalan spiced pork sausage), processed meat products (chicken nuggets, pork frankfurters and chopped pork sausages), farmed fish (sea bass, bream, iridescent shark, milkfish and Nile tilapia) and shrimps (whiteleg shrimp and tiger prawn) and 2 brands of honey, adding up to more than 25 samples. None of the compounds studied were detected in any of the analysed samples at concentrations higher than the CC α of CAP which ranged from 0.1 to $0.2 \mu\text{g kg}^{-1}$, depending on the matrix.

In addition to these samples, 3 more shrimp and honey samples, of Thai, Vietnamese and Chinese origin, were also analysed, since some studies have reported low concentration levels for CAP in animal-derived foods, mainly aquaculture products and honey, of Asian origin. For instance, concentration levels ranging from 0.1 to $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ref. 37) and from 0.4 to $6 \mu\text{g kg}^{-1}$ (ref. 38) were found in Vietnamese and Chinese honey, respectively, and below $0.1 \mu\text{g kg}^{-1}$ in a frozen shrimp sample³⁹ imported from East Asia. Moreover, as CAP is still used in shrimp culture in Asia,⁴⁰ several European regulations demand that aquaculture products imported from China, Vietnam, Indonesia, Thailand and Myanmar must be tested to ensure the absence of CAP.⁴¹ However, neither the permitted nor the banned compounds were found in the samples.

Conclusions

An UHPLC-MS/MS method is proposed for the simultaneous analysis of 3 phenicols and the metabolite FFA. A good separation of all the compounds in less than 2 minutes, six times faster than the previously published methods, is achieved using a fused-core phenyl–hexyl column, with the additional advantage of providing enough retention for the highly polar FFA. For the sample treatment, different clean-up procedures depending on sample nature (mixed-mode for meat and fish and hydrophilic–lipophilic-balanced for honey) must be used. Matrix-matched calibration is required to correct matrix effects. LOQs ranging from 0.1 to $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained for the compounds in all matrices, and values for CAP were lower than the established MRPL of $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$. The method presented good performance

and therefore, it can be proposed for the analysis of the phenicol drug family in food commodities.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from Spain's Ministry of Science and Technology under project CTQ2009-09253. Élida Alechaga is grateful to Spain's Ministry of Education for an FPU grant. The authors also wish to thank Sigma-Aldrich for kindly providing the chromatographic column.

References

- 1 J. Wongtavatchai, J. G. McLean, F. Ramos and D. Arnold, *WHO Food Addit. Ser.*, 2005, **53**, 7–84.
- 2 X. Li, Y. Hu, T. Huo and C. Xu, *Food Agric. Immunol.*, 2006, **17**, 191–199.
- 3 A. Gentili, D. Perret and S. Marchese, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2005, **24**, 704–733.
- 4 J. Tuerk, M. Reinders, D. Dreyer, T. K. Kiffmeyer, K. G. Schmidt and H. M. Kuss, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006, **831**, 72–80.
- 5 European Commission, Commission regulation 37/2010, *Off. J. Eur. Communities: Legis.*, 2009, **15**, 1–76.
- 6 P. Mottier, V. Parisod, E. Gremaud, P. A. Guy and R. H. Stadler, *J. Chromatogr., A*, 2003, **994**, 75–84.
- 7 European Commission, Commission decision 2003/181/EC, *Off. J. Eur. Communities: Legis.*, 2003, **71**, 17–18.
- 8 C. Sanchez-Brunete, B. Albero, E. Miguel and J. L. Tadeo, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2005, **75**, 459–465.
- 9 L. Santos, J. Barbosa, M. C. Castilho, F. Ramos, C. A. F. Ribeiro and M. I. Noronha da Silveira, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **529**, 249–256.
- 10 H. Y. Shen and H. L. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **535**, 33–41.
- 11 A. A. M. Stolker and U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr., A*, 2005, **1067**, 15–53.
- 12 A. F. Forti, G. Campana, A. Simonella, M. Multari and G. Scortichini, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **529**, 257–263.
- 13 A. Kaufmann and P. Butcher, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 3694–3700.
- 14 F. Vinci, G. Guadagnuolo, V. Danese, M. Salini, L. Serpe and P. Gallo, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2005, **19**, 3349–3355.
- 15 R. S. Nicolich, E. Werneck-Barroso and M. A. S. Marques, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **565**, 97–102.
- 16 H. T. Ronning, K. Einarsen and T. N. Asp, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1118**, 226–233.
- 17 B. Boyd, H. Bjoerk, J. Billing, O. Shimelis, S. Axelsson, M. Leonora and E. Yilmaz, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1174**, 63–71.
- 18 K. Fujita, H. Ito, M. Nakamura, M. Watai and M. Taniguchi, *J. AOAC Int.*, 2008, **91**, 1103–1109.
- 19 A. Tyagi, P. Vernekar, I. Karunasagar and I. Karunasagar, *Food Addit. Contam., Part A*, 2008, **25**, 432–437.
- 20 S. R. R. Siqueira, J. L. Donato, G. de Nucci and F. G. R. Reyes, *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 4012–4019.
- 21 J. Han, Y. Wang, C. Yu, Y. Yan and X. Xie, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 1295–1304.
- 22 J. Han, Y. Wang, C. Yu, C. Li, Y. Yan, Y. Liu and L. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **685**, 138–145.
- 23 M. Cronly, P. Behan, B. Foley, E. Malone, S. Martin, M. Doyle and L. Regan, *Food Addit. Contam., Part A*, 2010, **27**, 1233–1246.
- 24 R. Fernandez-Torres, M. A. Bello, M. Olias, M. Callejon and J. L. Perez-Bernal, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **675**, 156–164.
- 25 R. Fernandez-Torres, M. A. Bello, M. Olias, M. Callejon and M. Ramos, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, **54**, 1146–1156.
- 26 H. Tian, *Chemosphere*, 2011, **83**, 349–355.
- 27 E. Gracia-Lor, J. V. Sancho and F. Hernandez, *J. Chromatogr., A*, 2011, **1218**, 2264–2275.
- 28 J. Shen, X. Xia, H. Jiang, C. Li, J. Li, X. Li and S. Ding, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, **877**, 1523–1529.
- 29 S. B. Turnipseed, J. E. Roybal, A. P. Pfenning and P. J. Kijak, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **483**, 373–386.

- 30 J. M. van de Riet, R. A. Potter, M. Christie-Fougere and B. G. Burns, *J. AOAC Int.*, 2003, **86**, 510–514.
- 31 S. Zhang, Z. Liu, X. Guo, L. Cheng, Z. Wang and J. Shen, *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, **875**, 399–404.
- 32 European Commission, Commission decision 2002/657/CE, *Off. J. Eur. Communities: Legis.*, 2002, **221**, 8–36.
- 33 A. J. Alpert, *J. Chromatogr.*, 1990, **499**, 177–196.
- 34 P. Hemstrom and K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, 2006, **29**, 1784–1821.
- 35 D. S. Bell and A. D. Jones, *J. Chromatogr., A*, 2005, **1073**, 99–109.
- 36 A. Kaufmann, P. Butcher, K. Maden and M. Widmer, *J. Chromatogr., A*, 2008, **1194**, 66–79.
- 37 A. Baggio, A. Gallina, C. Benetti and F. Mutinelli, *Food Addit. Contam., Part B*, 2009, **2**, 52–58.
- 38 D. Ortelli, P. Edder and C. Corvi, *Chromatographia*, 2004, **59**, 61–64.
- 39 E. Gikas, P. Kormali, D. Tsipi and A. Tsarbopoulos, *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 1025–1030.
- 40 *GESAMP Reports and Studies No. 65*, Rome, 1997, <http://www.fao.org/docrep/meeting/003/w6435e.htm>.
- 41 S. Impens, W. Reybroeck, J. Vercammen, D. Courtheyn, S. Ooghe, K. De Wasch, W. Smedts and H. De Brabander, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **483**, 153–163.
- 42 Z. Qiang and C. Adams, *Water Res.*, 2004, **38**, 2874–2890.
- 43 Scifinder® Scholar, *Calculated Using Advanced Chemistry Development (ACD) Software Solaris V4.67*, American Chemical Society, 2001.
- 44 SPARC online calculator, <http://sparc.chem.uga.edu/sparc/>.
- 45 L. D. Hughes, D. S. Palmer, F. Nigsch and J. B. O. Mitchell, *J. Chem. Inf. Model.*, 2008, **48**, 220–232.
- 46 T. Grabowski, J. J. Jaroszewski and W. Piotrowski, *Toxicol. In Vitro*, 2010, **24**, 953–959.
- 47 A. B. A. Boxall, P. Johnson, E. J. Smith, C. J. Sinclair, E. Stutt and L. S. Levy, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 2288–2297.

2.2.2. Article científico II

Mixed-mode liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of aminoglycosides in meat.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2014) **406**, 4941-4953

Mixed-mode liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of aminoglycosides in meat

Élida Alechaga · Encarnación Moyano ·
M. Teresa Galceran

Received: 11 April 2014 / Revised: 14 May 2014 / Accepted: 17 May 2014 / Published online: 3 June 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract A novel LC-MS/MS method has been developed for the determination of 13 aminoglycoside antibiotics in meat products. Among the chromatographic columns tested, the mixed-mode Obelisc R provided the best performance. Electrospray has been used for the coupling of the LC and the effect of temperature on the ionization has been evaluated. The mass spectra of AGs have been studied in order to select the most adequate precursor and product ions for quantitation and confirmation in SRM mode, showing that the single charged $[M+H]^+$ provided better precisions than the double charged $[M+2H]^{2+}$. Accurate mass measurements have been performed in order to confirm the molecular composition of the product ions, allowing the establishment of a new mechanism for some product ions of STR and DHSTR. A sample treatment based on an extraction and a SPE clean-up has been applied to a wide variety of meat products such as frankfurters; sausages; and minced meat of pork, veal, and chicken. Method limits of quantitation in the low microgram per kilogram level ($1\text{--}50\ \mu\text{g kg}^{-1}$), precisions %RSD below 15 % and accuracies expressed as relative errors below 23 % have been obtained, making the proposed method suitable for routine analysis.

Keywords Mixed-mode chromatography · Aminoglycosides · LC-MS/MS · Mass spectrometry · Meat products

Introduction

Aminoglycosides (AGs) are a wide family of broad-spectrum antibiotics with bactericidal activity against some gram-

positive and gram-negative organisms [1], whose chemical structure generally consists of two to four sugars linked together with a substituted deoxystreptamine or a streptidine moiety as central unit. Some of them are naturally obtained from various Actinobacteria classes whereas others are semi-synthetic derivatives of natural fermentation products. In veterinary medicine, aminoglycosides are used in the treatment of several bacterial infections, and have been added to feeds for prophylaxis and as growth promoters [2], although the latter have been banned in the European Community since 2006 [3]. Despite the fact that their use has been limited because of side effects (nephrotoxicity and ototoxicity [4]) and the emergence of resistant bacterial strains, their clinical importance is being reassessed in the light of the increasing resistance of pathogens to other antimicrobials. Due to its high affinity to the tissue, their use results in a high level of tissue residues and in prolonged withdrawal times [5]. The consumption of food from animal origin containing aminoglycoside residues can be a potential hazard for the human health and thus the European Community [6] has regulated their presence in animal tissues for human consumption establishing maximum residue limits (MRL) for some aminoglycosides in different matrices. These MRL values range from $50\ \mu\text{g kg}^{-1}$ for gentamicin in animal muscle to $20,000\ \mu\text{g kg}^{-1}$ for apramycin in bovine kidney.

The analysis of antibacterials in food is challenging mainly because of the very low levels ($\mu\text{g kg}^{-1}$) at which they must be determined and also the complexity of the food matrices, containing proteins and cations to which some antibacterials can bind to, hindering their extraction [7]. In the case of aminoglycosides, their high polarity poses an additional difficulty to the analysis of these compounds, since they are poorly retained on reversed-phase columns in the pH range commonly used in liquid chromatography (pH 2–8). For the chromatographic separation of AGs, ion-pair chromatography has been used to favor the retention on reversed-phase columns [8–16],

É. Alechaga · E. Moyano (✉) · M. T. Galceran
Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona,
Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain
e-mail: encarna.moyano@ub.edu

with heptafluorobutyric acid being the reagent most commonly used when coupling liquid chromatography to mass spectrometry (LC-MS) [12–16]. Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) [17] has been recently proposed as an alternative to ion-pair chromatography for the analysis of AGs in foods by LC-MS [18, 19], as the ion-pair reagents often reduce the sensitivity in mass spectrometry. However, most HILIC methods analyze only up to 10 compounds [19–21]. Regarding the detection, AGs do not present chromophore or fluorophore groups in their chemical structures making difficult their detection by spectrophotometric systems, thus requiring a pre- [22] or post-column derivatization step [8, 9, 12, 23, 24] prior to detection. To avoid derivatization and taking advantage of its high selectivity, mass spectrometry (MS) is the technique of choice for the LC analysis of AGs in food [8, 9, 25]. Electrospray is the most commonly used ionization source [10–16], although atmospheric pressure chemical ionization (APCI) has also been suggested in some cases to diminish the ion suppression due to the high concentration of the buffers used as aqueous phase [12, 26]. As regards the analyzer, most methods used a triple quadrupole working in selected reaction monitoring (SRM) [10–16] to improve sensitivity and selectivity and to fulfill the EC confirmatory requirements [27].

Recently, mixed-mode liquid chromatography columns [28] that offer simultaneous multimode retention mechanisms (reversed-phase, cation exchange, and zwitterionic and hydrophilic interactions) have been developed. Several authors have proposed the use of these columns as a valuable alternative to standard HILIC phases in a variety of HPLC applications such as the analysis of ascorbic acid [29] or triphenyl atropisomers of pharmaceuticals [30]. To the best of our knowledge, mixed-mode chromatography has not been used for the separation of aminoglycosides. This paper describes the development of a fast and simple analytical method combining a solid-phase extraction (SPE) clean-up procedure with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the confirmatory analysis of 13 aminoglycosides in meat products without the need of derivatization or the use of ion-pair reagents.

Materials and methods

Reagents and materials

Kanamycin A sulfate (KAN, 95 %, CAS No. 25389-94-0), neomycin trisulfate hydrate (NEO, 86 %, CAS No. 1405-10-3), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate (98.5 %) and ammonium formate (99 %) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Amikacin hydrate (AMIK, 96 %, CAS No. 37517-28-5), apramycin sulfate (APRA, 98.5 %, CAS No. 65710-07-8),

dihydrostreptomycin sesquisulfate hydrate (DHSTR, 99 %, CAS No. 5490-27-7), gentamicin 2,5-sulfate hydrate (GEN, 96.5 %, CAS No. 1405-41-0; mixture of 29.1 % GENC1, 21.3 % GENC1a and 49.6 % GENC2+GENC2a+GENC2b), hygromycin B hydrate (HYG, 85 %, CAS No. 31282-04-9), paromomycin sulfate (PARO, 90 %, CAS No. 1263-89-4), spectinomycin dihydrochloride hydrate (SPC, 99 %, CAS No. 21736-83-4), streptomycin sulfate (STR, 98 %, CAS No. 3810-74-0), and tobramycin (TOB, 93 %, CAS No. 32986-56-4) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). The structures and names of the studied compounds are shown in Fig. 1. LC-MS grade methanol, acetonitrile (ACN) and water and trichloroacetic acid (TCA) (99.5 %) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany) and formic acid (98–100 %) and aqueous ammonium hydroxide (33 %) were provided by Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions (2 mg g⁻¹) were individually prepared by weight in water and stored at -20 °C. Intermediate solutions were prepared monthly from stock standard solution by appropriate dilution. Due to the high sorption affinity of the aminoglycosides for polar surfaces, only laboratory equipment made of polypropylene was used during sample preparation and storage, and contact with glass was avoided as much as possible.

Mobile phase was filtered through a 0.22 µm nylon membrane filter purchased from Whatman (Clifton, NJ, USA) and samples were filtered using 0.22 µm nylon membrane syringe filters obtained from Teknokroma (Sant Cugat del Vallés, Spain). Nitrogen (99.8 % pure) used for the API sources and high-purity argon (ALPHAGAZ 1 Ar) for collision-induced dissociation gas (CID gas) in the triple quadrupole tandem mass spectrometry experiments were purchased from Air Liquide (Madrid, Spain). Oasis HLB cartridges (150 mg, 6 cm³) and extraction manifold were from Waters (Milford, MA, USA) and the extraction solution for sample treatment consisted of a mixture of equal volumes of acetonitrile and aqueous 5 % TCA, 2 mM EDTA.

Sample treatment

Different meat products, bought at local supermarkets in Barcelona (Spain), were cut, ground and homogenized with an Ultraturrax T25 basic (IKA-Werke, Staufen, Germany) and kept frozen at -20 °C until analysis. Subsamples of 2 g were weighed in a 15 mL polypropylene centrifuge tube (Serviquimia, Barcelona, Spain) and extracted in a Sonorex RK100 ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin, Germany) for 10 min with 4 mL of the extraction solution and then centrifuged at 4,000 rpm (Selecta-Macrotronic, J.P. SELECTA S.A., Abrera, Spain) for 10 min. For the clean-up, 2.5 mL of the supernatant was loaded onto an Oasis HLB SPE cartridge previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of water. The first

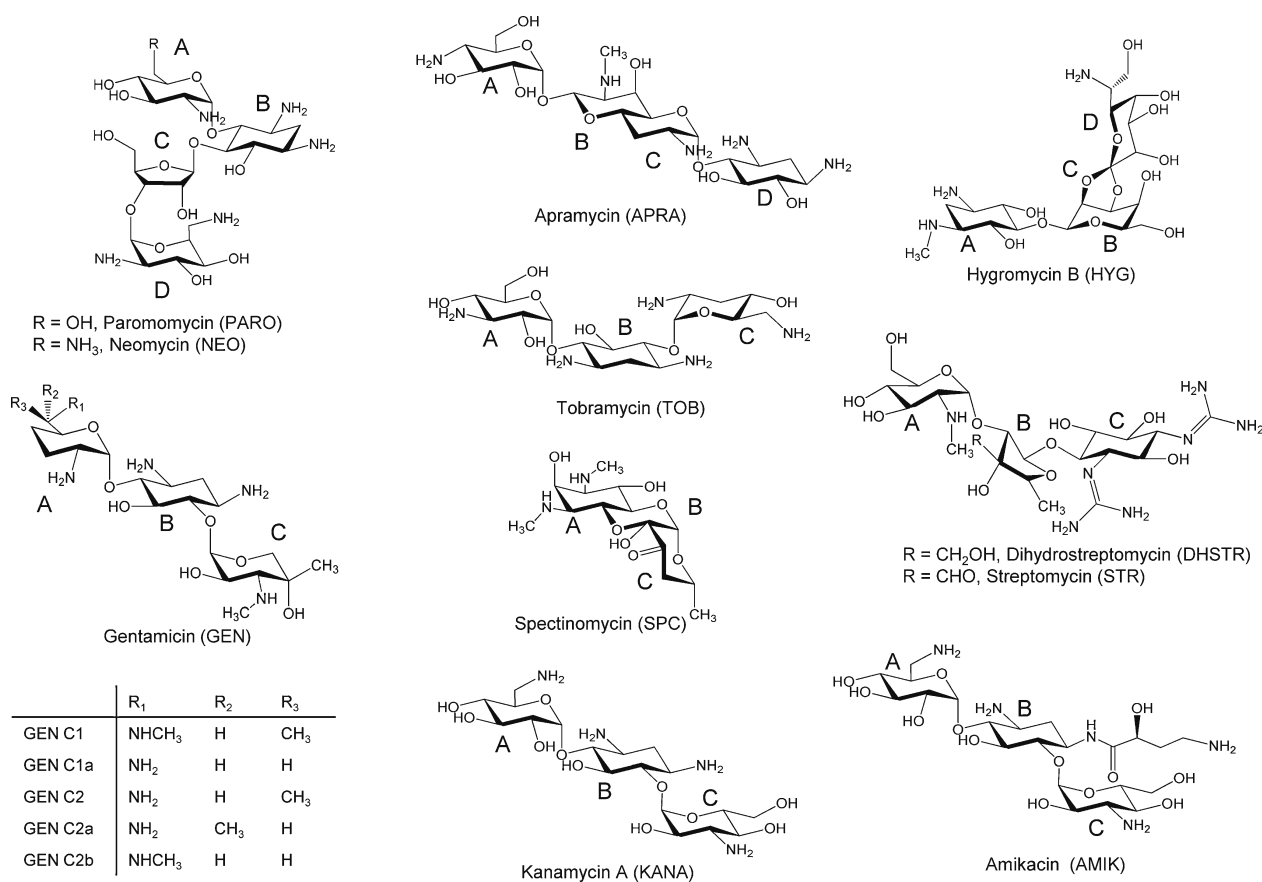


Fig. 1 Structures and acronyms of the studied compounds

1.0 mL of the eluate was discarded and the rest were collected, filtered through a 0.22 μm nylon membrane filter and 20 μL was injected into the HPLC-MS/MS system.

Matrix-matched calibration was used to quantify the samples. Matrix-matched calibration standards were prepared by spiking blank samples and submitting them to the sample treatment. Blank matrix samples (veal muscle, chicken muscle, pork muscle) were spiked at six concentration levels ranging from 10 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and left for 30 min at room temperature before their analysis.

HPLC-MS/MS

HPLC separation was performed on an Open Accela liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA), equipped with a quaternary UHPLC pump and a PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). An ObeliscTM R (150 \times 2.1 mm, 5 μm) column (SIELC Technologies, Prospect Heights, IL, USA) was used for the proposed method. An Ascentis Express HILIC (50 \times 2.1 mm, 2.7 μm) column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was also tested in this study. The mobile phase was a mixture of solvents A, acetonitrile, B, water, and C, 1 % formic acid in

water. The gradient elution was as follows: from 0 to 0.5 min 85 % A, 7.5 % B and 7.5 % C; at 3.8 min 65 % A and 35 % C; at 4.3 min 55 % A and 45 % C; at 4.5 min 55 % A and 45 % C; at 6.5 min 5 % A and 95 % C; at 11 min 5 % A and 95 % C and return to initial conditions. Equilibration time was 10 min.

Mass spectrometry was performed in a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) triple quadrupole mass spectrometer equipped with heated-electrospray (H-ESI) as ionization source. Electrospray voltage was set at 3.0 kV, ion transfer tube and vaporizer temperatures were held at 300 $^{\circ}\text{C}$ and the sheath gas, auxiliary gas and ion sweep gas flow rates were 50, 15, and 2 a.u. (arbitrary units), respectively. For tandem mass spectrometry experiments the collision gas was Argon (1.5 mTorr) and the collision energy (CE) ranged from 13 to 36 eV. Two transitions were monitored for each compound using an isolation width of 0.1 m/z units and a dwell time of 50 ms (1 scan/cycle time). Transitions for quantitation and confirmation purposes and the corresponding collision energies and ion ratios are listed in Table 1. Other instrument settings were optimized by infusion of standard solutions (10 mg kg^{-1}) at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, using the built-in syringe pump and a zero dead volume T-piece to mix them with the mobile phase.

Table 1 Tandem mass spectrometry working conditions. Selected SRM transitions, collision energies (CE), ion assignments and ion ratios

Compound	Retention time (min)	Precursor ion		Product ion		CE (eV)		Ion ratio
		<i>m/z</i>	Assignment	<i>m/z</i>	Assignment			
SPC	4.34	351.2	[M+H+H ₂ O] ⁺	207.1	[A ₂] ⁺	13	Quantitation	1.5
				98.0	[A ₂ -2H ₂ O-CH ₃ NH ₂ -H ₂ CCO] ⁺	20	Confirmation	
STR	5.75	582.3	[M+H] ⁺	263.1	[C ₂] ⁺	31	Quantitation	1.7
				246.1	[C ₂ -NH ₃] ⁺	35	Confirmation	
DHSTR	5.85	584.3	[M+H] ⁺	263.1	[C ₂] ⁺	29	Quantitation	4.1
				221.1	[C ₂ -H ₂ CN ₂] ⁺	36	Confirmation	
HYG	5.99	528.2	[M+H] ⁺	352.1	[M+H-A ₂] ⁺	23	Quantitation	1.2
				177.1	[A ₂] ⁺	25	Confirmation	
AMIK	6.52	586.3	[M+H] ⁺	163.1	[B ₂ -COCHOHCH ₂ CH ₂ NH ₂] ⁺	33	Quantitation	1.9
				425.2	[M+H-A ₁] ⁺ or [M+H-C ₁] ⁺	18	Confirmation	
KANA	6.90	485.2	[M+H] ⁺	163.1	[B ₂] ⁺	23	Quantitation	1.8
				324.2	[M+H-A ₁] ⁺ or [M+H-C ₁] ⁺	15	Confirmation	
APRA	7.25	540.3	[M+H] ⁺	217.1	[M+H-D ₂ -A ₁] ⁺	25	Quantitation	1.4
				378.2	[M+H-D ₂] ⁺	16	Confirmation	
PARO	7.28	616.3	[M+H] ⁺	163.1	[B ₂] ⁺	32	Quantitation	2.3
				161.1	[D ₁] ⁺	33	Confirmation	
TOB	7.59	468.3	[M+H] ⁺	163.1	[C ₂] ⁺ or [B ₂] ⁺	22	Quantitation	1.4
				324.2	[M+H-C ₁] ⁺	13	Confirmation	
GENC1	7.64	478.3	[M+H] ⁺	322.2	[M+H-A ₁] ⁺	13	Quantitation	1.7
				157.1	[A ₁] ⁺	20	Confirmation	
GENC2	7.66	464.3	[M+H] ⁺	322.2	[M+H-A ₁] ⁺	13	Quantitation	5.1
				163.1	[B ₂] ⁺	20	Confirmation	
GENC1a	7.71	450.3	[M+H] ⁺	322.2	[M+H-A ₁] ⁺	13	Quantitation	4.1
				163.1	[B ₂] ⁺	22	Confirmation	
NEO	7.95	615.3	[M+H] ⁺	163.1	[B ₂] ⁺	29	Quantitation	1.4
				161.1	[D ₁] ⁺ or [A ₁] ⁺	27	Confirmation	

Additional accurate mass measurements were performed in a Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, San José, CA), quadrupole-orbitrap mass spectrometer equipped with a heated-electrospray (H-ESI-II) as ionization source and a high-energy collision dissociation (HCD) cell that used the same nitrogen (99.995 % pure, Air Liquide, Madrid, Spain) as collision gas and in the API source. Voltages, temperatures and gas flow rates were the same as the ones used with the TSQ mass spectrometer.

Results and discussion

Liquid chromatography

Recently, HILIC chromatography has gained enormous popularity as an alternative for the separation of polar compounds such as aminoglycoside drugs [18], as it shows excellent compatibility with MS detection and avoids the need of a previous derivatization or the use of ion-pair reagents. In this work the use of a bare silica HILIC column (Ascentis Express HILIC) was initially evaluated for the separation of the

aminoglycosides. To this end, individual standard solutions of each compound were injected using a mobile phase composed of ACN:formic acid-ammonium formate buffer 50:50 at 500 $\mu\text{L min}^{-1}$, and the effect of both buffer pH (from 2.75 to 4.75) and buffer concentration (from 10 to 50 mM) on peak shape and on the retention time of the compounds was evaluated.

In general, strong retention was observed for all the compounds, and some of them, such as NEO, showed very long retention times, even under the highest elution strength conditions (60 % aqueous buffer). This might be due to the strong hydrogen bonding between the protonated AGs and the stationary phase (silica), favored by the high number of polar groups in the structures of the compounds that increased retention. Many authors indicated that the increase of the ionic strength of the mobile phase helped with the elution of compounds in HILIC mode. However, in our case concentration values higher than 50 mM were not considered since a high buffer concentration is not recommended in LC-MS. Using a 50 mM pH 4.75 formic-ammonium formate buffer, the elution of some aminoglycosides such as PARO and APRA was difficult showing a strong retention and poor chromatographic peak shapes (peak width > 2 min, asymmetry factor > 3).

Elution could also be improved by increasing the aqueous phase content in the mobile phase, but this approach was not considered because no more than 60 % water in the mobile phase is recommended as it could negatively affect the silica surface and reduce hydrophilic interaction. For all these reasons, the bare silica HILIC column was discarded for the chromatographic separation of AGs.

As an alternative, a zwitterionic-type mixed-mode column (Obelisc™ R) with Liquid Separation Cell technology (LiSC™) was evaluated. This column, with reversed-phase characteristics, has cationic groups (quaternary amine-like) close to the silica surface separated from anionic groups (carboxyl type) by a hydrophobic chain [30], allowing ion exchange, hydrophilic, hydrophobic, and zwitterionic mechanisms to take place simultaneously. In a preliminary study, the column was used with ACN:formic acid-ammonium formate aqueous buffer (pH 2.75, 50 mM) as mobile phase and it was observed that an increase in the percentage of ACN led to longer retention times and wider chromatographic peaks. The elution order was the same that the one observed when HILIC columns are used [21, 31], indicating that probably HILIC mechanism prevailed over the rest. Moreover, the observed elution order (Table 1) was in accordance with the number of primary amino groups in the chemical structure of AGs with the exception of the gentamicins, that eluted after TOB and PARO. This fact might be explained by slight differences in the structures of the gentamicins and the other AGs. As can be seen in Fig. 1, most AGs have hydroxymethyl and/or aminomethyl substituents in their glycosidic rings that could easily form intramolecular hydrogen bonds that would reduce their retention time. In contrast, for gentamicins, the difficulty to form those hydrogen bonds would favor their interaction with the stationary phase, increasing their retention time.

To optimize the AGs separation with the Obelisc R column, the effect of pH and buffer concentration on the chromatographic separation was studied. First, 50 mM aqueous formic acid-ammonium formate buffers at pHs between 2.75 and 4.75 were tested. AGs were strongly retained (especially NEO, which is the last eluting compound) and could only be eluted with buffer concentrations higher than 100 mM, which is not compatible with MS coupling. Then, the use of acidic mobile phases was considered and when 0.5 % formic acid was added to the aqueous phase (pH 2.5), the retention of the analytes decreased. This behavior may be explained by the chemical structure of the sorbent: according to the manufacturer, the pK_a values of the stationary phase are approximately 10.0 and 4.0 for the amino and carboxyl sites respectively [30]. So, at pH below 2.5 with 0.5 % formic acid the protonation of carboxyl groups prevented this cation exchange interaction providing shorter retention times. Conversely, when pH values between 3 and 5 are used the carboxyl site is partially dissociated and cation exchange interaction between the stationary phase and the protonated amino groups of the

AGs is favored, leading to longer retention times and tailing peaks. Different percentages of formic acid (0.1–1.0 %) were tested and it was observed that when increasing the formic acid concentration, peaks became narrower and retention times were lower due to the higher ionic strength that favored both the elution and the mass transfer. However, when using 1 % formic acid the first peaks in the chromatogram eluted very close to the elution front. To increase the retention of these compounds and improve the elution of the last eluting ones a ternary gradient was optimized. For the best chromatographic behavior for the 13 AGs, a gradient starting at 0.5 % formic acid (0.5 min), followed by an increase of the formic acid concentration to 1 % in 3.3 min was used, holding this concentration until the elution of all analytes (see “Materials and methods” section). As can be seen in Fig. 2, it was not possible to baseline separate all the compounds, but the SRM transitions chosen for quantitation and confirmation of the co-eluting compounds were selective enough to prevent mass spectrometry interferences. Moreover, ion suppression was evaluated for the co-eluting compounds and no significant differences were observed between signal intensities obtained from individual standards and those provided by a mixture of the compounds.

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Traditionally, electrospray (ESI) in positive mode has been the ionization technique of choice for the LC-MS analysis of these compounds [8, 9] because protonation is favored by the presence of amine groups in their chemical structure. APCI has also been used in some works, especially to avoid the ion suppression observed in ESI when ion-pair reagents are used in the mobile phase [12, 26]. In this work, we have obtained the mass spectra of AGs using a H-ESI source. For this purpose, a mobile phase composed of ACN:0.5 % formic acid (1:1) at 0.3 mL min^{-1} was used injecting AGs individually by flow injection analysis (FIA) and acquiring their fullscan mass spectra in positive mode.

Both single-charged $[M+H]^+$ and double-charged $[M+2H]^{2+}$ molecular ions were generally observed in the mass spectra along with in-source collision-induced dissociation fragment ions (relative abundance: 5–100 %). This distribution of the total molecule population into several ionic species split the signal and diminished the sensitivity of the method, which is in agreement with other authors reporting low sensitivity in comparison with other drugs [31, 32]. Nevertheless, the use of an acidic mobile phase, which favored the formation of the double charged species, was mandatory in our case to obtain adequate chromatographic retention, as commented above. Additionally, for SPC and STR, ions shifted 18 Da at higher relative abundances than their protonated molecules were obtained. These ions have been assigned in the literature to the hydration of the carbonyl group in aqueous solutions

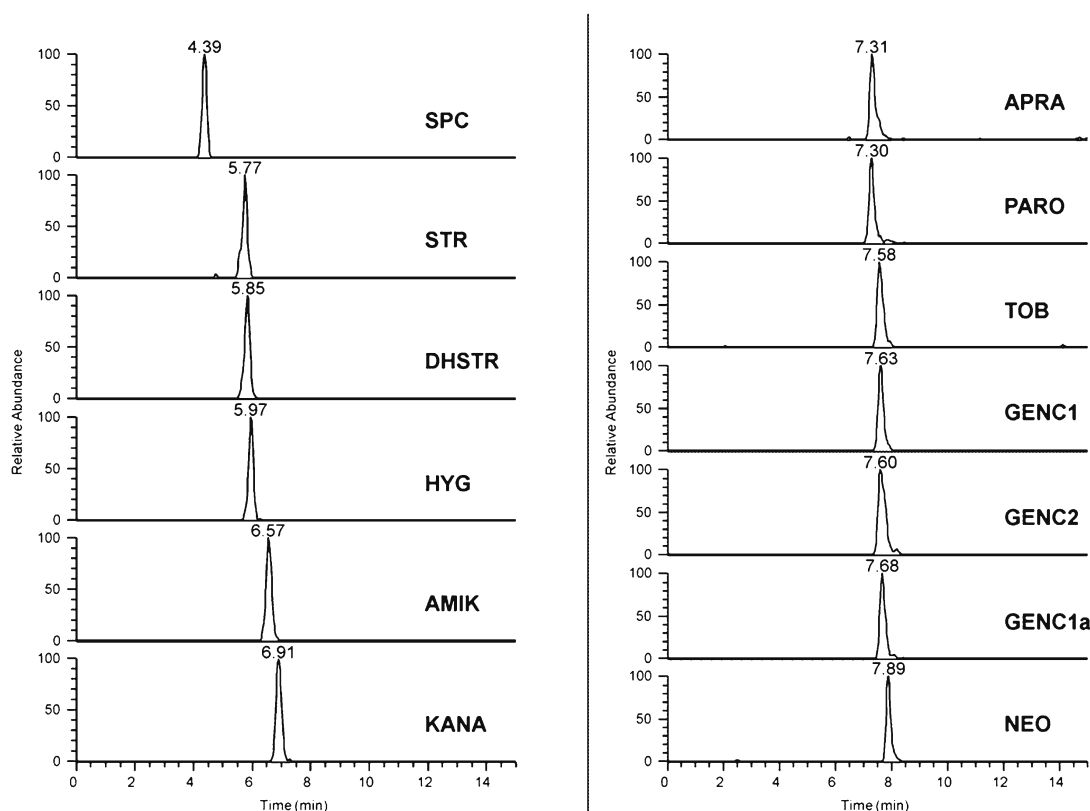


Fig. 2 Chromatogram of a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ standard mixture of AGs

[25], that has also been described for STR using ^{13}C -NMR [33]. To explore if the ionization mechanism had an important role in the hydration of carbonyl groups, the ionization of STR and SPC was studied using also APCI. The obtained mass spectra did not show the double charged or the hydrated molecular ions at significant intensities above the background noise. Also, lower signal intensities were obtained for the protonated molecules, indicating that even though in H-ESI the total signal intensity of the compounds is split between different ions the ionization process is much more effective than when using APCI. The absence of the hydrated forms of SPC and STR in APCI would suggest that the generation of hydrated carbonyl groups is enhanced in the electrospray charged droplet. A possible explanation for this fact might be that pH in the electrospray charged droplets is quite different from that of the bulk solution [34], and the extreme pH conditions could greatly increase both the yield of the reaction of acid-catalyzed hydration and the presence of multiple-charged ions.

Regarding H-ESI parameters, they were optimized to maximize the signal intensities of the protonated molecules of the compounds and to diminish the intensities of the double charged species. The effect of vaporizer temperature (100–400 °C) on the signal intensity was studied. In general, temperature favored the thermal desolvation increasing the signal

intensity of both ions although at 300 °C the signal of $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ started to decrease. This temperature was selected because at higher values a decrease in the signal of $[\text{M}+\text{H}]^{+}$ was also observed due to thermal degradation. The rest of the source parameters were also optimized and the optimum values are indicated in the experimental section.

The tandem mass spectra of the AGs were studied in order to characterize the product ions and to select the most characteristic and abundant ones for quantitative and confirmatory purposes. The chemical structures of the most important product ions of AGs have been proposed in several studies [25, 35–37]. As reported, the product ion spectrum of the single charged molecular ion showed an important fragmentation for most of these compounds, being the product ions most commonly observed those arising from the combination of the cleavage of glycosidic bonds and hydrogen transfer to the glycosidic oxygen [25]. To better explain the fragmentation of these compounds, the glycosidic rings of the structures included in Fig. 1 have been labeled with uppercase letters. An example of the cleavage of the glycosidic bond for GENC1 and APRA is shown in Fig. 3, where the product ions obtained are labeled with the uppercase letter corresponding to the ring and a subscript that indicates if the product ion maintains the glycosidic oxygen (for APRA, D_2) or contains the anomeric carbon (for GENC1, A_1). The selected SRM

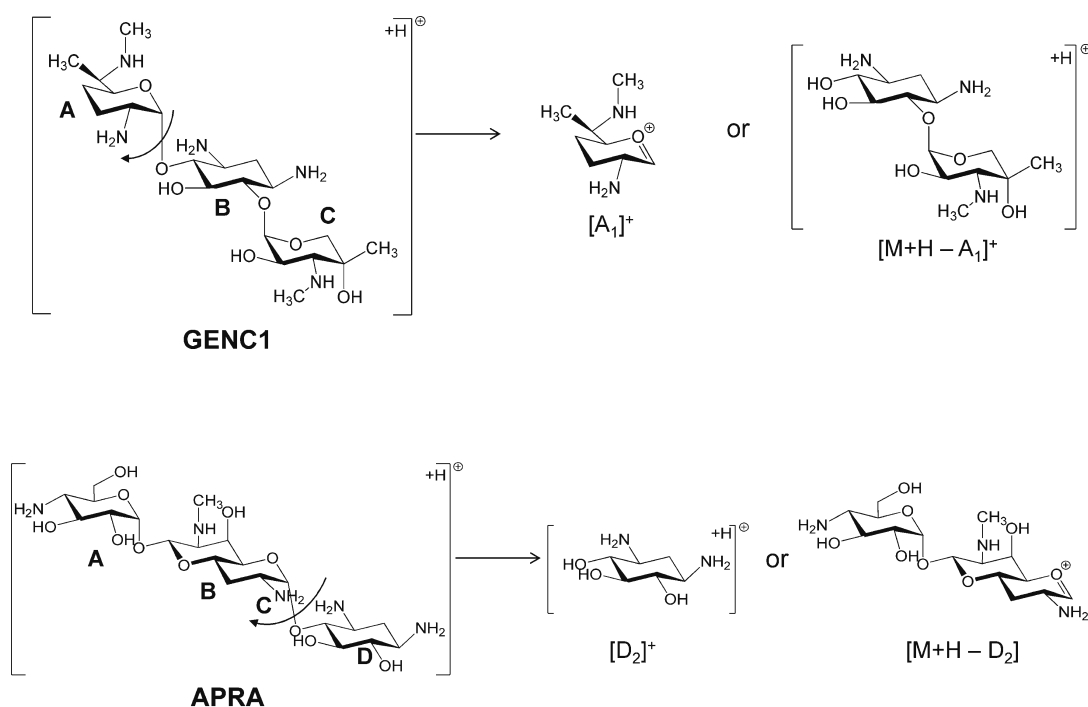


Fig. 3 Example of the fragmentation mechanism for AGs

quantitation and confirmation transitions for each compound, their optimal collision energy and their ion assignment using the notation explained above are listed in Table 1.

Some of the studies in the literature suggested that the product ion at m/z 246 for STR and DHSTR was due to the C_1 fragmentation of the molecule (product ion: $[C_8H_{18}N_6O_3]^+$) [25, 35, 36], which would correspond to the loss of a hydroxyl radical from the streptidine unit (C ring). In this work, we measured the accurate mass of product ion m/z 246 for STR and DHSTR with the Q-Exactive to confirm the elemental composition of this product ion and the value obtained was m/z 246.11912, which corresponded to an error above 99 ppm with respect to the $[C_8H_{18}N_6O_3]^+$. However, the obtained accurate mass matched with $[C_8H_{16}N_5O_4]^+$ with a mass error of 2.3 ppm. As a result, the structure of this product ion has been re-assigned and it may be originated by the concurrent losses of the streptobiosamine moiety (AB rings) and ammonia. This fragmentation could take place via the mechanism depicted in Fig. 4 and it is favored by the formation of an intramolecular hydrogen bond between the glycosidic oxygen and the hydrogen of the guanidine group. The proposed mechanism also explained the generation of the product ion at m/z 221 of STR and DHSTR.

Although the double-charged ions have higher relative intensities than the protonated molecules for most of the studied compounds, these ions showed higher fragmentation thus providing lower intensities and worse precisions than those product ions arising from the $[M+H]^+$. Moreover, the double-protonated molecules of partially co-eluting compounds such as STR and DHSTR have m/z values that differed in less than $1m/z$ unit,

which might compromise the selectivity of the method. For these reasons, the use of the double charged molecules is not recommended. The most intense and selective product ions arising from the $[M+H]^+$ were chosen for the quantitation and the confirmation of the compounds. For SPC, the transition arising from the loss of water from the $[M+H+H_2O]^+$ has not been used in spite of being the most intense due to its poor selectivity. For the rest of the AGs, the most intense product ions were selective enough. The chosen SRM transitions are listed in Table 1.

Sample treatment

The extraction of AG residues from muscle tissues shows some difficulties due to the fact that these compounds tend to bind to proteins and to form complexes with metal ions and thus, the use of strong acids such as TCA and chelating agents such as EDTA is generally recommended [13, 22, 38–40]. So, as a first step, we evaluated the use of TCA for the extraction of AGs. When blank veal muscle samples (2 g) spiked at $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ were extracted with 4 mL of 2.5 % TCA in water, recoveries lower than 60 % for some compounds such as PARO, TOB, and NEO were obtained. Moreover, when these extracts were diluted with ACN prior to injection to adapt the solvent composition to the initial chromatographic conditions, precipitation of co-extracted proteins was observed. So, the use of ACN-TCA mixtures as extraction solvent was evaluated. When using a 1:1 mixture of ACN:2.5 % TCA in water the extraction yield was improved by 10–15 %. This improvement was probably because ACN helped with protein denaturalization and

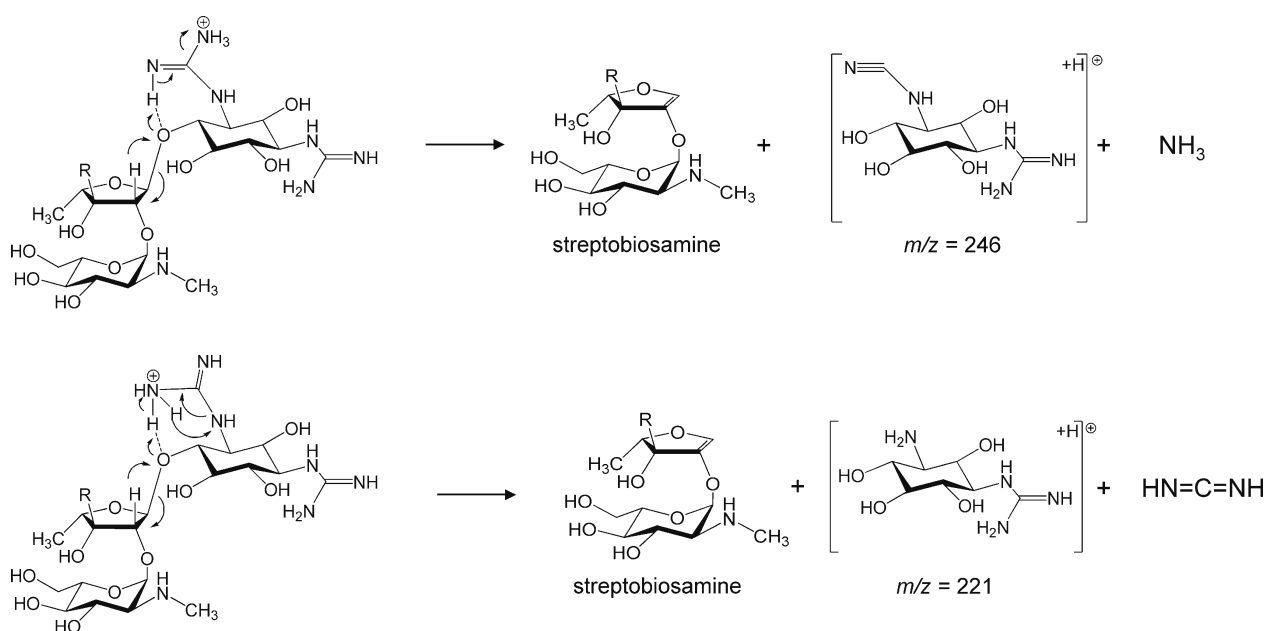


Fig. 4 Fragmentation mechanism for STR and DHSTR for product ions m/z 246 and 221

precipitation during the extraction step. In addition, it also produced tissue swelling that would allow better penetration of the extraction solvent through the tissue. An additional advantage is that no further dilution with ACN to adapt the solvent extract to the initial chromatographic conditions was needed before injection into the LC-MS/MS system. The percentage of TCA in the extraction solvent was varied from 1 to 10 % TCA in water (1, 2.5, 5, 7.5 and 10 % TCA) in order to increase extraction yield and the recoveries improved up to 60–70 % for the more retained compounds with 5 % TCA, although higher percentages of TCA did not provide better results. Moreover, we also evaluated the addition of small quantities of EDTA (0.5–2 mM) to improve extraction recoveries of those compounds with a high number of primary amine groups such as NEO, as it has been recommended by other authors [38]. In addition to a slight improvement on the recoveries (12 % for NEO and 10 % for gentamicins), the variability of the extraction yield was reduced from over 35 % (without EDTA) to below 14 % when adding EDTA, and the peak efficiency improved for the lastly eluting compounds (for NEO, peak width decreased close to 0.5 min). So, a 1:1 mixture of ACN and 5 % aqueous TCA containing 2 mM EDTA is proposed as extraction solvent for the analysis of aminoglycosides, obtaining extraction recoveries between 64 and 96 % for all compounds.

In order to evaluate matrix effects, blank sample extracts spiked at $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ after sample treatment were injected in the LC-MS/MS system and the chromatographic performance was compared with that of standards prepared in the extraction solvent (ACN:5 % aqueous TCA with 2 mM EDTA, 1:1 v/v). There was no significant peak distortion for the early eluting compounds, even though the sample solvent had higher elution

strength (50 % ACN) than the mobile phase at the initial chromatographic conditions (85 % ACN). However, significant matrix suppression was observed for most of the compounds (41–83 %, expressed as the difference between the intensities of the solvent-based standard and the matrix-based standard divided by the intensity of the solvent-based standard). To reduce matrix effects, improve sensitivity and to avoid column contamination further clean-up and preconcentration of the samples were studied. As a first step, the behavior of different cation exchange SPE cartridges, Oasis MCX and WCX, were evaluated using solvent-based standards. With the strong cation exchanger (MCX) the elution of STR and DHSTR, which have strong base guanidine groups ($\text{p}K_{\text{a}} > 13$) in their structures [40], was not possible (recoveries below 5 %). Some authors used basic elution solvents with high ionic strengths to elute these compounds [13], however, these solvents were not compatible with the mixed-mode Obelisc R LC column used in this work. With the weak cation exchanger (WCX) low retentions for most of the AGs (especially SPC) and recoveries below 30 % were generally obtained. This might be because the presence of ACN in the extraction solvent affected pH scale modifying $\text{p}K_{\text{a}}$ values of both bases (compounds) and acids (sorbent) in opposite directions and making difficult to select an adequate pH for retention. For these reasons, the preconcentration step was discarded and only clean-up of the extract was performed using Oasis HLB cartridges. Matrix interferences were retained and the highly polar AGs percolated being collected directly in the eluate. With this treatment, matrix suppression decreased to 21, representing a reduction up to 60 % for HYG, DHSTR, and AMIK. Nevertheless, for gentamicins a reduction of only 10 % was observed and strong matrix suppression for some

compounds such as NEO and PARO (~60 %) occurred. For these reasons, matrix-matched calibration was performed to correct both extraction recovery and matrix effects.

Method performance and application

Quality parameters such as the limit of detection, precision, and linearity were estimated for the developed LC-MS/MS method using SRM as acquisition mode. The obtained instrumental quality parameters are summarized in Table 2. Instrumental limits of detection (ILODs) based on a signal-to-noise ratio of 3:1 of the confirmation transition were estimated by injecting 20 μL of standard solutions at low concentration levels (down to 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$). ILODs at the low pg level (from 3 to 30 pg injected) were obtained (Table 2), with slightly higher values for those compounds eluting later with higher water content in the mobile phase that hinders ionization. Also, the compounds that are strongly retained in the column are more prone to be multiply charged, increasing the number of potential precursors and thus decreasing the intensity of SRM transitions. Good linearity with a correlation coefficient (R^2) better than 0.995 for the calibration curves in the working range (6 concentration levels ranging from 5 to 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) was observed for all the studied compounds. Run-to-run ($n=6$) and day-to-day ($n=6$, 3 days) precisions were evaluated at two concentration levels (low: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$; high: 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and the relative standard deviations calculated for the concentration were always lower than 11 %. Regarding retention time

precision, the RSD% values for the run-to-run (Table 2) were lower than 1.1 % for all analytes. However, for the day-to-day %RSDs increased up to 2.4 % specially for the lastly eluting compounds, although they could be reduced to below 1.5 % if the retention time was corrected using an internal standard. The relatively high %RSDs in retention time precisions can be related to the difficulty to condition the column, even if long conditioning times (>1 h) are used as recommended by the manufacturer. Finally, the evaluation of ion ratio precision provided RSD% values below 13 % ($n=6$).

Method performance was assessed through the evaluation of quality parameters such as method limits of quantitation (MLOQs), precision, accuracy and limit of decision ($CC\alpha$), and detection capability ($CC\beta$) using blank spiked samples. The values for the studied compounds are listed in Table 3. The MLOQs, based on a signal-to-noise ratio of 10:1, were calculated by spiking blank samples at low concentration levels (down to 0.5 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The resulting values were in the low $\mu\text{g kg}^{-1}$ level (1–50 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and in general were slightly higher for veal, probably due to higher matrix suppression. These values are below the MRL values (50–1,000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) established for these compounds, and similar or better than those obtained in other published methods that used either ion-pair chromatography (0.5–308 $\mu\text{g kg}^{-1}$) [5, 11–13, 41–44] or HILIC (2–264 $\mu\text{g kg}^{-1}$) [20, 21, 38, 39]. Repeatability of the method was evaluated by the analysis of six replicates of the three studied matrices spiked at two levels (50 and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and for the concentration RSD% values were always lower than 15 % for the low concentration level

Table 2 Instrumental quality parameters

Compound	LOD (pg)	Run-to-run precision RSD(%)			Day-to-day precision RSD(%)			Ion ratio RSD(%)
		Concentration		Retention time	Concentration		Retention time	
		Low-level ^a	High-level ^b		Low-level ^a	High-level ^b		
AMIK	8	6	3	0.3	11	6	0.5	10
APRA	20	9	4	0.4	10	6	1.4	12
DHSTR	7	4	1	0.2	9	3	0.7	11
GENC1	5	8	5	0.5	10	6	0.9	7
GENC1a	8	8	5	0.3	10	5	1.2	11
GENC2	30	–	7	0.9	–	8	1.7	13
HYG	5	4	1	0.7	10	2	0.8	6
KANA	8	3	2	0.8	10	4	1.0	7
NEO	10	9	6	0.9	10	9	2.2	11
PARO	10	10	3	1.1	10	4	1.9	6
SPC	3	4	2	0.7	9	7	0.7	2
STR	7	2	2	0.3	9	5	0.7	9
TOB	15	7	2	0.2	10	4	2.2	9

^a Low concentration level: 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$

^b High concentration level: 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$

Table 3 Method quality parameters (all concentrations expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$)

	Veal						Pork							
	MLOQ	Precision (%RSD)		Accuracy (%Rel. error)		Ion ratio Rel. error (%RSD)	MRL	CC α	CC β	MLOQ	Precision (%RSD)		Accuracy (%Rel. error)	
		Low-level ^a	High-level ^b	Low-level ^a	High-level ^b						Low-level ^a	High-level ^b	Low-level ^a	High-level ^b
AMIK	10	6	3	15	4	5 (3)	n.d.	—	5	13	4	12	6	
APRA	30	10	7	22	9	8 (5)	1,000	1,174	40	14	5	21	4	
DHSTR	10	3	4	8	5	2 (2)	500	530	2	7	4	7	5	
GENC1	10	8	6	14	6	10 (4)	50	55.9	5	8	5	15	7	
GENC1a	15	11	5	10	5	7 (2)	50	58.2	15	9	5	16	3	
GENC2	20	10	9	16	4	7 (7)	50	55.5	20	15	10	18	7	
HYG	10	12	4	15	5	6 (1)	n.d.	—	5	9	5	11	4	
KANA	15	5	2	11	4	10 (7)	100	113	5	5	1	12	5	
NEO	50	14	9	22	7	6 (9)	500	526	25	15	4	12	4	
PARO	50	15	6	23	5	7 (11)	500	527	25	12	8	17	5	
SPC	10	5	1	12	2	5 (8)	300	327	3	10	5	7	4	
STR	5	7	4	10	6	2 (5)	500	545	10	10	6	11	3	
TOB	20	6	1	13	7	2 (2)	n.d.	—	20	15	4	9	3	

	Pork						Chicken							
	Ion ratio Rel. error (%RSD)	MRL	CC α	CC β	MLOQ	Precision (%RSD)	Accuracy (%Rel. error)	Ion ratio Rel. error (%RSD)	MRL	CC α	CC β	MLOQ	Precision (%RSD)	Accuracy (%Rel. error)
AMIK	5 (3)	n.d.	—	—	5	4	12	4 (7)	n.d.	—	—	8	8	—
APRA	7 (12)	n.d.	—	—	30	15	22	6 (8)	n.d.	—	—	5	5	—
DHSTR	2 (3)	500	569	638	1	5	9	3 (2)	n.d.	—	—	3	3	—
GENC1	5 (4)	50	54.3	58.7	5	7	16	7 (3)	n.d.	—	—	4	4	—
GENC1a	6 (8)	50	60.8	71.6	15	8	14	6 (7)	n.d.	—	—	8	8	—
GENC2	8 (2)	50	55.3	60.6	20	14	17	9 (11)	n.d.	—	—	7	7	—
HYG	5 (3)	n.d.	—	—	5	6	7	6 (4)	n.d.	—	—	3	3	—
KANA	6 (3)	100	114	128	10	5	8	8 (8)	100	132	164	4	4	—
NEO	7 (6)	500	583	666	20	12	14	9 (6)	500	570	640	4	4	—
PARO	9 (3)	500	562	624	50	12	23	8 (10)	500	535	569	9	9	—
SPC	2 (7)	300	335	370	2	5	8	5 (9)	300	311	322	4	4	—
STR	1 (6)	500	568	635	10	8	10	3 (8)	n.d.	—	—	5	5	—
TOB	1 (4)	n.d.	—	—	20	12	15	1 n	n.d.	—	—	4	4	—

n.d. not defined

^aLow concentration level: 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$

^bHigh concentration level: 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$

and below 10 % for the high concentration level in all matrices. Also, the retention time precision was comparable to that obtained in the instrumental method assessment and significant differences between the three matrices were not observed. Accuracy, expressed as relative error, was also evaluated at two levels (50 and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and relative errors below 23 % for the high concentration level and below 10 % for the high concentration level in all matrices were obtained. Ion ratios were comparable to those of the standards (relative errors below 10 %) with precisions below 12 % (RSD%), indicating that matrix interferences that could co-elute with the monitored compounds did not significantly affect method performance. The $CC\alpha$ and $CC\beta$ for regulated compounds were evaluated by analyzing blank samples spiked at the MRL level indicated in Table 3, following the European Decision Directive [27]. $CC\alpha$ was calculated as $CC\alpha = \text{MRL} + 1.64 \cdot S$, being S the standard deviation for the samples spiked at the MRL level. $CC\beta$ was then calculated as $CC\beta = CC\alpha + 1.64 \cdot S$, using the same standard deviation, since the $CC\alpha$ value is close enough to the MRL. Finally, when blank samples were analyzed, no signals at intensities above three times the S/N at the retention time for the compounds were observed, demonstrating the good selectivity and specificity of the developed method.

Lastly, 27 samples of meat products from Spanish local supermarkets were analyzed. These samples covered a representative range of typical Spanish raw and processed meat products including minced meat and sausages of veal, pork, and chicken. These samples were processed as described in the experimental section and analyzed in triplicate by the LC-MS/MS method proposed. When residues of AGs were detected the identification criteria was based on the presence of chromatographic peaks for both transitions (qualifier and quantifier) at the same retention time (three identification

points), with a deviation in the retention time lower than 2.5 % and a deviation in the ion ratio lower than 20 % in comparison to that of a matrix-matched standard injected that same day. The quantitation was performed by matrix-matched calibration to correct both matrix effects and sample treatment recoveries since labeled standards were not commercially available. Among the 27 samples analyzed, only in one frankfurter sausage sample (Fig. 5) were GENC1 and GENC2 identified at a concentration below the MLOQ (5 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$, respectively). The gentamicin mixture is one of the most used aminoglycoside antibiotics for the treatment of bacterial infections in swine, and due to their high tissue affinity, low level of residues of these compounds might be present in food. However, the amount found in the frankfurter sample was below the MRL established by the EU (50 $\mu\text{g kg}^{-1}$), so it is safe for human consumption.

Conclusions

The use of a mixed-mode Obelisc R column, combining reversed-phase, HILIC, and cation exchange mechanisms, is proposed for the chromatographic separation of AGs. The separation of 13 AGs is achieved in less than 10 min using a mobile phase of ACN:aqueous formic acid, without the addition of ion-pair reagents or highly concentrated buffers. For LC-MS coupling, H-ESI at 300 °C is proposed to enhance sensitivity of $[M+H]^+$ by increasing thermal desolvation. Additionally, at these conditions the intensity of the double charged species is reduced. In addition to $[M+H]^+$ and $[M+2H]^{2+}$ ions, the formation of hydrated forms of the carbonyl groups of STR and SPC is observed in their mass spectra, probably due to extreme pH conditions in the electrospray

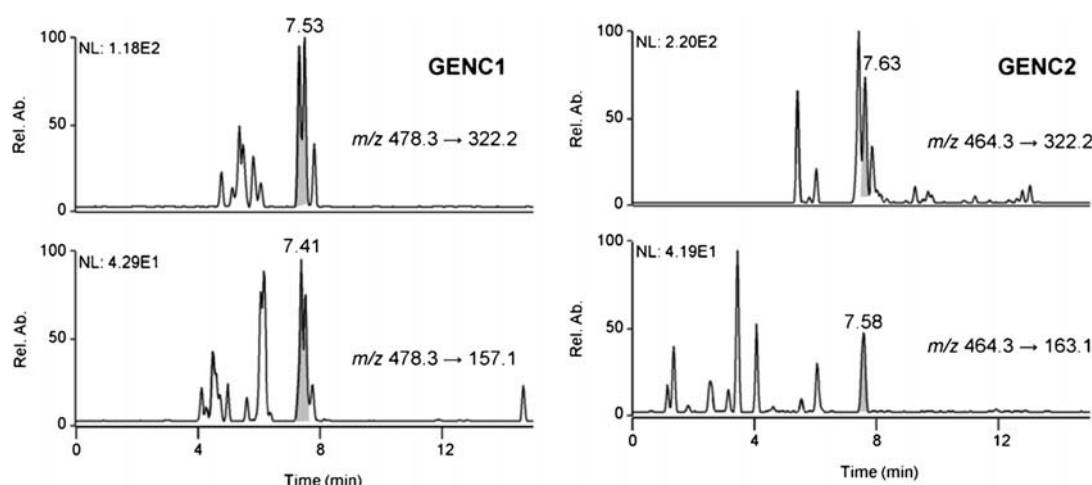


Fig. 5 LC-MS/MS chromatogram of a frankfurter sample, positive for GENC1 (left) and GENC2 (right) at concentrations below the MLOQ (5 and 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively)

charged droplets. Regarding tandem mass spectrometry, for STR and DHSTR, accurate mass measurements allowed to propose a new mechanism based for the formation of product ions at m/z 246 and 221 based on the losses of streptobiosamine and ammonia or cyanamide. A very quick and effective sample treatment based on a clean-up with hydrophilic-lipophilic-balanced SPE cartridges is recommended for the analysis of these compounds in several meat products. MLOQs ranging from 1 to 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ were obtained for the compounds in all matrices, which are below the established MRLs. The applicability of the method has been proved by analyzing a wide range of spiked food meat products such as frankfurter, sausages, and minced meat from veal, pork, and chicken. For quantitation, matrix-matched calibration is required to correct matrix effects.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support received from Spain's Ministry of Science and Technology under project CTQ2012-30836. Élida Alechaga is grateful to Spain's Ministry of Education for an FPU grant. The authors also wish to thank Cromlab (Spain) for kindly providing the chromatographic column.

References

1. Stead DA (2000) Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J Chromatogr B* 747:69–93
2. Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, Laganà A, Mele M, Nazzari M (2005) Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1067:93–100
3. European Commission (2003) 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 Communities* L268:29–43
4. Guthrie OW (2008) Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 249:91–96
5. Cherlet M, De Baere S, De Backer P (2007) Quantitative determination of dihydrostreptomycin in bovine tissues and milk by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42:647–656
6. European Commission (2009) Council Regulation (EEC) 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 Communities* L15:1
7. Blasco C, Picó Y, Torres CM (2007) Progress in analysis of residual antibacterials in food. *TrAC Trends Anal Chem* 26:895–913
8. Bogialli S, Di Corcia A (2009) Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Anal Bioanal Chem* 395:947–966
9. McGlinchey TA, Rafter PA, Regan F, McMahon GP (2008) A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal Chim Acta* 624:1–15
10. Gauguain-Juhel M, Delepine B, Gautier S, Fourmond MP, Gaudin V, Hurtaud-Pessel D, Verdon E, Sanders P (2009) Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Addit Contam* 26:1459–1471
11. Róna K, Klausz G, Keller E, Szakay M, Laczay P, Shem-Tov M, Székely-Körmöczy P (2009) Determination of paromomycin residues in turkey tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877:3792–3798
12. Hornish RE, Wiest JR (1998) Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 812:11
13. Kaufmann A, Butcher P, Maden K (2012) Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Anal Chim Acta* 711:46–53
14. Almeida MP, Rezende CP, Souza LF, Brito RB (2012) Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine and swine kidney through liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 29:517–525
15. Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, Nunez A, Dutko T, Ng C, Bluhm L (2013) Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1313:103–112
16. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service, R01b: screening and confirmation of aminoglycosides by LC-MS/MS, chemistry laboratory guidebook, April 2013 <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/science/laboratories-and-procedures/guidebooks-and-methods/chemistry-laboratory-guidebook>. Accessed Jan 2014
17. Alpert AJ (1990) Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 499:177–196
18. Kahsay G, Song H, Van Schepdael A, Cabooter D, Adams E (2014) Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) in the analysis of antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* 87:142–154
19. Bohm DA, Stachel CS, Gowik P (2013) Validation of a method for the determination of aminoglycosides in different matrices and species based on an in-house concept. *Food Addit Contam* 30:1037–1043
20. Kumar P, Rubies A, Companyo R, Centrich F (2012) Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography–tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 35:2710–2717
21. Kumar P, Rubies A, Companyo R, Centrich F (2012) Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. *J Sep Sci* 35:498–504
22. Chen Y, Hu X, Xiao X (2010) Sample preparation for determination of neomycin in swine tissues by liquid chromatography–fluorescence detection. *Anal Lett* 43:2496–2504
23. Suhren G, Knappstein K (1998) Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods. *Analyst* 123:2797–2801
24. Pyun CW, Abd El-Aty AM, Hashim MM, Shim JH, Lee SK, Choi KD, Park KH, Shin HC, Lee C (2008) Monitoring of streptomycin and dihydrostreptomycin residual levels in porcine meat press juice and muscle via solid-phase fluorescence immunoassay and confirmatory analysis by liquid chromatography after post-column derivatization. *Biomed Chromatogr* 22:254–259
25. Kotretsou SI (2004) Determination of aminoglycosides and quinolones in food using tandem mass spectrometry: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44:173–184
26. Grahek R, Zupancic-Kralj L (2009) Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 50:1037–1043
27. (2002) Commission Decision (EC) No. 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the

- performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Communities L* 221:8
28. Lammerhofer M, Richter M, Wu J, Nogueira R, Bicker W, Lindner W (2008) Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. *J Sep Sci* 31:2572–2588
 29. Novakova L, Solichova D, Solich P (2009) Hydrophilic interaction liquid chromatography–charged aerosol detection as a straightforward solution for simultaneous analysis of ascorbic acid and dehydroascorbic acid. *J Chromatogr A* 1216:4574–4581
 30. Bu X, Skrdla PJ, Dormer PG, Berezinski Y (2010) Separation of triphenyl atropisomers of a pharmaceutical compound on a novel mixed mode stationary phase: a case study involving dynamic chromatography, dynamic NMR and molecular modeling. *J Chromatogr A* 1217:7255–7264
 31. Oertel R, Neumeister V, Kirch W (2004) Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J Chromatogr A* 1058:197–201
 32. Oertel R, Renner U, Kirch W (2004) Determination of neomycin by LC–tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J Pharm Biomed Anal* 35:633–638
 33. Bock K, Pedersen C, Heding H (1974) Carbon-13 NMR spectroscopic study of α - and β -streptomycin. *J Antibiot* 27:139–140
 34. Girod M, Moyano E, Campbell DI, Cooks RG (2011) Accelerated bimolecular reactions in microdroplets studied by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Chem Sci* 2:501
 35. Zhu WX, Yang JZ, Wei W, Liu YF, Zhang SS (2008) Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *J Chromatogr A* 1207:29–37
 36. Goolsby BJ, Brodbelt JS (2000) Analysis of protonated and alkali metal cationized aminoglycoside antibiotics by collision-activated dissociation and infrared multi-photon dissociation in the quadrupole ion trap. *J Mass Spectrom* 35:1011–1024
 37. Hu P, Chess EK, Brynjelsen S, Jakubowski G, Melchert J, Hammond RB (2000) Collisionally activated dissociations of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and their application in the identification of a new compound in trombramycin samples. *J Am Soc Mass Spectrom* 11:200–209
 38. Ishii R, Horie M, Chan W, MacNeil J (2008) Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 25:1509–1519
 39. Chiaoan C, Koesukwiwat U, Yudthavorasit S, Leepipatpiboon N (2010) Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. *Anal Chim Acta* 682:117–129
 40. Gremilogianni AM, Megoulas NC, Koupparis MA (2010) Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk based on mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1217:6646–6651
 41. Cherlet M, De Baere S, De Backer P (2000) Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35:1342–1350
 42. Berrada H, Molto JC, Manes J, Font G (2010) Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. *J Sep Sci* 33:522–529
 43. Bousova K, Senyuva H, Mittendorf K (2013) Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1274:19–27
 44. Hurtaud-Pessel D, Jagadeshwar-Reddy T, Verdon E (2011) Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument. *Food Addit Contam* 28:1340–1351

2.2.3. ARTICLE CIENTÍFIC III

Simultaneous analysis of kasugamycin and streptomycin in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Analytical Methods (2015) **7**, 3600-3607

Cite this: *Anal. Methods*, 2015, 7, 3600

Simultaneous analysis of kasugamycin and streptomycin in vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Élida Alechaga, Encarnación Moyano* and M. Teresa Galceran

In this work an LC-MS/MS method has been developed for the simultaneous analysis of kasugamycin (KAS) and streptomycin (STR) in vegetable samples. The use of a mixed-mode HPLC column and a ternary mobile phase acetonitrile:water:0.5% aqueous formic acid in gradient elution mode are proposed to provide enough retention and resolution for these highly polar compounds. Heated-electrospray ionization (H-ESI) has been used to ionize KAS and STR when coupling liquid chromatography to mass spectrometry. In contrast to what happens with most aminoglycosides, KAS only showed singly charged ions in the full-scan mass spectrum. The $[M + H]^+$ of both KAS and STR are proposed as precursor ions for tandem mass spectrometry since more stable product ions and better ion ratio precisions are obtained. Fragmentation of KAS has been studied, showing that the cleavage of the glycosidic bonds provided the main product ions and the most abundant and selective ones are proposed for quantitation and confirmation purposes in MRM mode. The LC-MS/MS method developed has been applied to the analysis of vegetables. A simple clean-up procedure using hydrophilic-lipophilic-balanced cartridges was applied to several vegetable extracts from tomato, zucchini, chard and lettuce, obtaining recoveries >80% for both compounds. The high matrix suppression observed for KAS in all matrices was reduced by a 1:5 sample dilution with acetonitrile, providing a 100-fold improvement in sensitivity for this compound. Method quality parameters have been established for tomato matrices, obtaining method limits of quantitation in the low $\mu\text{g kg}^{-1}$ level (5–10 $\mu\text{g kg}^{-1}$) for both compounds, precisions expressed in %RSD better than 7% and accuracies expressed as relative error better than 8% at the 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ level, making this method suitable for routine analysis.

Received 11th February 2015

Accepted 23rd March 2015

DOI: 10.1039/c5ay00396b

www.rsc.org/methods

1. Introduction

Kasugamycin (KAS) and streptomycin (STR) are two aminoglycoside (AGs) antibiotics active against certain types of Gram-negative bacteria.¹ Their general structure includes several aminosugars linked by glycosidic bonds to a streptidine (STR) or a 2-deoxystreptamine (KAS) unit. STR, produced by *Streptomyces griseus*, was the first antibiotic applied against plant diseases² to control fire blight of apple and pear, wild fire of tobacco and bacterial leaf blight of the rice plant, among others, and its use is being reassessed due to the spread of resistant bacterial strains.³ KAS is produced by *Streptomyces kasugaensis*, it has a strong preventive effect against rice blast caused by *Piricularia oryzae*, and it has also been used for the treatment of bacterial diseases in bell peppers, tomatoes, citruses, cucumbers and many other fruiting crops. Moreover, the use of KAS as a substitute of STR for the treatment and prevention of fire blight in pears and apples has been suggested⁴ due to the low

toxicity of KAS to crops and mammals and its activity against resistant strains. Thus, residues of these aminoglycosides might be present in fruits and vegetables.

Since public concern over pesticide residues in foods has become an important issue, recommended maximum residue levels (MRL) for these compounds in agricultural products have been established. Nevertheless, different levels have been set depending on the food commodity and the country. For instance, in the United States MRLs for KAS have been set at 0.04 mg kg^{-1} in fruiting crops and at 0.05 mg kg^{-1} for apples⁵ whereas for STR the MRLs range from 0.25 to 0.5 mg kg^{-1} , depending on the matrix.⁶ In the European Community their use is not authorised since 2005⁷ and thus a default MRL of 0.01 mg kg^{-1} is recommended.⁸

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry is the analytical technique of choice for the analysis of KAS and STR, which are highly hydrophilic compounds that lack chromophore groups. Due to the amino groups present in their structures, both STR and KAS are poorly retained in reversed-phase columns such as C18^{9–11} and for this reason, alternative chromatographic separation modes such as ion pair liquid chromatography (IPLC), hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain. E-mail: encarna.moyano@ub.edu; Fax: +34 934021233; Tel: +34 934021286

mixed-mode chromatography have been used. The analysis of KAS presents a high analytical challenge and this compound is not currently included in the analysis of other AGs. In fact, only two studies have been published dealing with the determination of KAS in foods. The first one proposes a method for the analysis of both KAS and STR, and other AGs in animal tissues, milk and eggs using IPLC with trifluoroacetic acid¹² and in the second one, KAS is determined in soils and chili peppers¹³ using HILIC. This last study is the only one published regarding the analysis of KAS in vegetables. Moreover, most of the developed methods for STR have been established for its determination in foods from an animal origin. Some of them use IPLC with ion pair reagents like heptafluorobutyric acid,^{14–20} perfluoropentanoic acid,²¹ and trifluoroacetic acid,¹² while others use HILIC, often with high buffer concentrations in the mobile phase, such as ammonium acetate or formate at concentrations between 150 and 200 mM, and with percentages of formic acid ranging from 0.1 to 1%.^{22–26} Additionally, mixed-mode chromatography with low ionic strength mobile phases has also been proposed for the analysis of STR and other AGs in meat.²⁷ However, only two methods dealing with the analysis of STR in fruits and vegetables can be found in the literature. One of these studies proposes the use of IPLC with heptafluorobutyric acid as an ion pair reagent for the determination of STR and tetracycline in pomegranate²⁸ and the other one applies HILIC to determine STR in apples.²⁹

All these methods use electrospray (ESI) in positive mode as the ionization technique because protonation is favored by the presence of amine groups in their chemical structure. Low resolution analyzers such as triple quadrupole^{12–17,19–21,24–27,29} and quadrupole-ion trap^{22,28} combined with multiple reaction monitoring (MRM) acquisition have been used to determine KAS and STR at low concentration levels. The fragmentation pathways of STR have been studied,^{30,31} but to the best of our knowledge, the collision-induced dissociation (CID) mass fragmentation and the product ion assignment for KAS have not been proposed. Moreover, when coupling HILIC and IPLC methods to mass spectrometry, the presence of ion pair reagents and the high concentration of salts needed for ion exchange chromatography or HILIC could affect the performance of the mass spectrometric systems in both sensitivity and maintenance. So there is a need for LC-MS methods to analyze aminoglycosides that avoid the use of ion pair reagents or high concentration buffers in the mobile phase.

The aim of this work is to develop a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of KAS and STR, which are the only aminoglycoside antibiotics used as pesticides, in vegetables. For this purpose, the use of a mixed-mode chromatographic column that combines different retention mechanisms is evaluated in order to retain and separate both compounds without using ion pair reagents or high buffer concentrations as required for HILIC. The ionization of these compounds under electrospray conditions is studied and their tandem mass spectrometry fragmentation is discussed, especially for KAS which has not been previously reported. Finally, the proposed LC-MS/MS method is applied to the simultaneous determination of KAS and STR in vegetables at a low $\mu\text{g kg}^{-1}$ level.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

Streptomycin sulfate (STR, 98%, CAS no. 3810-74-0) and kasugamycin hydrochloride hydrate (KAS, 79%, CAS no. 19408-46-9) were purchased from Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Fig. 1 shows the structures of the studied compounds. The glycosidic rings of the structures have been labeled with capital letters to help with the discussion of the fragmentation patterns. Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate (98.5%) was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). LC/MS grade methanol, acetonitrile (ACN), water and trichloroacetic acid (TCA) (99.5%) were obtained from Fluka (Steinheim, Germany) and formic acid (98–100%) was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Stock standard solutions of KAS and STR (2.0 g kg^{-1}) were individually prepared by weight in water and stored at -20°C . Intermediate solutions were prepared monthly from a stock standard solution by appropriate dilution. As aminoglycosides present high sorption affinity to polar surfaces all contacts with glass were avoided and only a polypropylene laboratory material was used. All samples and mobile phases were filtered through $0.22 \mu\text{m}$ nylon membrane filters purchased from Whatman (Clifton, NJ, USA) to avoid clogging. Nitrogen (99.8% pure) supplied by a gas line from Air Liquide (Madrid, Spain) was used for the API source. The collision-induced dissociation gas used for tandem mass spectrometry experiments was high-purity argon (ALPHAGAZ 1 Ar) also from Air Liquide (Madrid, Spain). Sample clean-up was performed using Oasis HLB cartridges ($150 \text{ mg}, 6 \text{ cm}^3$) and extraction manifold from Waters (Milford, MA, USA). For the control of the pH of buffered solvents a pH meter Basic 20 from Crison Instruments (Alella, Spain) was used.

2.2. Sample treatment

Samples of tomato, chard, lettuce, zucchini and red pepper bought from local supermarkets in Barcelona (Spain) were cut, ground and homogenized with an Ultraturax T25 basic (IKA-Werke, Staufen, Germany) and kept frozen at -20°C until analysis. Subsamples of 2 g were weighed in a 15 mL polypropylene centrifuge tube (Serviquimia, Barcelona, Spain) and extracted in a Sonorex RK100 ultrasonic bath (Bandelin Electronic GmbH & Co., Berlin, Germany) for 10 min with 2 mL of acetonitrile : aqueous 5% TCA, 2 mM EDTA (1 : 1 v/v) and then centrifuged at 4000 rpm (Selecta-Macrotronic, J.P. SELECTA S.A., Abrera, Spain) for 10 min. The supernatant was then loaded onto an Oasis HLB SPE cartridge previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL

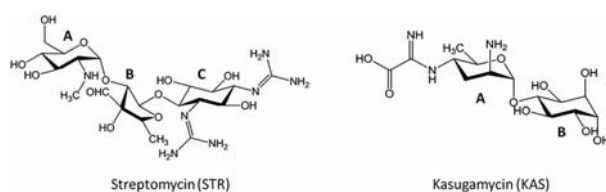


Fig. 1 Structures and acronyms of the studied compounds.

of water for clean-up. After discarding the first 0.75 mL of the eluate the rest was collected and filtered through a 0.22 μm nylon membrane. Finally, 200 μL of the filtered extract were diluted with 800 μL of acetonitrile and injected into the LC-MS/MS system. Matrix-matched calibration standards were prepared with blank matrix samples spiked at 6 concentration levels ranging from 10 to 500 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and submitting them to the same sample treatment described above.

2.3. HPLC-MS/MS

HPLC separation was performed on an Open Accela liquid chromatography system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA), equipped with a quaternary UHPLC pump, and a CTC PAL autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). An Obelisc R (150 \times 2.1 mm, 5 μm) column (SIELC Technologies, Prospect Heights, IL, USA) was used for the proposed method. Mobile phases consisted of a mixture of acetonitrile (A), aqueous 0.5% formic acid (B) and water (C). The chromatographic initial conditions were 85% A, 3.8% B and 11.2% C, and a linear ramp was performed in 1.5 min to 85% A, 7.5% B and 7.5% C. A second linear ramp was carried out in 4.5 min to 5% A, 50% B and 45% C and these conditions were maintained for 4 min, moving back to initial conditions in 2 min and equilibrating the column for 8 min. The flow rate was 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ and the column was kept at ambient temperature. The injection mode was a full loop with a 5 μL loop.

Mass spectrometry was performed in a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific, San José, CA) triple quadrupole mass spectrometer equipped with heated-electrospray ionization (H-ESI) as the ionization source. The electrospray voltage was set at 3.0 kV and the temperatures of the ion transfer tube and the vaporizer were both held at 300 $^{\circ}\text{C}$. Sheath gas, auxiliary gas and ion sweep gas flow rates were 35, 10 and 0 a.u. (arbitrary units), respectively. In tandem mass spectrometry experiments, both quadrupoles worked in low resolution mode (0.7 full width at half maximum, FWHM), the collision gas pressure was 1.5 mTorr and the collision energies (CE) ranged from 11 eV to 18 eV. Two transitions were monitored for each compound using a dwell time of 250 ms (1 scan per cycle time). Transitions for quantitation and confirmation purposes and the corresponding collision energies and ion ratios are listed in Table 1. Other instrument settings were optimized by infusion of standard solutions (10 mg L^{-1}) at a flow rate of 5 $\mu\text{L min}^{-1}$, using the built-in syringe pump and a zero dead volume T-piece to mix them with the mobile phase.

3. Results and discussion

3.1. HPLC-MS/MS

Due to the high polarity of KAS and STR their analysis by LC is usually performed by IPLC or HILIC. However, the use of these chromatographic methods requires the addition of ion pair reagents or buffers at high concentration to the mobile phase, thus making difficult the compatibility with mass spectrometry. In this work a mixed-mode Obelisc R column has been used to explore the simultaneous chromatographic separation of KAS and STR, as this column has been proposed for the separation of STR and other AGs using gradient elution with a mobile phase composed of a mixture of acetonitrile:1% aqueous formic acid:water.²⁷ These conditions worked well for STR but KAS eluted too early in the chromatogram due to the high elution strength of the mobile phase; so alternative chromatographic conditions were optimized. To this end, different aqueous formic acid gradients were tested. When the initial formic acid concentration was lowered, the retention of KAS increased because at low pHs hydrophilic interaction is the prevailing retention mechanism, enhancing the retention with the decrease of the ionic strength. However, the retention and peak width of STR also increased for the same reason, resulting in poor chromatographic efficiency (peak width >2 min) and long analysis times. To achieve good retention and peak efficiency, a ternary gradient simultaneously decreasing acetonitrile and increasing the formic acid concentration was used, providing the optimal conditions. The optimized gradient has been indicated in the Experimental section and Fig. 2 shows the chromatogram obtained under those chromatographic conditions. As can be seen, the compounds were baseline separated in less than 6 minutes with a good peak shape and far enough from the elution front.

Regarding mass spectrometry, thermally assisted electrospray (H-ESI) was used as the ionization source in LC/MS, as it improved desolvation, especially with mobile phases with a high percentage of water. Full-scan mass spectra were studied to select the most adequate precursor ions for tandem mass spectrometry. The mass spectrum of KAS (Fig. 2) is very simple showing only the protonated molecule $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 380) and the loss of CO_2 from the protonated molecule due to in-source collision-induced dissociation (m/z 336). In contrast, the mass spectrum of STR (Fig. 2) is more complex, because STR has two guanidine groups with high $\text{p}K_{\text{a}}$ values (13.40 ± 0.70)³² that favored the generation of multiply charged ions. So, in the mass

Table 1 Tandem mass spectrometry working conditions. Selected SRM transitions, collision energies (CE), ion assignments and ion ratios

Compound	Retention time (min)	Precursor ion		Product ion		CE (eV)	Ion ratio
		m/z	Assignment	m/z	Assignment		
KAS	4.44	380.2	$[\text{M} + \text{H}]^+$	112.1	$[\text{M} + \text{H} - \text{B}_2 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2]^+$	18	Quantitation
				200.1	$[\text{M} + \text{H} - \text{B}_2]^+$	11	Confirmation
STR	5.07	582.3	$[\text{M} + \text{H}]^+$	263.1	$[\text{C}_2]^+$	31	Quantitation
				246.1	$[\text{C}_2 - \text{NH}_3]^+$	35	Confirmation

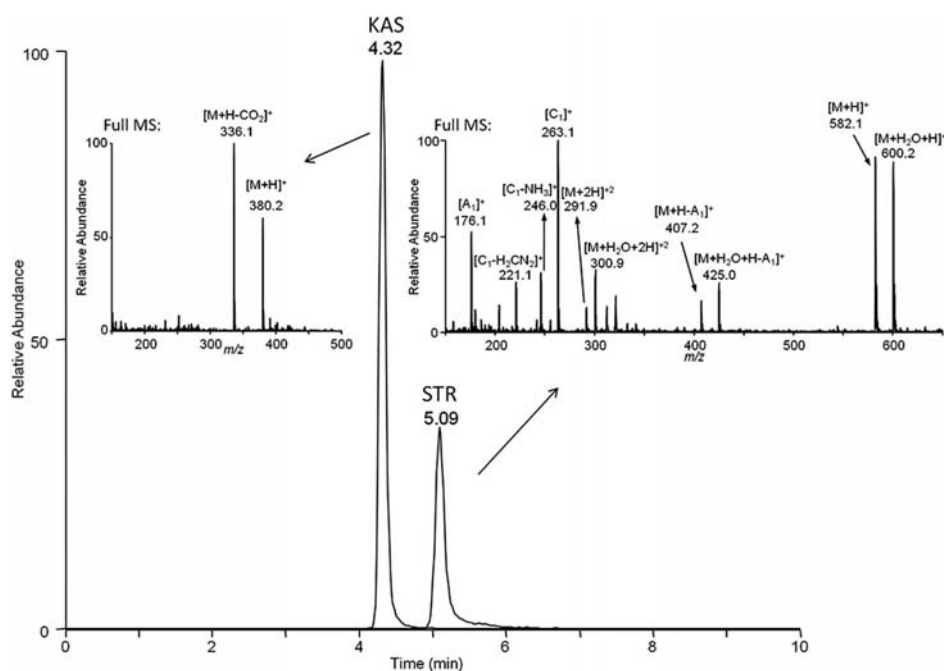


Fig. 2 Chromatogram of a standard mixture (100 ng g⁻¹) using the conditions given in the Experimental section and full-scan mass spectra of KAS and STR.

spectrum of STR the singly and doubly charged ions, $[M + H]^+$ and $[M + 2H]^{2+}$ (m/z : 582 and 292, respectively), due to protonation and also the singly and doubly charged ions due to the hydrated form of the aldehyde group, $[M + H_2O + H]^+$ and $[M + H_2O + 2H]^{2+}$ (m/z : 600 and 301 respectively), can be observed. Moreover, some in-source fragmentation from the cleavage of the glycosidic bonds also occurs (Fig. 2). The $[M + H]^+$ was selected as the precursor ion for tandem mass spectrometry since it showed the best fragmentation performance, leading to more stable product ions and better precisions than the doubly charged ions. As regards the hydrated form of the singly charged ion, it showed the unspecific loss of water as the most intense product ion, which is more susceptible to interferences than the fragmentation from the

protonated molecule. The chosen SRM transitions for STR are listed and assigned in Table 1. For KAS, the $[M + H]^+$ was also selected as the precursor ion and the triple quadrupole product ion scan spectrum is shown in Fig. 3. The fragmentation pattern of KAS has been discussed using the nomenclature defined by Goolsby and Brodbelt,³⁰ which proposes the use of the subscript "1" for the cleavage of the bond between the ring designated with the uppercase letter and the glycosidic oxygen, and the subscript "2" for that between the glycosidic oxygen and the next ring. As happens with most AGs, the main product ions of the $[M + H]^+$ of KAS involved the cleavage of the glycosidic bond (Fig. 3), whether arising from the loss of the glucose ring ($[M + H-B_2]^+$, m/z : 200) or from the combined loss of the glucose ring and the amino(imino)acetic side chain ($[M + H-B_2-C_2H_4O_2N_2]^+$,

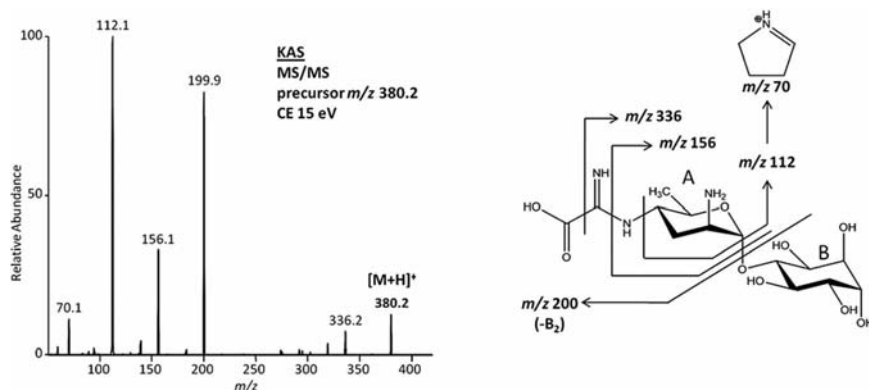


Fig. 3 Triple quadrupole product ion scan and fragmentation of KAS.

Table 2 Instrumental and method quality parameters

Instrumental quality parameters											
Run-to-run precision (%RSD, $n = 5$)											
Compound	LOD (pg)	Concentration		Retention time precision	Ion ratio precision	Day-to-day precision (%RSD, $n = 5, 3$ days)		Retention time precision	Ion ratio precision	Concentration	
		5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	150 $\mu\text{g kg}^{-1}$			5 $\mu\text{g kg}^{-1}$	150 $\mu\text{g kg}^{-1}$				
KAS	3	4.1	2.5	0.2	4.8	6.0	4.6	0.7	7.1	6.0	4.6
STR	8	3.6	1.5	0.3	6.7	6.7	3.2	0.4	8.9	6.7	3.2

Method quality parameters (tomato matrix)											
Precision (%RSD)											
MLOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Run-to-run ($n = 5$)		Day-to-day ($n = 5, 3$ days)		Accuracy (%rel. error)	Ion ratio	Precision (%RSD)		Rel. error (%)	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$
	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$	10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$			10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	100 $\mu\text{g kg}^{-1}$			
KAS	10	13	5.2	24	23	8.0	8.0	23	10	13	
STR	4	15	5.0	21	19	5.2	5.2	19	9.2	11	

m/z : 112). The presence of the carboxylic group in the side chain favored also the loss of CO_2 from the protonated molecule (m/z : 336) or from the $[\text{M} + \text{H} - \text{B}_2]^+$ (m/z : 156). Additionally, further cross-ring cleavage and rearrangement of the m/z 112 would yield the product ion at m/z 70. Fragmentation of KAS is shown in Fig. 3 and the elemental compositions of all product ions have been confirmed by MS/HRMS experiments in a Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) at a mass resolution of 35 000 FWHM (full width at half maximum) at m/z 200, obtaining mass errors below 2 ppm. The most abundant product ions, at m/z 112 and m/z 200, were selected for quantitation and confirmation, respectively, of KAS when working in MRM mode (Table 1).

Instrumental quality parameters including limits of detection (LOD), linearity and run-to-run and day-to-day precisions were calculated (Table 2). LODs, based on a signal-to-noise ratio of 3:1 for the confirmation transition, were estimated by injecting standard solutions at concentrations down to 0.1 $\mu\text{g kg}^{-1}$, obtaining results lower than 10 pg injected for both compounds. KAS provided slightly better instrumental sensitivity, probably because for this compound only one precursor ion was obtained in ESI in contrast to what happened to STR, where the total ion signal was split into different species. Standard calibration curves with 6 concentration levels between 5 and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ showed good linearity ($R^2 > 0.996$). Run-to run ($n = 5$) and day-to-day ($n = 5, 3$ days) precisions were calculated at two concentration levels, 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and were always lower than 7% for both compounds. Retention time precision was also evaluated in the same way as the concentration precision, and low values, even for the day-to-day precision (below 1%), were obtained. Regarding the ion ratio (relative areas for quantifier vs. qualifier transitions) precisions, the %RSD values were below 10% for both compounds.

3.2. Sample treatment

To analyse KAS and STR in vegetables, a sample treatment previously proposed for the analysis of STR and other AGs in meat²⁷ was evaluated, consisting in an extraction with an aqueous solvent containing a strong acid (TCA) and a chelating agent (EDTA) followed by a clean-up with hydrophilic-lipophilic-balanced cartridges (HLB). The clean-up with HLB cartridges served to retain the matrix coextractives that gave a cloudy and slightly coloured aspect to the extract. The highly polar AGs were not retained in this sorbent and eluted directly. Recoveries were evaluated by means of the analysis of blank tomato samples (2 g) spiked at 250 $\mu\text{g kg}^{-1}$, and good recoveries (>80%) were obtained for STR, which were similar to those obtained in the previous work. However, KAS, which had not been previously studied, was not recovered at all. Recoveries with solvent based standards were close to 100%, and when blank tomato extracts spiked after sample treatment were analysed poor results for KAS were also obtained. Thus, the lack of signal for KAS was due to high matrix suppression for this compound and not due to poor recoveries. Variations of the sample treatment method such as changes in the extraction solvent, or the use of other SPE strategies like ion-exchange cartridges not only failed to provide successful results for KAS

but also worsened the recoveries of STR as well; so alternative methods were sought. As a first step, the use of an ionization source less susceptible to matrix effects such as Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) was tested. Although the high polarity and low volatility of AGs would produce lower ionization efficiency than ESI, the decrease in the ion suppression might produce an overall improvement in sensitivity. In fact, the use of APCI has been previously proposed to overcome ion suppression due to ion pair reagents for the LC-MS/MS analysis of gentamicin impurities.³³ As expected, STR provided lower signal intensities in APCI than in ESI, but no signal was observed for KAS in APCI in both positive and negative modes. The lack of response of KAS might be explained by the presence of a carboxylic group in a side chain in KAS (Fig. 1) which might favor the formation of an internal hydrogen bond with the primary amino substituent in ring A that would make KAS difficult to ionize in APCI in both positive and negative modes. Anyway, as the ionization of KAS was not possible, the use of the APCI source was discarded.

As a second step, the sample extract was diluted with ACN. Blank vegetable samples (lettuce, zucchini, red pepper, chard and tomato) spiked at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ were submitted to the sample treatment and the obtained extracts were analysed without dilution and with dilution at 1 : 1, 1 : 5, and 1 : 10 with acetonitrile. For all the samples, an important increase in the response of KAS was achieved when diluting with acetonitrile, which allowed its detection. As an example, Fig. 4 shows the LC-MS/MS chromatograms of two aliquots of a blank tomato extract spiked with KAS and STR at $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ without dilution (A) and with dilution at 1 : 5 with ACN (B). As can be seen, the KAS response increased considerably after a 1 : 5 dilution, showing up to a 100-fold enhancement in signal intensity, which provided a significant decrease of the LODs allowing the detection of KAS at the European MRL value (0.01 mg kg^{-1}) which is the most restrictive one. Further dilution of the extracts did not provide an improvement in signal intensity, probably

because the decrease in signal due to dilution was higher than the improvement due to the reduction of matrix suppression. As a result, a 1 : 5 dilution of the extract is proposed for the analysis of KAS and STR in vegetable samples. As can be seen in Fig. 4, signal intensity of STR significantly decreased when diluting the sample, as apparently a lower matrix effect was affecting this compound. Nevertheless, the response of STR after the dilution is similar to that of KAS.

3.3. Method performance

Method quality parameters such as method limit of quantitation (MLOQ), run-to-run and day-to-day precisions, accuracy and ion ratio precision were evaluated using tomato samples free of the analytes as blank samples, and the obtained values are listed in Table 2. As KAS was affected by ion suppression, matrix-matched calibration was used for the quantitation of the samples. Matrix-matched calibration curves were prepared in the $10\text{--}500 \mu\text{g kg}^{-1}$ range by spiking blank tomato samples and submitting them to the sample treatment detailed in the experimental section. The MLOQs (signal-to-noise ratio of 10 : 1) were estimated by injecting samples spiked at low concentration values (below $10 \mu\text{g kg}^{-1}$). As can be seen in Table 2, in contrast to what happened with the instrumental LOD, the MLOQ obtained for STR was better than that for KAS, probably as a result of the higher matrix suppression that affected the latter. MLOQs were at or below the default MRL values established for these compounds in the European Union ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$), and far below the MRL allowed in other countries such as USA ($250 \mu\text{g kg}^{-1}$ for STR),⁶ Japan ($300 \mu\text{g kg}^{-1}$ for KAS)³⁴ or Canada ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$ for both compounds).^{35,36} MLOQs in the other vegetable matrices also were studied, and in all cases the results were below $15 \mu\text{g kg}^{-1}$ for both compounds, only being above the MRL in the European Union in red pepper matrices. To evaluate run-to-run precision, five replicate analyses of blank samples spiked at two concentration levels, $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ and

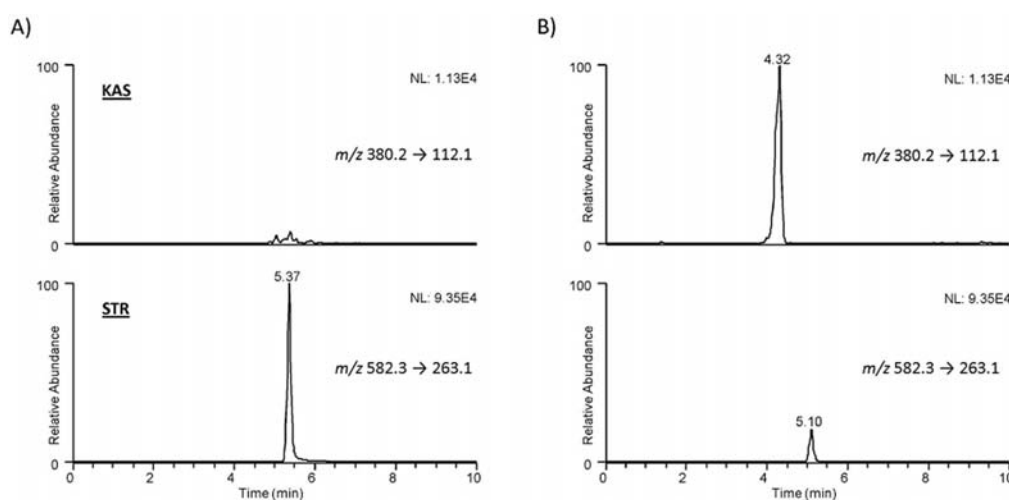


Fig. 4 LC-MS/MS chromatogram of a blank tomato extract spiked at the $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ level (A) without dilution and (B) with dilution at 1 : 5 with acetonitrile.

100 $\mu\text{g kg}^{-1}$, were performed. Day-to-day precision was calculated by analysing 5 replicates each day during three days at the same two concentration levels. %RSD values based on concentrations (Table 2) ranged from 13 to 24% for the low concentration level, and were below 8% for the high concentration level. Accuracy expressed as the relative error was also evaluated at the two concentration levels and can be seen in Table 2, KAS provided worse accuracies than STR for the low level (23% versus 15%), as it corresponded to the MLOQ for this compound (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Ion ratio relative errors with respect to those of standards were lower than 10% and ion ratio precisions were consistent with those obtained with standard solutions (below 13%). In comparison with previous literature works that analyze either KAS or STR in vegetables,^{13,28,29} the proposed method allows the simultaneous analysis of both compounds without losing sensitivity. Also, ion pair reagents are not needed for the chromatographic separation that favours MS performance and maintenance, and provides slightly better LODs than those reported from the analysis of KAS and STR in animal tissues.¹²

3.4. Method application

Over 24 vegetable samples, including tomato (2 samples), lettuce (2 samples), chard (2 samples), red pepper (2 samples), zucchini (2 samples) and pear (4 samples), purchased at local supermarkets were analyzed. No residues of KAS or STR were detected at levels above the MLOQ in any of the analyzed samples. This fact shows the compliance of the European Community regulations concerning the use of pesticides and the control of the presence of residues of pesticides in foods. Negative results were also found in the analysis of 10 tomato samples acquired from a vegetable garden that had been treated with both compounds. Although it was expected that some residues should have been found in these samples, the short extinction time of these compounds, which is lower than 6 days for KAS in chili peppers,¹³ might be a possible reason for the negative results. However, the method provided satisfactory results with spiked blank samples at levels below the MRLs established in most countries (Table 2), making it suitable for routine analysis in laboratories dealing with the control in countries where the use of this compounds as pesticides is allowed (e.g. USA and Canada) and also in imported and exported goods.

4. Conclusions

In this work a method is proposed for the simultaneous analysis of KAS and STR in vegetable samples. A baseline chromatographic separation, good peak shapes and short analysis time (less than 6 minutes) are achieved using a mixed-mode column and a ternary mobile phase composed of acetonitrile:water:0.5% aqueous formic acid in reversed gradient elution. Singly charged ions are proposed as precursors for tandem mass spectrometry since they show better fragmentation performance than the multiply charged ions. The CID MS/MS fragmentation of KAS was studied for the first time concluding that the main product ions arose from the cleavage of the glycosidic bonds. The simultaneous loss

of glucose and the amino(imino)acetic acid side chain (m/z : 112) was used for quantitation, whereas the loss of glucose (m/z : 200) was chosen for confirmation purposes. The high matrix suppression that affects the electrospray KAS response when analyzing vegetables can be greatly decreased by diluting the obtained extract at 1 : 5 with ACN, achieving a 100-fold improvement in signal intensity. Under the optimal working conditions the LC-MS/MS developed method provided MLODs lower enough to determine KAS and STR at the lower MRL established for them in all countries (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$). The applicability of the method has been assessed by analyzing spiked samples, and good method quality parameters have been obtained.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministry of Science and Technology under project CTQ2012-30836, and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain) under the project 2014 SGR-539.

References

- 1 D. A. Stead, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 2000, **747**, 69–93.
- 2 P. A. Worthington, *Nat. Prod. Rep.*, 1988, **5**, 47.
- 3 J. E. Adaskaveg, H. Förster and M. L. Wade, *Plant Dis.*, 2011, **95**, 448–454.
- 4 G. C. McGhee and G. W. Sundin, *Phytopathology*, 2011, **101**, 192–204.
- 5 40 Code of Federal Regulations 180.614, Revised as of July, 1st, 2013.
- 6 40 Code of Federal Regulations 180.245, Revised as of July, 1st, 2011.
- 7 European Commission, Commission decision 2005/303/EC of 31 March 2005 concerning the non-inclusion of cresylic acid, dichlorophen, imazamethabenz, kasugamycin and polyoxin in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances. Off. J. European Union L97:38.
- 8 European Commission, Regulation (EC) No. 396/2005 of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. Off. J. European Union L70:1.
- 9 T. A. McGlinchey, P. A. Rafter, F. Regan and G. P. McMahon, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **624**, 1–15.
- 10 S. Bogialli and A. Di Corcia, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **395**, 947–966.
- 11 G. Khasay, H. Song, A. Van Schepdael, D. Cabooter and E. Adams, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **87**, 142–154.
- 12 Y. Tao, D. Chen, H. Yu, L. Huang, Z. Liu, X. Cao, C. Yan, Y. Pan and Z. Yuan, *Food Chem.*, 2012, **135**, 676–683.
- 13 L. Lu, S. Zhao, L. Deng, Y. Chen, X. Liu and D. Li, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 2012, **89**, 649–653.
- 14 M. P. Almeida, C. P. Rezende, L. F. Souza and R. B. Brito, *Food Addit. Contam., Part A*, 2012, **29**, 517–525.

- 15 B. J. Berendsen, I. J. Elbers and A. A. Stolker, *Food Addit. Contam., Part A*, 2011, **28**, 1657–1666.
- 16 H. Berrada, J. C. Molto, J. Manes and G. Font, *J. Sep. Sci.*, 2010, **33**, 522–529.
- 17 M. Gbylik, A. Posyniak, K. Mitrowska, T. Bladek and J. Zmudzki, *Food Addit. Contam., Part A*, 2013, **30**, 940–948.
- 18 D. Hurtaud-Pessel, T. Jagadeshwar-Reddy and E. Verdon, *Food Addit. Contam., Part A*, 2011, **28**, 1340–1351.
- 19 A. Kaufmann, P. Butcher and K. Maden, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **711**, 46–53.
- 20 S. J. Lehotay, K. Mastovska, A. R. Lightfield, A. Nunez, T. Dutko, C. Ng and L. Bluhm, *J. Chromatogr., A*, 2013, **1313**, 103–112.
- 21 M. Gaugain-Juhel, B. Delepine, S. Gautier, M. P. Fourmond, V. Gaudin, D. Hurtaud-Pessel, E. Verdon and P. Sanders, *Food Addit. Contam., Part A*, 2009, **26**, 1459–1471.
- 22 D. A. Bohm, C. S. Stachel and P. Gowik, *Food Addit. Contam., Part A*, 2013, **30**, 1037–1043.
- 23 A. M. Gremiligianni, N. C. Megoulas and M. A. Koupparis, *J. Chromatogr., A*, 2010, **1217**, 6646–6651.
- 24 R. Ishii, M. Horie, W. Chan and J. MacNeil, *Food Addit. Contam., Part A*, 2008, **25**, 1509–1519.
- 25 P. Kumar, A. Rubies, R. Companyo and F. Centrich, *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 498–504.
- 26 P. Kumar, A. Rubies, R. Companyo and F. Centrich, *J. Sep. Sci.*, 2012, **35**, 2710–2717.
- 27 E. Alechaga, E. Moyano and M. T. Galceran, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 4941–4953.
- 28 M. R. Jadhav, S. C. Utture, K. Banerjee, D. P. Oulkar, R. Sabale and T. P. A. Shabeer, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 8491–8498.
- 29 D. A. Bohm, C. S. Stachel and P. Gowik, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **672**, 103–106.
- 30 B. J. Goolsby and J. S. Brodbelt, *J. Mass Spectrom.*, 2000, **35**, 1011–1024.
- 31 S. I. Kotretsov, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, **44**, 173–184.
- 32 *ACD/Labs Software, Version 11.02*, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, On, Canada.
- 33 R. Grahek and L. Zupancic-Kralj, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, **50**, 1037–1043.
- 34 Ministry of Health, Labour and Welfare. Positive List System for Agricultural Chemical Residues in Foods. Provisional MRLs List (Updated on February 5, 2007). <http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/positivelist060228/dl/index-1b.pdf>, accessed 3rd March 2015.
- 35 Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Proposed Maximum Residue Limit for Kasugamycin (PMRL 2013-01) of 22 February 2013. Catalogue number H113-24/2013-1E.
- 36 Health Canada Pest Management Regulatory Agency. Reevaluation decision for Streptomycin (RVD2008-26) of 29 July 2008. Catalogue number H113-28/2008-26E.

2.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS.

En aquest apartat de discussió de resultats es comenten i es discuteixen els resultats obtinguts en el desenvolupament dels mètodes de cromatografia de líquids per a l'anàlisi de fenícols i aminoglicòsids en mostres alimentàries inclosos a l'apartat 2.2 d'aquest capítol.

En aquesta tesi, s'ha comparat la separació cromatogràfica obtinguda pels quatre fenícols en columnes amb partícules de nucli sòlid (2,7 μm de diàmetre) amb fases estacionàries d'octadecil (C18), HILIC (sílice pura) i fenil-hexil, (Article I, Apartat 2.2.1). Per a ajudar a comparar els resultats, a la Figura 2.1 es mostren les separacions cromatogràfiques obtingudes en condicions òptimes (incloses a l'article) per als quatre fenícols en cadascuna de les columnes esmentades. Així mateix, a la Taula 2.2 s'inclouen alguns paràmetres cromatogràfics importants com ara les amplades de pic a mitja alçada ($w_{1/2}$), el nombre de plats (N) i els factors de retenció (k). Com es pot observar en aquesta taula, no és recomanable utilitzar la columna C18 (Figura 2.1 A) degut a la poca retenció del compost més polar (FFA, k 1,0) que obliga a augmentar el pH de la fase mòbil (tampons amb pH superior a 5,5) per tal de desplaçar l'equilibri de protonació de la florfenicol-amina (FFA) i afavorir la seva retenció. Ara bé, en aquestes condicions s'augmenta la desprotonació dels silanols lliures del suport de sílice, la qual cosa afavoreix la interacció i l'obtenció de pics amb cues. Treballant a un pH encara més elevat es podria afavorir més la retenció de la FFA, però també augmentaria considerablement la cua dels pics cromatogràfics dels compostos. Per tant, es va escollir un valor de pH de 5,5 com a òptim per a la fase mòbil emprada amb aquesta columna. L'eficàcia de la columna HILIC (Figura 2.1 B) per a la majoria dels compostos és molt baixa en comparació amb la de fase invertida (Taula 2.2). Aquest fet està d'acord amb les dades de la literatura que indiquen que, en general, s'obté una menor eficàcia en les columnes HILIC. En aquest sentit, els estudis de Gritti i Guiochon han posat de manifest que, atès que la difusió dels anàlits en la capa d'aigua adsorbida sobre la sílice és baixa, la resistència a la transferència de massa a la interfase sòlid-líquid condiciona l'eixamplament de banda (30%), encara que és la dispersió aparent (dispersió d'*eddy*) el

paràmetre que més afecta (70%) l'eficàcia en les columnes HILIC [Gritti i Guiochon, 2013].

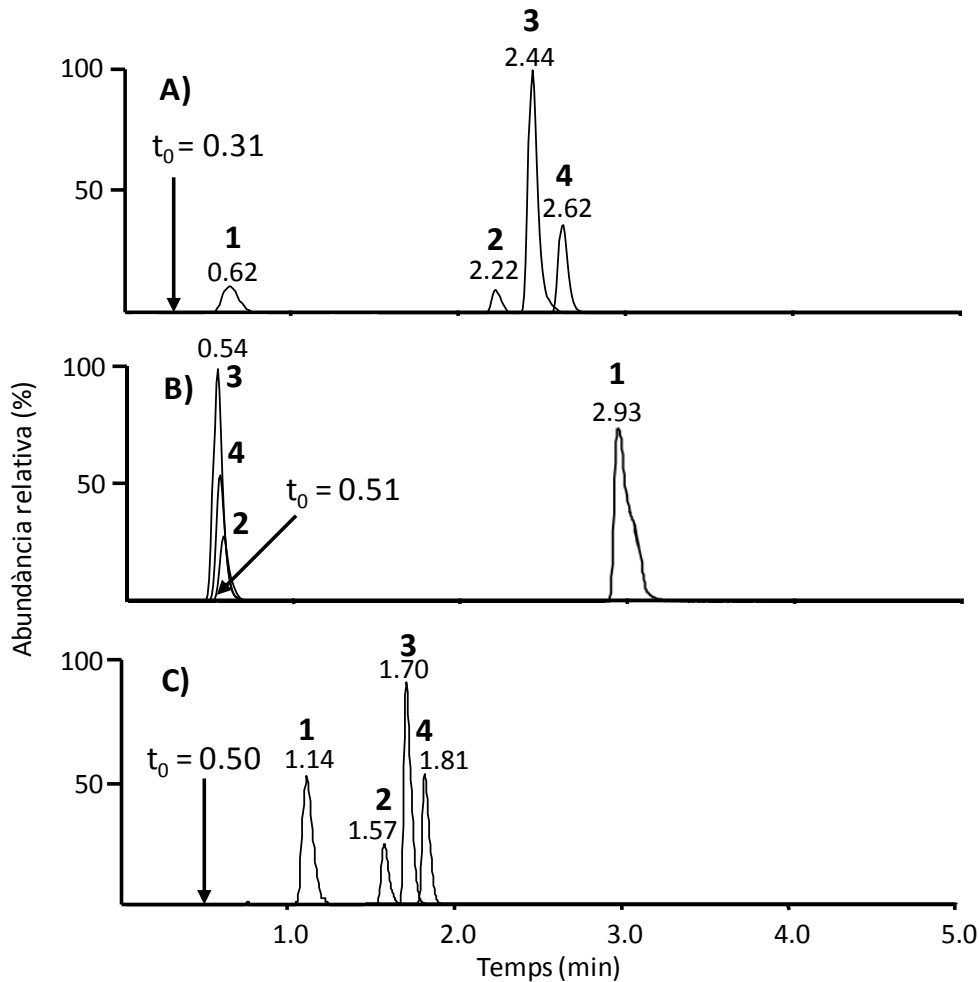


Figura 2.1. Separacions cromatogràfiques dels fenicols obtingudes en columnes de nucli sòlid amb fases estacionàries A) C18, B) HILIC sílice pura, C) fenil-hexil. Compostos: 1.- FFA, 2.- TAP, 3.- FF, 4.- CAP. Les característiques de les columnes i les condicions cromatogràfiques es troben a l'article científic I (Apartat 2.2.1).

Els millors resultats s'han obtingut amb la columna de fase estacionària fenil-hexil (Figura 2.1C), ja que permet la separació dels quatre fenicols en menys de dos minuts i amb unes eficàcies superiors o molt similars (FF) a les obtingudes en les altres columnes per als antibiòtics natius (Taula 2.2).

Taula 2.2. Paràmetres cromatogràfics obtinguts per als fenicols en les diferents columnes estudiades.

Columna	Compost	t_R (min)	k	w_{1/2} (s)	N
C18	CAP	2,62	7,5	4,1	8106
	TAP	2,22	6,2	3,6	7515
	FF	2,44	6,9	3,3	10985
	FFA	0,62	1,0	6,6	177
HILIC	CAP	0,55	0,1	3,3	558
	TAP	0,56	0,1	3,3	579
	FF	0,54	0,1	3,3	538
	FFA	2,93	4,7	6,1	4628
Fenil-hexil	CAP	1,81	2,6	2,5	10747
	TAP	1,57	2,1	2,5	8086
	FF	1,70	2,4	2,5	9480
	FFA	1,14	1,3	4,1	1535

Les separacions cromatogràfiques obtingudes en aquesta tesi s'han comparat amb les publicades en altres treballs que analitzen fenicols amb columnes reblertes amb partícules sub-2 µm de fase C18. En general, els resultats demostren que la utilització d'una columna amb partícules de nucli sòlid permet aconseguir bones eficàcies cromatogràfiques, properes a les obtingudes per aquests compostos amb columnes amb partícules de sub-2 µm, amb l'avantatge de requerir pressions inferiors i, per tant, poder treballar a cabals de fase mòbil superiors i aconseguir així separacions equivalents en un temps d'anàlisi menor. Per exemple, Kaufmann i Butcher [Kaufmann i Butcher, 2005] necessiten un temps d'anàlisi superior als 2,5 min per eluir la CAP d'una columna Acquity BEH C18 de 1,7 µm de 5 cm i Shi i cols. [Shi i cols., 2012] necessiten un temps d'anàlisi superior als 2,7 minuts per a la separació cromatogràfica dels quatre fenicols (columna Acquity BEH C18 de 10 cm de longitud). En aquesta tesi, a més de les columnes de nucli sòlid, també es va estudiar el comportament dels fenicols en una columna de partícules totalment poroses de fase estacionària pentafluorofenilsilà (PFP). La separació aconseguida es mostra a la Figura 2.2 (condicions descrites en l'apartat experimental de l'Article I, Apartat 2.2.1). Les eficàcies obtingudes en aquesta separació són prou bones en comparació amb les de les columnes de nucli sòlid, tal i com es pot observar en la Taula 2.3, on es recullen els paràmetres cromatogràfics corresponents a aquesta separació. No obstant això, el temps d'anàlisi és molt superior (entre 2 i 4

vegades) al de la resta de columnes i el fet d'obtenir unes amplades de pic superiors fa que s'augmenti el límit de detecció instrumental per als fenícols. Un dels trets més diferenciadors d'aquesta columna és el canvi de selectivitat per a la FFA, que passa a ser el compost més retingut (Figura 2.2). Aquest fet està relacionat, com ja s'ha comentat en la introducció del present capítol, amb la capacitat de les fases estacionàries PFP de presentar un comportament tipus HILIC amb anàlits catiónics petits. Això comporta que la retenció de la FFA en aquesta columna s'incrementi en augmentar el percentatge de modificador orgànic (en aquest cas metanol) quan la fase mòbil té un elevat contingut de modificador orgànic.

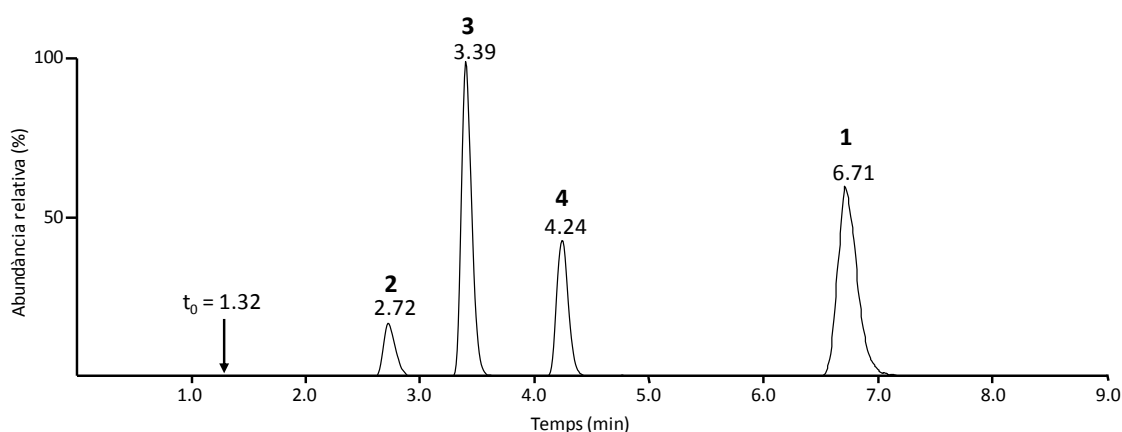


Figura 2.2. Separació cromatogràfica dels fenícols en una columna de partícula totalment porosa (3 μm) de fase PFP. Compostos: 1.- FFA, 2.- TAP, 3.- FF, 4.- CAP. Les característiques de la columna i les condicions cromatogràfiques es troben a l'article científic I (Apartat 2.2.1).

Taula 2.3. Paràmetres cromatogràfics obtinguts per a les separacions dels fenícols en la columna PFP (Figura 2.2).

Columna	Compost	t_R (min)	k'	$w_{1/2}$ (s)	N
Pentafluorofenil	CAP	4,24	2,2	6,6	8293
	TAP	2,72	1,1	6,6	3413
	FF	3,39	1,6	6,1	6196
	FFA	6,71	4,1	10,7	7865

Una possible explicació a aquest fet rau en la possibilitat d'una interacció de bescanvi iònic amb els silanols del suport de sílice. A la Figura 2.3 es mostren els diferents tipus d'interaccions que es poden donar entre la FFA i la fase estacionària PFP quan les cadenes de fase estacionària es troben obertes com a conseqüència de la presència a la fase mòbil d'un elevat percentatge de modificador orgànic. Com es pot observar, la mida de la molècula de FFA permet que aquesta s'introdueixi fàcilment entre les cadenes pentafluorofenilsilà i pugui arribar a interaccionar amb els silanols desprotonats del suport. L'accessibilitat dels anàlits fins als silanols lliures en la columna PFP és més pronunciada que en altres fases estacionàries, probablement perquè la mida dels grups pentafluorofenil comporta que la densitat de recobriment sigui menor. Per altra banda, alguns autors indiquen que els grups silanols lliures en aquest tipus de columnes presenten una major acidesa, encara que les causes no estan del tot esclarides [Bell i Jones, 2005]. En qualsevol cas, un dels mecanismes predominants en la retenció de la FFA en la columna PFP és la interacció electrostàtica (Figura 2.3). Conseqüentment, petites variacions de la força iònica de la fase mòbil produeixen canvis substancials en la retenció d'aquest compost i, per tant, la reproductibilitat dels temps de retenció per a la FFA és més baixa que en columnes de fase invertida (Article científic I, Apartat 2.2.1).

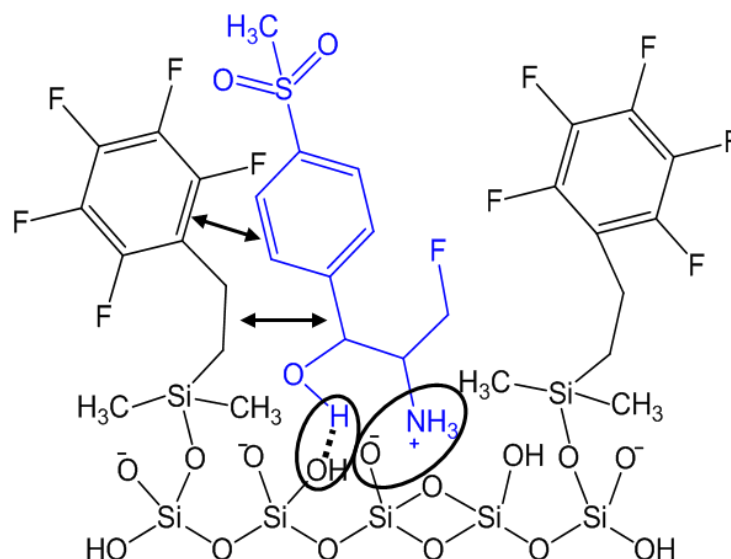


Figura 2.3. Esquema de les diferents interaccions possibles (electrostàtiques, ponts d'hidrogen, dispersives i de transferència de càrrega) entre la FFA (dibuixada en blau) i la fase estacionària pentafluorofenilpropilsilà (dibuixada en negre).

Una altra opció recomanada a la literatura per a la separació de compostos molt polars per cromatografia de líquids és l'ús de columnes de mode mixt. En aquesta tesi s'ha avaluat una columna d'aquestes característiques d'última generació (Obelisc R) per a la separació de 13 aminoglicòsids (Article II, Apartat 2.2.2). Els resultats obtinguts amb aquesta columna s'han comparat amb els obtinguts emprant una columna HILIC de sílice pura de partícules de nucli sòlid. A la Figura 2.4 es mostren les estructures de les fases estacionàries de les columnes HILIC sílice pura (HILIC *bare silica*) i Obelisc R per facilitar la discussió dels resultats. Cal dir, però, que l'estructura química exacta de la fase estacionària de la columna Obelisc R no ha estat divulgada pel fabricant i només se'n coneixen algunes propietats fisicoquímiques. A la figura s'inclou també l'estructura de la fase estacionària HILIC zwitteriònica (ZIC-HILIC), ja que és la més emprada a la literatura per a l'anàlisi d'aminoglicòsids.

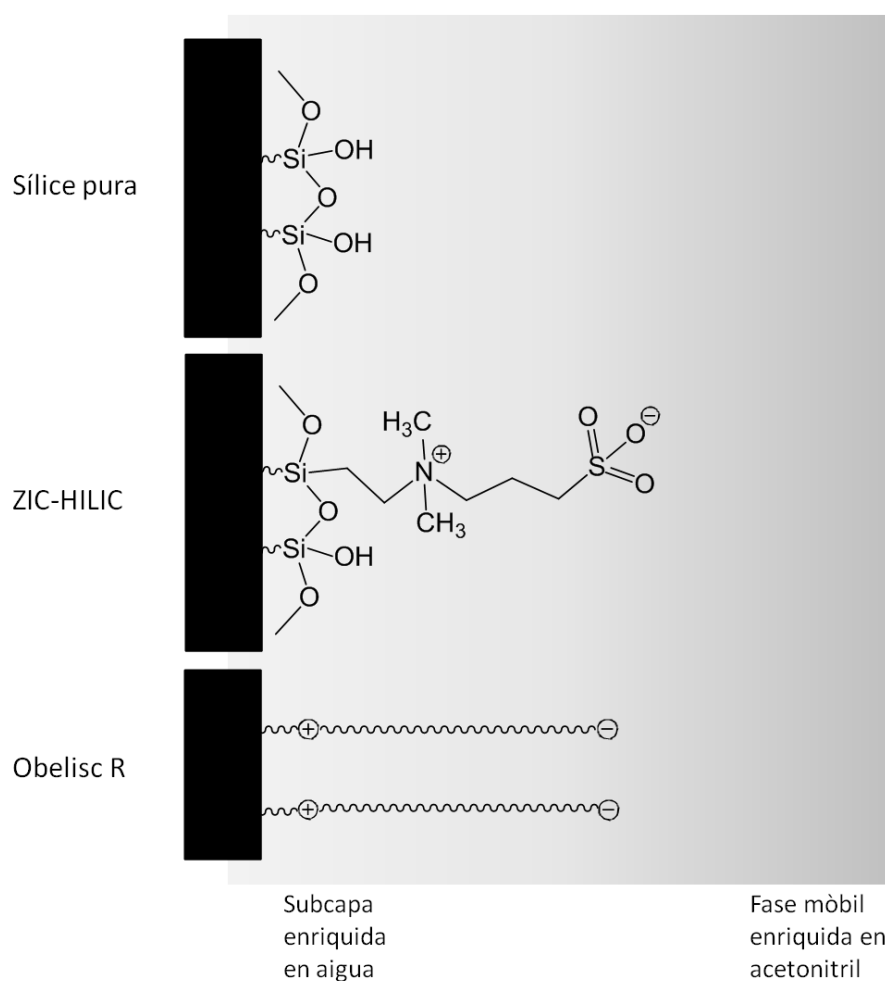


Figura 2.4. Estructures de les fases estacionàries HILIC (sílice pura) (a dalt), HILIC zwitteriònica (centre) i Obelisc R (a baix).

En una primera fase del treball es va estudiar el comportament dels aminoglicòsids (AGs) en la mateixa columna HILIC de sílice pura utilitzada en l'anàlisi del fenicòls i es va avaluar l'efecte de la concentració i el pH del tampó en la retenció i separació dels compostos. En general, els aminoglicòsids mostren una elevada retenció en aquesta columna encara que la retenció disminueix en augmentar la concentració del tampó a la fase mòbil. A mode d'exemple, a la Figura 2.5 es mostren els cromatogrames obtinguts per a la dihidroestreptomicina (DHSTR) en la columna HILIC emprant com a fase mòbil acetonitril i una solució amortidora d'àcid fòrmic-formiat d'amoni (pH 2,75) a dues concentracions, 20 i 50 mM. Com es pot observar, en augmentar la concentració de la solució amortidora la retenció de la DHSTR disminueix i l'amplada de pic es redueix considerablement. Aquesta disminució en el temps de retenció posa de manifest que el mecanisme predominant en la retenció de la DHSTR és d'interacció iònica, tot i que la quantitat de silanols desprotonats del suport és baixa, ja que es treballa a un pH per sota de 3. En augmentar la concentració del tampó augmenten els cations presents a la fase mòbil que competeixen amb l'anàlit pels setis d'interacció iònica, la qual cosa provoca que la retenció disminueixi. En conseqüència, convé utilitzar una concentració relativament elevada de tampó (50 mM o superior).

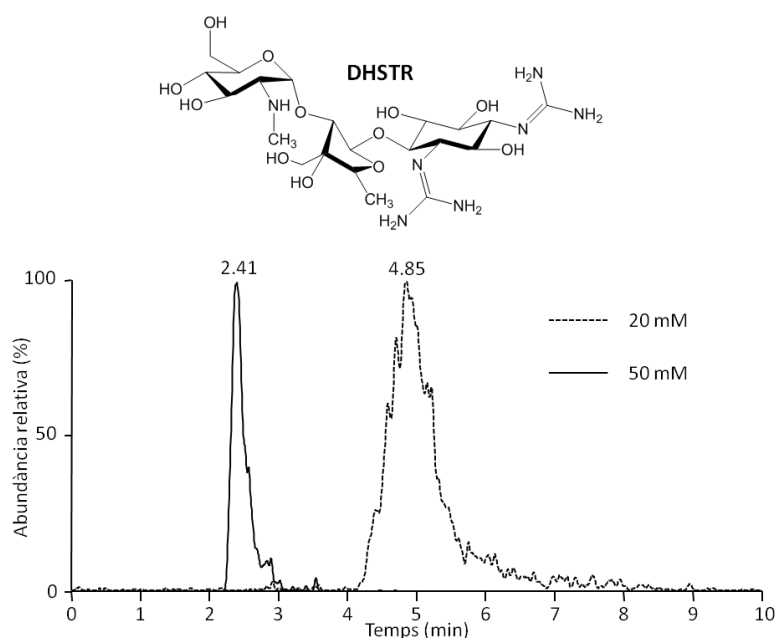


Figura 2.5. Cromatograma obtingut per a la DHSTR en una columna Ascentis Express HILIC (100 mm x 2,1 mm, 2,7 μm) (Supelco) amb elució isocràtica acetonitril:tampó àcid fòrmic/formiat d'amoni pH 2,75 (500 $\mu\text{L min}^{-1}$) a diferents concentracions de tampó, 20 i 50 mM.

Ara bé, en aquestes condicions la major part dels aminoglicòsids, i especialment la neomicina (NEO), la paromomicina (PARO) i l'apramicina (APRA) (Figura 1, l'Article II, Apartat 2.2.2), presenten una elevada retenció en aquesta columna i uns pics amb moltes cues, probablement degut a la gran quantitat de grups donadors d'electrons i acceptors de protons presents en els aminoglicòsids que poden formar ponts d'hidrogen. Això implica que per poder eluir aquests compostos i obtenir uns pics amb una forma acceptable calgui augmentar la concentració de la dissolució amortidora de la fase mòbil per sobre dels valors recomanables per l'acoblament a l'espectrometria de masses (50 mM) o bé augmentar el percentatge de fase aquosa per sobre del màxim recomanat pel fabricant per a assegurar l'establiment de la bicapa de fase mòbil que permet la partició dels compostos segons el mecanisme HILIC. En conseqüència, aquesta columna es va descartar per a anàlisi dels compostos tot i que ha estat emprada a la literatura [Gremilogianni i cols., 2010] per a la separació de STR i DHSTR, que són dos dels aminoglicòsids que menys retenció presenten. Aquests autors, però, van necessitar una concentració de formiat d'amoni 150 mM per a aconseguir temps d'anàlisi inferiors als 8 minuts. En aquest context cal esmentar que les columnes HILIC més emprades per a la separació cromatogràfica d'aminoglicòsids són les ZIC-HILIC (Figura 2.4, centre) que presenten una retenció lleugerament inferior a les de sílice pura. Aquesta fase conté un grup sulfònic amb càrrega negativa permanent amb independència del pH de la fase mòbil que fa que les interaccions per bescanvi catiònic siguin molt importants, tot i que es tracta d'una fase amb una menor càrrega superficial que la sílice pura [Hemström i Irgum, 2006] i un apantallament parcial dels silanols del suport per la funcionalització. La gran importància del mecanisme de bescanvi iònic en la retenció comporta, també en aquest cas, la utilització de dissolucions amortidores d'elevada concentració (> 150 mM) per a aconseguir una adequada elució dels AGs. Per exemple, alguns autors han necessitat utilitzar acetat d'amoni 200 mM amb 0,1% d'àcid fòrmic [Bohm i cols., 2013], acetat d'amoni 150 mM amb 1% d'àcid fòrmic [Ishii i cols., 2008] o formiat d'amoni 175 mM amb 0,2% d'àcid fòrmic [Kumar i cols., 2011; Kumar i cols., 2012]. Donat que aquestes concentracions són contraproductives per a l'acoblament a l'espectrometria de masses, aquesta columna no s'ha avaluat en aquesta tesi.

Per a la separació dels aminoglicòsids, en aquesta tesi s'ha utilitzat una columna Obelisc R amb una fase estacionària de mode mixt d'estructura similar a les fases HILIC zwitteriòniques i que conté dos grups iònics, un carregat positivament (tipus amina quaternària) i l'altre carregat negativament, separats per una cadena hidrofòbica (Figura 2.4, inferior). A diferència de les columnes ZIC-HILIC, en aquest cas el grup carregat negativament és de tipus carboxílic, amb un pK_a aproximat de 4,0 [Bu i cols., 2010], la qual cosa permet regular la contribució del mecanisme de bescanvi iònic en la separació cromatogràfica modificant el pH de la fase mòbil. A més, la cadena hidrofòbica és molt més llarga, i per tant és d'esperar un major apantallament de les possibles càrregues superficials del suport. Això ens ha permès eliminar el tampó de la fase mòbil i utilitzar una mescla d'acetonitril i una dissolució aquosa d'àcid fòrmic que permet mantenir el grup carboxílic de la fase estacionària neutralitzat i així poder eluir adequadament tots els aminoglicòsids analitzats sense necessitat d'emprar fases mòbils amb forces iòniques elevades. Pel que fa referència a l'ordre d'elució dels compostos, aquest coincideix amb l'observat en columnes tipus HILIC [Bohm i cols., 2013; Ishii i cols., 2008, Kumar i cols., 2011; Kumar i cols., 2012], i a més sembla estar relacionat amb el nombre de grups amino primaris presents en les seves estructures (Figura 1, Article II, Apartat 2.2.2) excepte en el cas de les gentamicines, que si es té en compte aquest criteri haurien d'eluir just després de la higromicina (HYG) i en canvi elueixen pràcticament al final del cromatograma (Figura 2, Article II, Apartat 2.2.2). Aquest fet es pot explicar per l'avançament dels compostos que elueixen entre la HYG y les gentamicines, degut a que els grups amino d'aquests compostos no es troben disponibles per a interaccionar amb la fase estacionària, ja que intervenen en la formació d'enllaços per pont d'hidrogen intramoleculars. La formació d'aquests enllaços està afavorida per la presència de substituents metanamino i hidroximetil en els anells glicosídics d'aquests compostos. A mode d'exemple es mostren en la Figura 2.6 les estructures de la gentamicina C1 (GENC1) i la paromomicina (PARO), on es pot apreciar que la GENC1 té menys grups amino primaris que la PARO, tot i que es queda més retinguda en la columna (Article II, Apartat 2.2.2). Per contra, la major dificultat en establir interaccions intramoleculars entre els substituents amino i hidroxil presents en la gentamicina permet explicar la major interacció d'aquests compostos amb la fase estacionària.

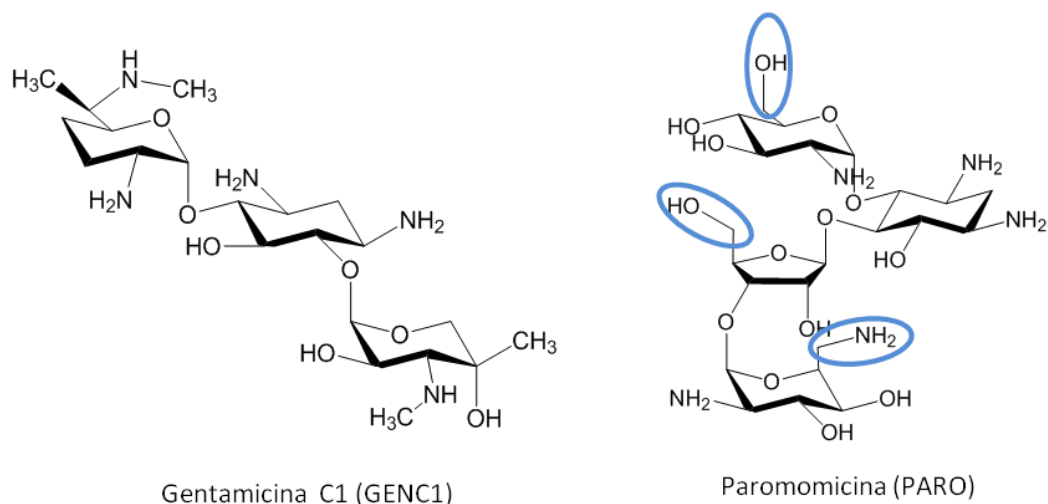


Figura 2.6. Estructura de la gentamicina C1 i la paromomicina.

A l'hora d'avaluar quin es el mecanisme predominant en la retenció dels aminoglicòsids en la fase estacionària de les columnes Obelisc R, s'han de tenir en compte diferents aspectes. En primer lloc i com ja s'ha comentat, el mecanisme de bescanvi iònic està restringit pel baix pH de la fase mòbil (àcid fòrmic) utilitzada. El mecanisme de partició entre la capa enriquida en aigua i la fase mòbil enriquida en fase orgànica, que és un dels predominants en aquesta columna segons Lämmerhofer i cols. [Lämmerhofer i cols., 2008], permet explicar la disminució dels temps de retenció en augmentar el percentatge de fase aquosa a la fase mòbil. No obstant això, aquest no és l'únic mecanisme que intervé en la interacció, ja que l'ordre d'elució no es correspon directament amb l'hidrofilicitat dels compostos. D'altra banda, les interaccions per pont d'hidrogen amb la fase estacionària també són significatives en la retenció de compostos amb un gran nombre de grups hidroxil [Lämmerhofer i cols., 2008], i, en el nostre cas, això hauria de comportar que aquells compostos amb més grups hidroxil presentessin una retenció més elevada. Ara bé, compostos com l'amikacina (AMIK) o la DHSTR amb molts grups formadors de ponts d'hidrogen es retenen menys que les GEN, la qual cosa indica que aquest mecanisme no és en tot cas el principal. Un altre efecte interessant observat en el nostre estudi és l'augment de la força eluotròpica en augmentar el percentatge d'àcid fòrmic a la fase mòbil (Article II, Apartat 2.2.2). Aquest fet podria estar relacionat amb l'apantallament dels setis tant de bescanvi iònic com d'interaccions per ponts d'hidrogen de la fase estacionària amb les molècules d'àcid

fòrmic, com també per la possible formació de parells iònics amb els anàlits. Tal com ja s'ha comentat, la força eluotròpica de la fase mòbil augmenta a percentatges elevats de fase aquosa i també quan s'augmenta el percentatge d'àcid fòrmic a la mateixa. Així, per tal d'aconseguir una retenció i elució adequades dels compostos amb un temps raonable es proposa treballar amb un gradient ternari de ACN, aigua i àcid fòrmic a l'1% (Article II, Apartat 2.2.2 i Article III, Apartat 2.2.3). D'aquesta manera s'aconsegueix la retenció dels compostos que elueixen primer (SPC i KAS) i un temps de retenció acceptable i uns pics sense cues per als compostos que mostren una major retenció (NEO i GEN). Tot i que la separació dels aminoglicòsids aconseguida en la columna Obelisc R no és a línia de base (Figura 2, Article II, Apartat 2.2.2), els mètodes proposats a la literatura generalment tampoc aconseguixen separacions complertes, degut a la gran similitud dels anàlits i a que la forta retenció que presenten dificulta la seva separació cromatogràfica en temps raonables. Això no obstant, la selecció adequada dels ions precursor i dels ions producte en l'adquisició monitorant múltiples reaccions (MRM) ha permès separar adequadament els senyals de cadascun dels anàlits (Article II, Apartat 2.2.2).

Un cop establerta la separació, s'ha procedit a avaluar les millors condicions per a l'acoblament a l'espectrometria de masses i a establir el mètode d'adquisició més adient. Per tal d'aconseguir la màxima sensibilitat i obtenir els suficients punts d'identificació d'acord amb la legislació europea [657/2002/EC], s'ha escollit el mode d'adquisició MRM, seleccionant les dues transicions més sensibles i selectives per a cada compost a partir de l'estudi de la fragmentació dels fenicols i dels aminoglicòsids mitjançant l'espectrometria de masses en tàndem. Les condicions d'ionització i l'estudi de la fragmentació dels fenicols s'inclou en el Capítol 3 d'aquesta memòria (Apartat 3.2.1), el qual està dedicat a l'espectrometria de masses. La font emprada per a la ionització dels aminoglicòsids fou l'electrosprai assistit tèrmicament (*Heated-electrospray*, H-ESI), donada l'elevada polaritat dels anàlits. Pel que fa referència a la fragmentació dels aminoglicòsids, les rutes de fragmentació han estat publicades a la literatura [Kotretsou, 2004; Zhu i cols., 2008; Goolsby i Brodbelt, 2000; Hu i cols., 2000] i mostren que els ions producte més importants són els originats pel trencament de l'enllaç glicosídic i transferència protònica cap a l'oxigen glicosídic. No obstant això, la composició elemental de l'estructura proposada en alguns treballs per a l'ió producte

m/z 246 de l'estreptomina (STR) i la DHSTR, emprada com a ió producte de confirmació, no es corresponia amb la massa exacta observada en un espectròmetre de masses Q-Exactive amb analitzador híbrid quadrupol-orbitrap. Per aquest motiu, en aquesta tesis es proposa una estructura diferent, que prové de la pèrdua combinada de la subunitat d'estreptobiosamina i amoníac per a l'ió producte m/z 246 (Article II, Apartat 2.2.2). Igualment, s'han proposat les estructures per als ions producte més importants de la kasugamicina (KAS) (Article III, Apartat 2.2.3), que no havien estat descrits en la literatura. A la figura 2.7 es mostren les principals fragmentacions de l'estreptomina i la kasugamicina, les quals han estat descrites més en profunditat en els articles científics II (Apartat 2.2.2) i III (Apartat 2.2.3). Tal i com succeeix per a la

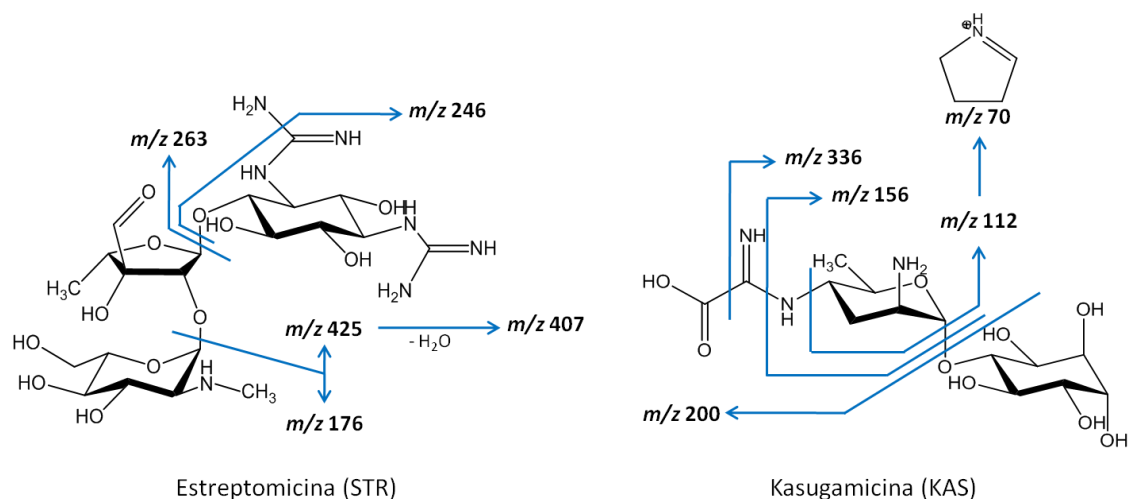


Figura 2.7. Estructura i fragmentacions més importants de l'estreptomina i la kasugamicina.

resta d'aminoglicòsids, els productes més intensos provenen de la fragmentació de l'enllaç glicosídic, corresponent a la pèrdua de glucosa (m/z 200), i també la pèrdua simultània de glucosa i àcid amino(imino)acètic (m/z 112). Aquests dos ions producte van ser escollits per a les transicions MRM de la KAS.

Els mètodes LC-MS/MS desenvolupats han estat aplicats a l'anàlisi de diferents matrius alimentàries com ara carns (porc, vedella i pollastre), peix, mel i fruites i verdures. En tots els casos, s'ha aconseguit arribar a la sensibilitat necessària per a determinar els anàlits al nivell de concentració fixat pel MRL de cada matriu. Igualment, s'han avaluat paràmetres de qualitat com ara la repetitivitat i la reproductibilitat, els límits de detecció

(LOD) i quantificació (LOQ), i el límit de decisió ($CC\alpha$) i la capacitat de detecció ($CC\beta$) en les matrius estudiades. En tots els casos, els valors obtinguts per als diferents paràmetres han estat satisfactoris segons estableix la legislació europea per als mètodes de control [657/2002/EC]. Per a la quantificació de les mostres, s'ha emprat el mètode *matrix-matched* per tal de corregir l'efecte matriu i les pèrdues d'anàlit durant el tractament de la mostra. A més, en el mètode per a la determinació de KAS i STR en fruites i verdures la dilució de la mostra (1:5) amb acetonitril ha permès reduir notablement la supressió de la ionització observada per a la KAS i obtenir una millora de la sensibilitat per a aquest compost de fins a 100 cops (Article III, Apartat 2.2.3). Finalment, es van analitzar diverses mostres adquirides en botigues locals i només es va trobar una mostra de salsitxa tipus frankfurt positiva en gentamicina, tot i que per sota del nivell legislat (Article II, Apartat 2.2.2).

CAPÍTOL 3

Espectrometria de masses: fonts, rutes de fragmentació i anàlisi directa

Les excel·lents prestacions de l'espectrometria de masses tant pel que fa a sensibilitat, selectivitat i a la gran quantitat d'informació estructural que ofereix, especialment acoblada a tècniques de separació, fan que avui dia sigui l'eina de referència en molts laboratoris analítics per a la determinació de compostos orgànics regulats. La detecció i caracterització de compostos orgànics de polaritat mitjana-alta es duu a terme avui dia principalment mitjançant l'espectrometria de masses acoblada a la cromatografia de líquids (LC-MS). La selectivitat i sensibilitat d'aquests mètodes depenen bàsicament de l'adequada selecció de la font d'ionització, de l'analitzador de masses, així com del mode d'adquisició que permetin aprofitar al màxim les capacitats dels sistema instrumental. A més, les capacitats d'alguns analitzadors de masses de dur a terme experiments d'espectrometria de masses en tàndem permeten realitzar estudis de fragmentació necessaris per a caracteritzar els compostos detectats, identificar els ions productes més característics i seleccionar les transicions més sensibles i selectives per tal de dotar als mètodes de LC-MS d'una major selectivitat i sensibilitat. En aquesta tesi s'han avaluat diferents fonts d'ionització per a l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses. També s'han aprofitat les característiques de diferents analitzadors de masses per a estudiar els espectres de tàndem en el temps i en l'espai dels anàlits tant en baixa com en alta resolució, i se n'han proposat les rutes de fragmentació. La informació espectral s'ha aprofitat tant per a proposar les transicions més adequades per a la determinació quantitativa *target* per LC-MS/MS emprant el mode d'adquisició MRM, com per a l'anàlisi *non-target* i la identificació de compostos desconeguts utilitzant l'espectrometria de masses d'alta resolució. En aquest últim cas s'ha combinat l'ús de llibreries espectrals i programaris de fragmentació *in silico* amb bases de dades químiques.

En aquest capítol s'inclou una introducció breu sobre l'espectrometria de masses, una part experimental amb els treballs publicats, i finalment una discussió de resultats. En la breu introducció es comenten els aspectes més rellevants de les fonts d'ionització emprades més comunament en l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses (electrosprai, ionització química a pressió atmosfèrica i fotoionització a pressió atmosfèrica), així com de les fonts d'ionització emprades en l'anàlisi directa de mostres. També es fa una breu descripció dels analitzadors més

emprats, fent èmfasi en els modes de treball i els avantatges i inconvenients de cadascun. A part, es comenten les capacitats dels nous analitzadors híbrids que combinen la tecnologia orbitrap amb analitzadors de trampa d'ions o quadrupolars, que permeten dur a terme experiments d'espectrometria de masses en tàndem amb mesura d'alta resolució dels ions producte. Aquests instruments ofereixen interessants mètodes d'adquisició que aporten més informació estructural i de major qualitat. Igualment, es comenten les estratègies més habituals per al tractament de les dades espectrals i per la identificació de desconeguts. L'apartat experimental inclou un treball sobre l'ús de les diferents fonts d'ionització a pressió atmosfèrica per a la ionització dels compostos de la família dels fenicols, on a més, se n'estudien les rutes de fragmentació. El següent apartat es dedica a estudiar la formació d'adductes en espectrometria de masses en tàndem, fenomen que s'ha observat per alguns compostos (inclosos certs medicaments veterinaris) i que produeix l'aparició en l'espectre de tàndem ions producte difícils d'explicar. A més, en el cas d'afectar als ions emprats en les transicions SRM, pot modificar-ne les intensitats relatives i, per tant, afectar negativament a la confirmació dels anàlits. Per últim, s'inclou un treball on es desenvolupa un mètode d'anàlisi directa *non-target* de mostres de drogues il·legals i nous productes estupefaents mitjançant espectrometria de masses d'alta resolució.

3.1. INTRODUCCIÓ.

Des de les primeres mesures de relacions massa/càrrega (m/z) d'ions efectuades per J. J. Thomson emprant camps electromagnètics a principis del segle XX, passant pel desenvolupament dels primers analitzadors de temps de vol (1946) i quadrupolars (1953), de fonts d'ionització química (1966) i d'electrosprai (1968), fins arribar als últims analitzadors tipus orbitrap (2000), els avenços realitzats en espectrometria de masses han permès nombroses aplicacions i descobriments en camps científics tan diversos com ara el farmacològic, el biomèdic, l'analític o el mediambiental, per donar alguns exemples. Gran part d'aquestes aplicacions han estat possibles arran de l'acoblament de les tècniques de separació a l'espectrometria de masses, ja que permet aconseguir una detecció i quantificació sensible i selectiva dels compostos estudiats, a més de proporcionar noves eines per a l'elucidació estructural i la identificació de substàncies desconegudes. En aquest sentit, les innovacions més recents han estat destinades d'una part a desenvolupar noves fonts d'ionització per a l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses i de l'altra, a millorar les capacitats dels analitzadors existents o a crear-ne de nous amb els quals s'aconsegueixi informació espectral de millor qualitat.

3.1.1. FONTS D'IONITZACIÓ I ANALITZADORS.

Avui dia l'electrosprai (ESI) és, de lluny, la font d'ionització a pressió atmosfèrica (*atmospheric pressure ionization*, API) més emprada en l'acoblament de la cromatografia de líquids a l'espectrometria de masses, ja que és compatible amb un gran ventall d'anàlits de polaritat mitjana-alta i, a més, el seu mecanisme d'ionització permet la generació d'espècies múltiples carregades, la qual cosa possibilita analitzar molècules d'elevat pes molecular sempre que aquestes presentin en la seva estructura química diversos grups funcionals ionitzables. A més, és la font d'ionització més "tova", amb la qual cosa s'aconsegueix una baixa fragmentació a la font i un senyal (ió) o grups de senyals (clúster isotòpic o d'ions múltiples carregats) per a cada molècula d'anàlit (generalment la molècula protonada o desprotonada). Ara bé, la ionització en electrosprai té lloc en fase líquida on l'anàlit generalment es protona o desprotona via

equilibris àcid/base. En la posterior formació de gotes carregades enriquides en ions positius o negatius (depenent de la polaritat emprada) els ions passen a la fase gas via procés d'evaporació iònica. Ara bé, s'ha de tenir en compte que l'electrosprai és una font més sensible que d'altres fonts API a efectes de disminució (supressió) o augment (*enhancement*) de la ionització. Aquests efectes de modificació de l'eficàcia en la ionització es produeixen per la presència de substàncies que coelueixen amb els anàlits o pels mateixos additius de la fase mòbil, que competeixen amb els ions d'anàlit per passar a la fase gas. D'altra banda, la capacitat de l'anàlit de formar adductes amb els constituents de la fase mòbil (sodi, amoníac, clorur, formiat o acetat) pot fer disminuir la intensitat dels ions $[M+H]^+$ o $[M-H]^-$ emprats normalment com a ions diagnòstic. Un efecte advers tant de la supressió de la ionització com de l'augment del senyal és la possible introducció d'errors en la quantificació si no es corregeixen adequadament. Això obliga a desenvolupar mètodes d'anàlisi que contemplin l'eliminació, o almenys la minimització, d'aquests efectes de *supression/enhancement*. Pel que fa referència a la ionització química a pressió atmosfèrica (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*), la segona font d'ionització més emprada en LC-MS, la ionització es produeix en fase gas mitjançant reaccions ió-molècula iniciades en aplicar un elevat potencial a un elèctrode en forma d'agulla (efecte corona). En aquests processos en fase gas els compostos que coelueixen interfereixen menys en l'eficàcia d'ionització de les molècules d'anàlit. Com a resultat, l'APCI es mostra com una font d'ionització menys sensible a la supressió de la ionització i a la formació d'adductes. Ara bé, és una tècnica d'aplicació més restringida que l'ESI ja que és més adequada per a molècules de polaritat mitjana-baixa i de pes molecular relativament baix. A més, les condicions més energètiques d'aquesta tècnica fan que es pugui produir una major fragmentació a la font i que com a conseqüència disminueixi la intensitat dels ions d'interès. Una altra font de ionització que ha començat a ser emprada en els últims anys és la fotoionització a pressió atmosfèrica (*Atmospheric Pressure Photoionization, APPI*), desenvolupada a començaments del segle XXI per Robb i cols. [Robb i cols., 2000] i que ha possibilitat l'anàlisi de molècules menys polars com ara hidrocarburs aromàtics policíclics, esteroides, lípids o ful·lerens, entre d'altres [Marchi i cols., 2009]. La ionització en APPI es produeix en fase gas, gràcies als fotons emesos per una làmpada ultraviolada de buit (*Vacuum Ultraviolet, VUV*). Generalment la fotoionització directa de l'anàlit és poc eficaç

i cal emprar solvents orgànics (dopants) fàcilment fotoionitzables com ara toluè, acetona, anisol o tetrahidrofurà, que s'afegeixen a la fase mòbil (5-20% v/v). Els dopants inicien una cascada de reaccions ió-molècula en fase gas (transferència de càrrega, transferència protònica o captura electrònica) tant amb el solvent de la fase mòbil com amb els anàlits, que acaben produint finalment la ionització d'aquests últims [Robb i Blades, 2008]. A finals de la dècada passada es van desenvolupar també fonts d'ionització combinades ESI-APCI [Zhou i cols., 2008] i ESI-APPI [Short i Syage, 2008] per tal d'intentar aprofitar els avantatges de cadascuna, tot i que ara com ara no s'aconsegueix millorar les prestacions aconseguides amb les fonts d'ionització simples.

D'altra banda, durant aquests últims anys s'han introduït en el panorama de tècniques analítiques un nou grup de tècniques d'ionització a pressió atmosfèrica que permeten l'anàlisi directa de les mostres amb una mínima o nul·la manipulació. Aquestes tècniques es coneixen com espectrometria de masses "ambient", que es podria traduir com "espectrometria de masses en el propi entorn". Aquests sistemes permeten la desorció i ionització dels anàlits directament a partir de la mostra o d'un extracte de la mateixa dipositat sobre d'un suport. El camp de les tècniques "*ambient MS*" actualment agrupa un nombre elevat i creixent de tècniques [Monge i cols., 2013], d'entre les quals s'han de destacar les dues pioneres i que són per les que avui dia s'han desenvolupat un major nombre d'aplicacions [Harris i cols., 2011], la ionització per desorció per electrospray (DESI, *desorption electrospray*) [Takáts i cols., 2004; Cooks i cols., 2006] i l'anàlisi directe en temps real (DART, *direct analysis in real time*) [Cody i cols., 2005]. En el DESI, que va ser desenvolupat pel grup de treball de Cooks l'any 2004, un esprai de gotes carregades generades per electrosprai assistit pneumàticament es fa impactar contínuament sobre la superfície de la mostra a analitzar. L'esprai de gotes carregades en una primera etapa crea una capa fina de solvent sobre de la superfície on es produeix l'extracció i/o dissolució de l'anàlit, i a continuació les gotes carregades que continuen impactant produeixen l'ejecció de gotes carregades més petites (electrosprai secundari), on es produeix la ionització de l'anàlit per mecanismes equivalents a l'electrosprai convencional. En el DART, desenvolupat per Laramée i Cody l'any 2005 es generen àtoms metaestables d'He mitjançant una descarrega amb elèctrodes en una cambra de *glow discharge* (efecte corona). Aquest gas es calenta abans d'incidir sobre la mostra per

tal de ajudar en la desorció tèrmica de l'anàlit. Els àtoms d'He excitats intervenen inicialment en una ionització tipus Penning amb el N₂ atmosfèric i aquest inicia una cascada de reaccions ió-molècula en fase gas per formar ions reactius que donen lloc a reaccions de protonació, desprotonació i transferència de càrrega amb els anàlits desorbts tèrmicament. Com ja s'ha comentat, el gran avantatge de les fonts d'*ambient MS* és la possibilitat d'efectuar l'anàlisi directa de les mostres, sense tractament o separació cromatogràfica. A més, el fet de treballar amb superfícies fa que aquestes tècniques puguin ser emprades per a la generació d'imatges (*imaging*) de la superfície. No obstant això, aquestes tècniques presenten un greu inconvenient a l'hora d'aconseguir una quantificació acurada de les mostres, per la dificultat en els processos de calibratge i mostreig.

Pel que respecte a l'analitzador de masses, aquest és una de les parts fonamentals d'un espectròmetre de masses i d'ell depenen en gran mesura característiques com la selectivitat i la sensibilitat, així com les possibilitats de modes de treball. Tot i que la majoria d'analitzadors de masses emprats actualment en LC-MS es van desenvolupar a meitat del segle XX en aquesta última dècada alguns analitzadors com els temps de vol han ressorgit i d'altres com el orbitrap s'han desenvolupat fent possible la utilització de l'espectrometria de masses d'alta resolució de manera robusta i rutinària en el acoblament LC-MS.

Anys enrere, gran part dels mètodes analítics desenvolupats empraven analitzadors quadrupolars (Q), degut a la seva alta transmissivitat dels ions, una velocitat relativament alta d'escombratge i que estan entre els analitzadors més barats i robustos del mercat. Així, la seva utilització en mètodes GC-MS avui dia encara està molt estesa. En canvi, en mètodes LC-MS, on es fan servir fonts d'ionització més "toves" que mantenen la integritat de l'ió molecular/quasi-molecular, l'ús d'aquest tipus d'analitzadors no permet obtenir en molts casos la informació necessària per a la confirmació de la identitat de l'anàlit, ja que no permeten treballar en espectrometria de masses en tàndem per sí sols. Els analitzadors de trampa d'ions (IT) donen solució a aquest problema, ja que permeten realitzar fragmentació en el temps, de manera que es poden dur a terme escombratges d'ions producte, i fins i tot amb fragmentació en etapes successives (MSⁿ), mode que proporciona una gran quantitat d'informació

estructural i l'ordre genealògic dels ions producte. Per aquest motiu, l'IT és encara un dels analitzadors senzills més emprats, tant en el camp dels mètodes d'anàlisi *target com* per a l'elucidació estructural de compostos desconeguts. L'analitzador de trampa d'ions és, a diferència del quadrupol, un analitzador polsat que emmagatzema paquets d'ions en trajectòries d'oscil·lació estables en aplicar un camp elèctric tridimensional. Aquests ions són enviats al detector en el procés d'escombratge en provocar la inestabilitat de les trajectòries mitjançant els potencials aplicats en els elèctrodes. La quantitat d'ions que s'introdueixen en la trampa en cada injecció es controla mitjançant el dispositiu d'AGC (*automatic gain control*) per tal d'evitar interaccions entre els ions (espai de càrrega). A conseqüència del seu mode de funcionament, el temps de residència dels ions dins d'aquest tipus d'analitzadors és molt superior (fins a tres ordres de magnitud) que en els quadrupols, la qual cosa pot tenir conseqüències en els espectres de tàndem obtinguts, com es veurà més endavant en aquesta tesi. La reduïda linealitat de la trampa d'ions ha estat un dels arguments emprats en contra del seu ús, tot i que la quantificació és molt fiable dins del interval de linealitat. En aquest sentit, a partir dels anys 90 es van desenvolupar les trampes lineals (LIT) que emmagatzemen els ions en dos dimensions en l'espai format per quatre elèctrodes en forma de barres paral·leles que permeten un increment en l'eficàcia de l'emmagatzematge i en la capacitat de detecció (dos detectors radials) que comporten una millora en la sensibilitat, així com també una major velocitat d'escombratge.

Tot i els seus avantatges, tant els quadrupols com les trampes d'ions són analitzadors de baixa resolució (resolució unitària), i, per tant, són molt propensos a interferències isobàriques. Recentment la millora en la tecnologia de fabricació dels quadrupols i en especial l'ús de quadrupols hiperbòlics que redueixen les distorsions del camp quadrupolar han permès treballar amb aquests dispositius a resolucions superiors (fins a $\Delta m/z$ de 0,1) sense haver de sacrificar sensibilitat. En el cas de les trampes d'ions, es pot incrementar la resolució treballant en mode *zoom scan* i duent a terme escombratges lents de petits intervals de m/z . De totes maneres, aquesta millora en la resolució és insuficient per resoldre la majoria de les interferències isobàriques que es poden produir. En canvi, els analitzadors d'alta resolució permeten realitzar mesures de massa exacta amb precisió de fins a 0,0001 Da prevenint el problema de moltes de les

interferències comentades anteriorment. Un dels analitzadors de masses d'alta resolució més antics i més emprats avui en dia és l'analitzador de temps de vol (TOF). Tot i que en els seus inicis la resolució que oferia podia en alguns casos ser insuficient, el desenvolupament en la tecnologia d'acceleració ortogonal, que proporciona una distribució inicial dels ions en l'espai i en velocitat molt més estreta, i l'ús de reflectrons que permeten enfocar en energies cinètiques i incrementar la distància al detector, fa possible aconseguir resolucions de fins als 60.000 FWHM (*full width half maximum*, amplada de pic a mitja alçada) a m/z 1222, tot i que segueix sent molt inferior a la que s'aconsegueix amb altres analitzadors d'alta resolució. A més, per tal d'obtenir una bona exactitud en la mesura de la massa (<5 ppm) cal utilitzar un calibratge intern de l'eix de masses (*lock mass*) o aplicar correccions post-anàlisi. El gran avantatge del TOF davant la resta d'analitzadors és la seva superior freqüència d'adquisició, ja que la mesura dels m/z dels ions es fa simultàniament en el sistema de detecció sense que es dugui a terme cap escombratge de voltatges en l'analitzador. A més, les noves tecnologies de detecció digital han permès millorar tant l'exactitud de massa com la linealitat d'aquests analitzadors. L'analitzador de masses que avui dia ofereix la màxima resolució és el de ressonància ciclòrica d'ions amb transformada de Fourier (FT-ICR). En aquest analitzador els ions són atrapats en una cel·la cúbica on els ions són atrapats, excitats i detectats mitjançant camps electrostàtics i magnètics. En el FT-ICR les freqüències de gir dels ions depenen de la relació m/z , i la resolució és inversament proporcional a la velocitat d'escombratge. El FT-ICR, a més d'una excel·lent capacitat per a resoldre interferències isobàriques, proporciona mesures de massa exacta amb una exactitud per sota de 1 ppm i amb calibratge extern de l'eix de masses. Generalment, les resolucions en aquest analitzador estan per sobre del 100.000 FWHM a m/z 400, tot i que alguns autors han arribat fins als 39.000.000 FWHM a m/z 609 [Nikolaev i cols., 2011], però el seu ús sovint és incompatible amb les separacions cromatogràfiques molt ràpides. A més, el seu cost de compra i manteniment és molt superior a la resta d'equips, atesa la necessitat d'un camp magnètic intens i estable, la qual cosa fa que es destinin a aplicacions molt concretes generalment relacionades amb proteòmica i metabolòmica emprant separacions molt lentes o fins i tot anàlisi directa [Marshall i Hendrickson, 2008].

L'orbitrap és un analitzador de masses d'alta resolució desenvolupat recentment [Makarov, 2000]. Aquest analitzador consta d'un elèctrode extern en forma de barril i un elèctrode intern en forma de fus. Els ions són injectats tangencialment per paquets dins el camp elèctric generat entre els dos elèctrodes i queden atrapats degut a que l'atracció electrostàtica cap a l'elèctrode interior es contraresta amb la força centrífuga. Així, els ions circulen en òrbites al voltant de l'elèctrode central i a la vegada es desplacen al llarg de l'eix d'aquest elèctrode, de manera que els ions amb una mateixa relació m/z es mouen en anells que oscil·lants al voltant del fus central i la freqüència d'aquestes oscil·lacions harmòniques és independent de la velocitat de l'ió i inversament proporcional a l'arrel quadrada de m/z . Per a injectar els ions s'utilitza una petita trampa d'ions en forma de C (*C-trap*), que primer estabilitza emprant un gas *buffer*, després compacta i finalment injecta els ions dins l'analitzador. Tot i que amb un orbitrap no s'arriba a les resolucions d'un FT-ICR, aquest analitzador aconsegueix fàcilment resolucions de 100.000-240.000 FWHM (m/z 200), proporciona una molt bona exactitud en la mesura de la massa (< 2-3 ppm) i presenta una gran estabilitat de l'eix de masses, sent possible treballar emprant calibratge extern. Atès que la resolució en aquest analitzador és inversament proporcional a la velocitat d'escombratge, es pot compatibilitzar l'ús d'aquest equip amb una separació cromatogràfica ràpida reduint la resolució de treball. Encara que l'orbitrap és un analitzador basat en la tecnologia trampa d'ions no permet dur a terme la fragmentació dels ions dins del mateix analitzador. No obstant això, els sistemes que incorporen aquest analitzador disposen d'una cel·la de dissociació HCD (*Higher-energy Collisional Dissociation*) que permet dur a terme la fragmentació dels ions (*all-ion fragmentation*) per tal de tenir informació estructural addicional (Figura 3.1).

3.1.2. ANALITZADORS HÍBRIDS.

Els analitzadors híbrids sorgeixen de la necessitat d'obtenir informació estructural addicional i de la voluntat de combinar els punts forts de cada analitzador mencionats en l'apartat anterior per tal d'aconseguir nous modes de treball més sensibles, selectius i amb una major capacitat de caracterització. En LC-MS els analitzadors híbrids són especialment útils ja que les fonts d'ionització a pressió atmosfèrica emprades en aquest

acoblament generen espectres de masses amb nul·la o molt baixa fragmentació. Així, l'espectrometria de masses en tàndem permet obtenir informació estructural a partir de la fragmentació dels ions generats a la font d'ionització. Els analitzadors de masses com la trampa d'ions i el FT-ICR permeten realitzar en el mateix dispositiu la fragmentació dels ions, prèvia selecció de l'ió precursor i mitjançant experiments de tàndem en el temps. En canvi, la resta d'analitzadors com els quadrupols, el TOF o l'orbitrap s'ha de recórrer a la fragmentació a la font d'ionització (*in source*) o a sistemes híbrids on s'acoblen dos analitzadors de masses en sèrie per dur a terme fragmentacions via tàndem en l'espai.

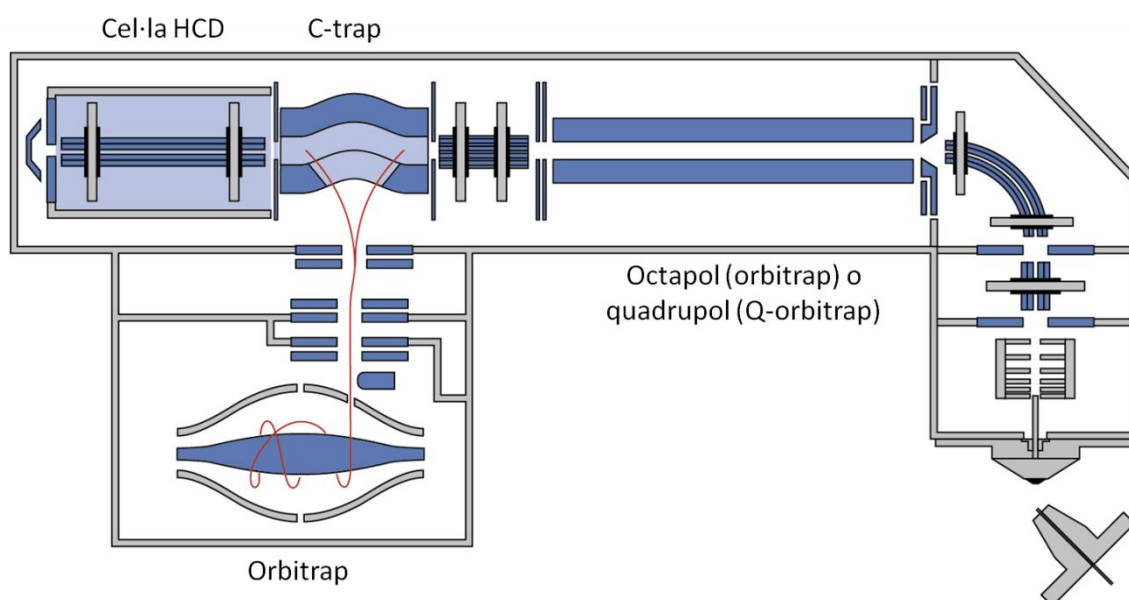


Figura 3.1. Esquema de l'espectròmetre de masses amb analitzador Q-orbitrap emprat en aquesta tesi (imatge de ThermoFisher Scientific).

Els sistemes de triple quadrupol són molt sensibles i selectius i molt adequats per l'anàlisi quantitativa, especialment quant es treballa en el mode de MRM. Si es segueixen dues transicions amb un ió precursor i dos ions producte com recomanen algunes normatives [657/2002/EC], s'obtenen 4 punts d'identificació, suficients per a una anàlisi confirmatòria segons la legislació. Per aquest motiu, aquest analitzador és l'emprat en prop d'un 80% dels mètodes d'anàlisi quantitativa citats en la introducció d'aquesta tesi. Tot i així, en alguns casos no és suficient emprar dues transicions, ja que

es poden produir interferències isobàriques amb compostos coeluent de la matriu que afecten a la relació d'intensitats entre les dues transicions (*ion ratio*), donant lloc a falsos negatius. En aquests casos, es recomana utilitzar una tercera transició [657/2002/EC], modificar la separació cromatogràfica o emprar l'alta resolució per tal de separar la interferència per poder confirmar la presència de l'anàlit i, si és possible, identificar el compost interferent. D'altra banda, en els triple quadrupols els modes de treball "*non-target*" com ara l'escombratge d'ions precursor o d'ions producte o fins i tot el mode de pèrdua de neutres, que poden ser útils per a la identificació de compostos anàlegs, metabòlits o productes de transformació, impliquen l'obtenció d'espectres de masses en *full scan* i com a conseqüència són menys sensibles. Per contra, els sistemes de trampa d'ions proporcionen espectres de masses en *full scan* amb molt bona sensibilitat, encara que alguns modes d'adquisició com el d'ions precursor o de pèrdua de neutres no es poden dur a terme i s'ha de recórrer a la combinació de modes d'escombratge i post-processament de les dades per tal d'obtenir aquest tipus d'informació.

Els instruments híbrids d'avui dia poden assolir velocitats elevades d'escombratge amb una molt bona sensibilitat combinant un quadrupol, com a primer analitzador per aïllar l'ió precursor, i un segon analitzador dotat d'una elevada freqüència d'adquisició d'espectres *full scan* i gran sensibilitat. Aquest tipus d'analitzadors híbrids fan possible tant l'anàlisi "*target*" d'un nombre de substàncies molt elevat, com l'anàlisi "*non-target*" per a la identificació d'un nombre il·limitat de substàncies, sense discriminar en funció dels compostos d'interès, i poden realitzar un post-processament de les dades mitjançant l'anàlisi retrospectiva de les mostres. Per aquest motiu, el Q-TOF i el Q-orbitrap són avui dia els analitzadors més emprats en mètodes LC-MS [Hernández i cols., 2012].

L'analitzador de masses híbrid d'alta resolució amb el qual s'ha realitzat part del treball experimental d'aquesta tesi és el quadrupol-orbitrap (Q-orbitrap). Aquest analitzador desenvolupat recentment combina, tal i com succeeix amb el Q-TOF, la velocitat d'escombratge d'un quadrupol amb l'alta resolució de l'orbitrap. La resolució que permet obtenir aquest analitzador (fins a 140.000 FWHM a m/z 200) és molt superior a l'aconseguida amb els Q-TOF. Amb aquest analitzador híbrid (Figura 3.1) la fragmentació es pot realitzar amb selecció de precursor al quadrupol (*target-MS²*) per dur a terme la

seva fragmentació en la cel·la HCD, així com emprar el quadrupol en mode de transmissió i dur a terme la fragmentació simultània en la cel·la HCD de tots els ions generats a la font d'ionització (*all-ion fragmentation*). Aquest analitzador és especialment útil per a l'anàlisi *non-target*, ja que facilita molt l'elucidació estructural i la identificació de compostos desconeguts. El principal inconvenient del Q-orbitrap és la baixa velocitat d'escombratge, especialment si es treballa a resolucions molt elevades o es vol dur a terme diferents experiments en un mateix cicle d'adquisició, que pot dificultar l'acoblament amb sistemes cromatogràfics de molt elevada eficàcia cromatogràfica (UHPLC). Per aquest motiu, en alguns casos és necessari limitar el nombre d'escombratges que es realitzen simultàniament durant l'adquisició o treballar a resolucions inferiors a 35.000 FWHM (a m/z 200). En els mètodes *target-MS²* i atès que en els mètodes *target* es coneix el comportament dels anàlits, es poden restringir els escombratges d'ions producte en funció del temps de retenció del compost (finestres d'adquisició). També es pot emprar el mode de *multiplexing* que acumula diversos ions precursors per fragmentar-los a la vegada en la cel·la HCD, de manera que s'estalvia temps en reduir el nombre d'escombratges. No obstant, s'ha de tenir en compte que l'espectre de tàndem que s'obté en aquest mode d'adquisició és una barreja dels ions producte generats a partir de tots els ions fragmentats simultàniament. Per tant, aquesta opció només és viable si els precursors seleccionats tenen ions producte característics de m/z diferent. En el cas d'anàlisi *non-target* no és recomanable la utilització del *multiplexing* ja que la obtenció d'un espectre mescla pot dificultar molt la seva interpretació per a la identificació del compost concret.

Els analitzadors híbrids han permès desenvolupar nous mètodes d'adquisició que combinen la obtenció d'informació general amb informació molt més selectiva. Així, els mètodes *data-dependent analysis* (DDA) aconseguen informació espectral selectiva sense emprar un procediment dirigit a uns anàlits predeterminats. Aquest mètode consisteixen en un primer escombratge no selectiu (generalment un *full scan*) denominat *survey scan* i un segon experiment més selectiu que generalment empra espectrometria de masses en tàndem. Aquest segon experiment només es duu a terme si determinada informació del *survey scan* es troba per sobre d'un cert llindar d'intensitat (*threshold*). A més, amb l'objectiu de d'incrementar la informació espectral

obtinguda en tot l'interval de l'eix de m/z , es pot aplicar l'energia de col·lisió per a la fragmentació dels ions de diferents maneres. Per exemple, el mode d'energies de col·lisió esglaonades (*stepped*), emprat en els sistemes de q-orbitrap, permet obtenir un espectre de tàndem únic a partir de la mitja de 3 espectres adquirits a 3 energies de col·lisió diferents (baixa, mitjana i alta). En canvi el mode de rampa inversa (RER, *reverse energy ramp*), utilitzat en el sistema de triple quadrupol TSQ, sincronitza l'energia de col·lisió amb l'escombratge de l'eix de m/z de manera inversament proporcional. Un dels principals inconvenients dels mètodes DDA és la possibilitat de pèrdua d'informació ja que no es pot realitzar un espectre d'ions producte per a tots els ions d'interès si el nombre d'ions que coelueixen és molt elevat. Els mètodes *data-independent analysis* (DIA), de recent aparició, permeten millorar en part aquest inconvenient. Aquests mètodes realitzen dos tipus d'escombratges consecutius, el primer és un *full scan* i en el segon es fragmenten tots els ions procedents de la font d'ionització. En el cas dels mètodes DIA, la informació obtinguda no és tan selectiva com en el DDA, però el mètode d'adquisició és molt més ràpid i es minimitza la possibilitat de pèrdua d'informació. D'altra banda, recentment s'han desenvolupat mètodes DIA on després del primer *fullscan* s'aïllen grups reduïts d'ions precursors en finestres petites consecutives de m/z que son fragmentats i escombrats successivament (*Sequential Windowed Acquisition of All Theoretical Fragment Ion Mass Spectra*, SWATH). Així, sempre i quan els ions que coelueixen no tinguin masses molt properes, els espectres de ions producte obtinguts seran més simples.

Com ja s'ha comentat, l'ús d'analitzadors híbrids d'alta resolució, i més en concret el Q-orbitrap, és molt important en mètodes *non-target*. Per aquest motiu, es poden trobar a la literatura diversos mètodes d'anàlisi que empen mètodes d'adquisició DDA i DIA per a la identificació de micotoxines en productes derivats de cereals [Liao i cols., 2015] o plastificants en aliments envasats [Bignardi i cols., 2014], per citar tan sols alguns exemples. En qualsevol cas, el tractament de la gran quantitat d'informació adquirida s'ha de realitzar correctament per tal de poder identificar de manera ràpida i amb seguretat els compostos presents en la mostra. Amb aquest objectiu, i donat que generalment el nombre de senyals de l'espectre és molt elevat, cal realitzar abans un cribratge (*peak picking*) de les dades adquirides, ja sigui emprant una base de dades amb

els compostos d'interès o seleccionant només els senyals per sobre d'un cert llindar d'intensitat. Una altra possibilitat és emprar un filtratge per defecte de massa (*mass defect filtering*). Aquesta opció és adequada quan es volen seleccionar els ions que probablement tenen relació amb un compost determinat, ja siguin productes de transformació o metabòlits, i es basa en el fet que els compostos derivats d'una molècula concreta tenen un defecte de massa (diferència entre massa nominal i massa exacta) que sovint és molt propera a la de la molècula de la qual en deriven [Sleno, 2012]. Un cop es té el llistat d'ions d'interès es pot assignar una composició elemental a cadascun, generalment emprant els propis programaris que els fabricants dels espectròmetres de masses subministren amb els equips (per exemple, Xcalibur de ThermoFisher Scientific). Teòricament, es pot identificar la composició elemental de qualsevol ió sempre i quan es conegui la seva massa amb suficient exactitud [Beynon, 1954]. Tot i que aquesta premissa sembla senzilla d'aplicar, a la pràctica es necessita informació addicional per a la correcta assignació de la composició elemental, ja que l'exactitud necessària per a identificar un ió sense tenir cap restricció prèvia en els possibles elements que pot contenir és molt superior a la que pot oferir qualsevol espectròmetre de masses. En aquesta línia, Kind i Fiehn van proposar 7 normes (*seven golden rules*) per a ajudar en l'assignació, que inclouen tenir en compte restriccions en el nombre màxim d'àtoms de cada element d'acord amb la massa molecular total, restriccions en la relació H/C i heteroàtom/C, correspondència amb el patró isotòpic, i correspondència amb les valències dels elements, entre d'altres [Kind i Fiehn, 2007]. En general, la majoria de programaris d'assignació de composicions elementals ja tenen en compte algunes d'aquestes normes i, per tant, a la pràctica el més habitual és aplicar uns criteris d'error màxim de 5 ppm i de correspondència del patró isotòpic.

Un cop assignada la composició elemental, es necessita obtenir un llistat de candidats per a cada ió. Aquest llistat es pot obtenir de diferents maneres depenent de si es disposa d'informació prèvia sobre els possibles compostos que poden estar presents (anàlisi de sospitosos) o de si es desconeix completament la composició de la mostra (desconeguts). En el primer cas, es pot interrogar el llistat d'ions amb una base de dades que contingui informació sobre els compostos buscats, i confirmar la identitat del compost concret a partir de l'espectre de tàndem obtingut (si es fa DDA) o a partir de la

presència d'ions producte característics (si es fa DIA). En el cas dels desconeguts, es poden emprar bases de dades espectrals com per exemple la NIST, MetLin o MassBank, o programaris de fragmentació *in silico* com ara MetFrag, MOLGEN-MS o MassFrontier per tal d'aconseguir un llistat de possibles candidats, i posteriorment assignar el candidat concret a partir de l'estudi de l'espectre de tàndem, de la mateixa manera que en el cas de l'anàlisi de sospitosos. Amb aquesta finalitat, és d'especial ajuda disposar d'informació bibliogràfica sobre la ruta de fragmentació del compost candidat, o sobre la família a la qual pertany, ja que identificar els ions producte més característics de cada estructura és de vital importància per a poder triar el candidat més probable. Com a últim pas, sempre és imprescindible confirmar la identificació a partir de l'anàlisi d'un patró.

3.2. TREBALL EXPERIMENTAL.

En aquesta tesi s'ha estudiat la ionització dels fenicols en els modes positiu i negatiu emprant tres fonts d'ionització: ESI, APCI i APPI. A més, s'han proposat les rutes de fragmentació per a la família dels fenicols a partir dels ions precursors obtinguts en les diferents fonts de ionització. Aquest treball forma part de l'article científic IV intitulat "*Atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry of the phenicol drug family*" (Apartat 3.2.1), la informació suplementària del qual es troba recollida a l'Apèndix A. Un altre tema objecte d'estudi ha estat la formació d'adductes ió-molècula en l'etapa de fragmentació en espectrometria de masses en tàndem. Per aquest treball s'han emprat espectròmetres de masses amb analitzadors de característiques diferents i configuracions diverses i s'ha avaluat quins són els factors que més afecten a la formació d'aquests adductes. El treball experimental corresponent es recull a l'article V intitulat "*Ion-molecule adduct formation in tandem mass spectrometry*" (Apartat 3.2.2), la informació suplementària del qual es troba a l'Apèndix B. Per últim, s'han aprofitat les prestacions d'un espectròmetre de masses amb un analitzador híbrid Q-orbitrap per a proposar un mètode d'anàlisi directa de productes estupefaents, emprant modes d'adquisició que aporten una gran quantitat d'informació espectral. Els espectres obtinguts en alta resolució combinats amb una base de dades pròpia han permès identificar els constituents de les mostres (tant el compost psicotròpic com els possibles adulterants) emprant diferents estratègies per al tractament de les dades. El treball experimental corresponent a aquest estudi s'inclou en l'article científic VI intitulat "*Wide-range screening of psychoactive substances by FIA-HRMS: identification strategies*" (Apartat 3.2.3).

3.2.1. ARTICLE CIENTÍFIC IV

Atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry of the phenicol drug family.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Journal of Mass Spectrometry (2013) **48**, 1241-1251

Research article

Received: 2 August 2013

Revised: 18 September 2013


Accepted: 25 September 2013

Published online in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jms.3287

Atmospheric pressure ionization–tandem mass spectrometry of the phenicol drug family

Élida Alechaga, Encarnación Moyano* and M. Teresa Galceran

 In this work, the mass spectrometry behaviour of the veterinary drug family of phenicols, including chloramphenicol (CAP) and its related compounds thiamphenicol (TAP), florfenicol (FF) and FF amine (FFA), was studied. Several atmospheric pressure ionization sources, electrospray (ESI), atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization were compared. In all atmospheric pressure ionization sources, CAP, TAP and FF were ionized in both positive and negative modes; while for the metabolite FFA, only positive ionization was possible. In general, in positive mode, $[M + H]^+$ dominated the mass spectrum for FFA, while the other compounds, CAP, TAP and FF, with lower proton affinity showed intense adducts with species present in the mobile phase. In negative mode, ESI and atmospheric pressure photoionization showed the deprotonated molecule $[M - H]^-$, while atmospheric pressure chemical ionization provided the radical molecular ion by electron capture. All these ions were characterized by tandem mass spectrometry using the combined information obtained by multistage mass spectrometry and high-resolution mass spectrometry in a quadrupole–Orbitrap instrument. In general, the fragmentation occurred via cyclization and losses or fragmentation of the *N*-(alkyl)acetamide group, and common fragmentation pathways were established for this family of compounds. A new chemical structure for the product ion at m/z 257 for CAP, on the basis of the MS^3 and MS^4 spectra is proposed. Thermally assisted ESI and selected reaction monitoring are proposed for the determination of these compounds by ultra high-performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, achieving instrumental detection limits down to 0.1 pg. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

Keywords: phenicols; tandem mass spectrometry; multiple-stage mass spectrometry; API sources; veterinary drugs

Introduction

The phenicol drugs are a family of wide-spectrum veterinary antibiotics composed of chloramphenicol (CAP), the synthetic analogues thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF) and the main metabolite of FF amine (FFA). Because of its severe side effects, CAP was banned in veterinary medicine for food producing animals in 1994, and the European Community established maximum residue levels for TAP, FF and FFA^[1] (50–2000 $\mu\text{g kg}^{-1}$) and a minimum required performance level of 0.3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ for CAP.^[2] Moreover, the Commission Decision 2002/657/EC,^[3] concerning the performance criteria for analytical methods for the analysis of veterinary residues in foods, established that confirmatory methods of banned substances such as CAP (group A) should be based on separation techniques coupled to mass spectrometry (MS), achieving the required identification points without the need of complementary chromatographic methods. As a result, confirmatory methods for the analysis of phenicols in foods are generally based on gas chromatography– $MS^{4,5}$ and liquid chromatography–MS (LC-MS).^[4,6–26]

All of the LC-MS methods established for the analysis of these compounds use electrospray (ESI) as the ionization source, except for one recent study that compared atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and atmospheric pressure photoionization (APPI) for the LC-MS analysis of CAP in fish meat^[8] that concluded that both sources showed a similar performance. Most of the published studies describe the application of analytical methods where the m/z values for the confirmation and quantification ions are indicated, but neither the elemental

composition nor the structure are provided. Only a few studies have examined the fragmentation patterns for CAP^[23–26] or for the phenicols,^[6,12,22] and only some product ions have been tentatively assigned. However, the nature of most of the product ions remains unknown, and no common fragmentation pathways have been proposed for the phenicol drug family. The detailed elucidation of the fragmentation patterns of phenicols could be interesting for the development of successful MS strategies for the screening of related drugs and metabolites in control analysis.

In this work, both the atmospheric pressure ionization (API) behaviour in three different ionization sources (ESI, APCI and APPI) and the fragmentation pattern of CAP, TAP, FF and FFA have been studied. Tandem mass fragmentation experiments both in time (MS^t) and in space (MS/MS) are combined for the correct assignment of the product ions generated from the protonated ($[M + H]^+$), deprotonated ($[M - H]^-$) and radical ($[M]^-$) molecular ions. Additionally, high-resolution MS is used to definitely confirm the elemental composition when necessary.

* Correspondence to: Encarnación Moyano, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona. Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain. E-mail: encarna.moyano@ub.edu

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain

Experimental

Reagents and materials

Chloramphenicol (98%), TAP (98%), FF (99%), toluene (99.9%), chlorobenzene (99.9%), tetrahydrofuran (99.9%), acetone (99.9%) and ammonium acetate (98%) were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and FFA hydrochloride analytical standard was obtained from Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canada). Anisole (99.0%) and LC/MS grade methanol, acetonitrile and water were obtained from Fluka (Steinheim, Germany), while acetic acid glacial (98–100%) was provided by Merck (Darmstadt, Germany). The chemical structure, CAS number and monoisotopic mass of the studied compounds are shown in Fig. 1.

Stock standard solutions (1000 mg kg⁻¹ for CAP, TAP and FF and 100 mg kg⁻¹ for FFA) were individually prepared in acetonitrile by weight and stored at -20°C. Intermediate solutions were prepared monthly from stock standard solution by appropriate dilution in methanol. Mobile phases were filtered through 0.22 µm nylon membrane filters purchased from Whatman (Clifton, NJ, USA). Nitrogen (99.8% pure) used for the API sources

and high-purity argon (ALPHAGAZ 1 Ar) purchased from Air Liquide (Madrid, Spain) was used as collision-induced dissociation gas in the triple quadrupole tandem MS experiments.

Liquid chromatography–tandem mass spectrometry

Mass spectrometry was performed using a TSQ Quantum Ultra AM (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) triple quadrupole mass spectrometer. Three API sources, ESI, and with thermal assistance (H-ESI), APCI and APPI, were used, and the mass spectra were acquired in full-scan, product ion scan and selected reaction monitoring (SRM) scan mode. The APPI source consisted of the APCI probe as desolvation device (without applying corona discharge) and a Syagen PhotoMate VUV lamp source with a krypton discharge lamp of 10.0 eV (Syagen Technology Inc., Tustin, CA, USA). In tandem MS experiments the collision gas was argon (1.5 mTorr). Additionally, multiple-stage MS (MSⁿ) experiments were performed in an LCQ Classic ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA), and accurate mass measurements were carried out in a Q-Exactive quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA).

Ultra high-performance LC (UHPLC) was performed on an Accela LC system (Thermo Fisher Scientific, San José, CA, USA) equipped with a quaternary pump, an autosampler and a column oven. Flow injection analysis were performed injecting 10 µl of 5 mg kg⁻¹ standard solution of each compound prepared in mobile phase, using 500 µl min⁻¹ of methanol:acetic acid–ammonium acetate (5 mM, pH 5) 90:10 (v/v) as mobile phase. API source parameters such as capillary and vaporizer temperatures, sheath and auxiliary gas flow rates and lens voltages were previously optimized by infusing 5 mg kg⁻¹ standard solutions of the compounds. Table 1 summarizes the parameter values optimized for each API source.

The UHPLC separation was carried out on an Ascentis® Express Phenyl-Hexyl (100 × 2.1 mm, 2.7 µm) column provided by Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol (solvent A) and 5 mM acetic acid–ammonium acetate buffer (pH 5) (solvent B) were used as mobile phase. The gradient elution program was 7% solvent A as initial conditions, followed by a linear gradient up to 100% solvent A in 1.3 min; this composition was maintained for 0.8 min before going back to the initial conditions in 0.9 min. The mobile phase flow rate was 500 µl min⁻¹, and the column oven temperature was kept at 40°C during the chromatographic run.

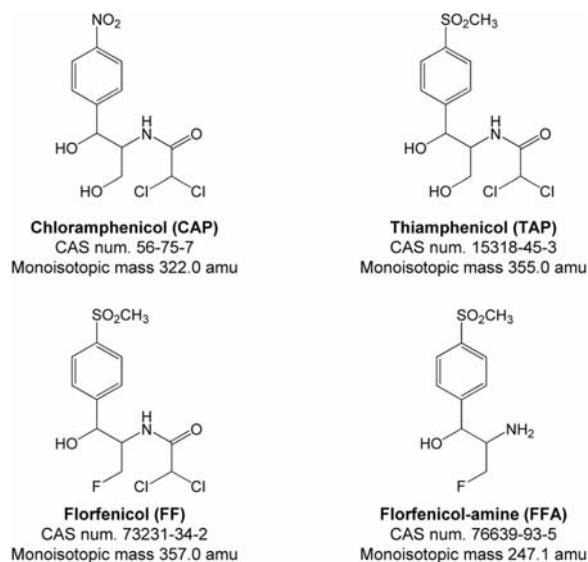


Figure 1. Structures of the studied compounds.

Table 1. Atmospheric pressure ionization source working parameters

API source	Polarity	ESI		H-ESI		APCI		APPI	
		Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative	Positive	Negative
Spray voltage (V)		4000	-3000	3500	-3000	—	—	—	—
Discharge current (µA)		—	—	—	—	3	-12	—	—
VUV lamp energy (eV)		—	—	—	—	—	—	10	10
Vaporizer temperature (°C)		—	—	250	250	300	300	350	350
Capillary temperature (°C)		350	350	350	350	350	350	350	350
Sheath gas (a.u.)		60	50	40	50	20	20	40	40
Ion sweep gas (a.u.)		20	20	4	4	5	5	6	6
Auxiliary gas (a.u.)		20	20	20	20	20	20	20	20
Tube lens offset (V)		117	-90	93	-85	85	-90	60	-50

API, atmospheric pressure ionization; ESI, electrospray; H-ESI, thermally assisted electrospray; APCI, atmospheric pressure chemical ionization; APPI, atmospheric pressure photoionization; a.u., arbitrary units.

The retention times of the compounds were 1.14, 1.57, 1.70 and 1.81 min for FFA, TAP, FF and CAP, respectively.

When working with the APPI source, several dopants such as toluene, anisole, tetrahydrofuran, chlorobenzene and acetone were added postcolumn at a flow rate of 50 $\mu\text{l min}^{-1}$ and mixed with the mobile phase using a zero dead volume T-piece.

Results and discussion

API sources

In this work, three API sources, ESI and H-ESI, APCI and APPI, in both positive and negative ionization modes have been used. MS spectra were obtained by flow injection analysis at the optimum conditions indicated in Table 1. ESI required the highest flow rates of the sheath and ion sweep gases that can be explained by the lower desolvation capacity of ESI source pneumatically assisted by nitrogen. Moreover, with this source, the tube lens voltage had to be increased to favour the desolvation in the intermedium pressure region.

Table 2 shows the ions (with a relative abundance higher than 5%) obtained for each compound in full scan in both positive and negative ionization modes using the API sources (toluene was used as dopant with APPI), their relative abundances and the corresponding ion assignment. The full-scan mass spectra of these compounds reflected the different behaviour of FFA. This compound could only be ionized in positive mode yielding always the protonated molecule $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 248) as the base peak of the spectrum. Additionally, when using H-ESI (APCI and APPI) an ion shifted 18 Da (m/z 230), attributed to the loss of water from the protonated molecule, was always observed. In contrast, TAP, FF and CAP could be ionized in both positive and negative modes. In positive ionization mode, these compounds yielded the protonated molecule $[\text{M} + \text{H}]^+$ (m/z 356, 358 and 323, respectively), the ammonium adduct $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ (m/z 373, 375 and 340) and/or the loss of water $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (m/z 338, 340 and 305). The relative abundances of these ions depended on the type of API source. For instance, for CAP, the ESI mass spectrum showed the ammonium adduct as base peak; while in APCI, the base peak was the protonated molecule, and in APPI (toluene), the loss of water was the most abundant ion. This loss of water occurred for all the compounds and increased greatly when working with APCI and APPI, becoming the base peak of the spectra in this last source. When using ESI and H-ESI, sodium adducts $[\text{M} + \text{Na}]^+$ were also observed (m/z 378, 380 and 345). In APCI, the sodium adducts were not present in contrast to what happened with other veterinary drugs that can easily form stable complexes with Na^+ .^[27] However, methanol adducts $[\text{M} + \text{H} + \text{CH}_3\text{OH}]^+$ were present in APCI for TAP and FF (m/z 388 and 390, respectively). In ESI, adduct formation (with Na^+ or NH_4^+) was favoured instead of the protonated molecule, because of the very low pKa values (<0.1) of the functional groups of CAP, TAP and FF that makes their protonation in liquid phase difficult.

In the negative ionization mode, the differences in the full-scan mass spectra of the native antibiotics were more noticeable. For instance, the deprotonated molecule $[\text{M} - \text{H}]^-$ was the base peak for all the compounds in ESI (ESI and H-ESI). In-source fragmentation ions were also present for FF at low relative abundance (<12%) mainly because of the loss of HF. Moreover, adduct ions shifted 36 Da (m/z 390, 392 and 357 for TAP, FF and CAP, respectively) were always observed.

These adducts showed the isotope pattern of a three-chlorine atom molecule, indicating that chloride adducts $[\text{M} + \text{Cl}]^-$ were formed. In contrast, in APCI, the base peak was always the radical molecular ion $[\text{M}]^-$, probably generated via a direct electron capture mechanism favoured by the presence of highly electronegative halogen atoms in the chemical structure of these compounds. The deprotonated molecules $[\text{M} - \text{H}]^-$ (relative abundances <10%) and in-source fragment ions (relative abundances from 15% to 35%) were also present. Regarding the APPI with toluene as dopant, CAP, TAP and FF yielded the deprotonated molecule $[\text{M} - \text{H}]^-$ as base peak, but in-source fragmentations because of the loss of 2(HCl) or the *N*-(2-hydroxyethyl)acetamide chain were present at relatively high abundances (51–100%). The different base peaks obtained in APCI and in APPI could be related to the differences in the ionization mechanism that takes place in each source. Although the ionization process in both API sources begins with the formation of thermal electrons, in APCI, the corona discharge provides a higher concentration of electrons than the photoionization process, favouring the formation of the radical ion.

As indicated before, the dopant used in the previous experiments in APPI was toluene; nevertheless, it is well known the importance of the dopant nature in the ionization. In this work, several dopants (toluene, chlorobenzene, anisole, acetone and tetrahydrofuran) were tested in order to study their effect in both the mass spectra and the ionization efficiency of phenicols. In general, no significant differences were observed in the full-scan mass spectra of the native drugs in positive mode (Table S1, Supporting Information), being the loss of water always the base peak. In negative mode, the deprotonated molecule and fragments arising from the loss of the *N*-(2-hydroxyethyl)acetamide chain were obtained. However, when using chlorobenzene as dopant, the addition of chlorine at relative high abundances (11–38%) was observed. Chlorine might be generated from the dopant by dissociative electron capture, as Kauppila *et al.* suggested for other chlorinated solvents.^[28] Regarding the ionization efficiency, Fig. 2 shows the relative intensity of the base peak obtained with each dopant. As can be seen, toluene provided high signal intensity for all the compounds; although for CAP, the signal intensity was slightly higher when using anisole. As a compromise, toluene was selected as the most suitable dopant for APPI.

Tandem mass spectrometry

The product ion scan spectra of each compound at different collision energies were acquired in a triple quadrupole instrument in order to study the fragmentation of phenicols. Table 3 summarizes the product ions observed in the triple quadrupole MS/MS spectrum (relative abundance >5%), their relative abundances and the corresponding ion assignment. However, for FFA, because of its low fragmentation, product ions with less than 5% of relative abundance were also included. The elemental composition and index of hydrogen deficiency were confirmed by measuring the accurate mass in a quadrupole-Orbitrap instrument, and the information provided by an ion trap analyzer and the triple quadrupole was combined to understand the phenicols fragmentation pathway.

In Table 3, only the product ion scan of the protonated molecule is given; although in positive mode, ammonium or

Table 2. Observed ions in the full-scan spectra of phenicols for each atmospheric pressure ionization source

API source	Compound	Positive mode		Negative mode		
		<i>m/z</i> (%Rel.Ab.)	Ion assignment	<i>m/z</i> (%Rel.Ab.)	Ion assignment	
ESI	FFA	248 (100%)	[M + H] ⁺			
		378 (53%)	[M + Na] ⁺	390 (14%)	[M + Cl] ⁻	
	TAP	373 (100%)	[M + NH ₄] ⁺	354 (100%)	[M - H] ⁻	
		380 (43%)	[M + Na] ⁺	392 (22%)	[M + Cl] ⁻	
	FF	375 (100%)	[M + NH ₄] ⁺	356 (100%)	[M - H] ⁻	
				336 (5%)	[M - H - HF] ⁻	
	CAP	345 (65%)	[M + Na] ⁺	357 (15%)	[M + Cl] ⁻	
		340 (100%)	[M + NH ₄] ⁺	321 (100%)	[M - H] ⁻	
H-ESI	FFA	248 (100%)	[M + H] ⁺			
		230 (5%)	[M + H - H ₂ O] ⁺			
	TAP	378 (10%)	[M + Na] ⁺	390 (11%)	[M + Cl] ⁻	
		373 (100%)	[M + NH ₄] ⁺	354 (100%)	[M - H] ⁻	
	FF	338 (6%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	290 (5%)		
		380 (32%)	[M + Na] ⁺	392 (16%)	[M + Cl] ⁻	
	CAP	375 (100%)	[M + NH ₄] ⁺	356 (100%)	[M - H] ⁻	
		340 (5%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	336 (12%)	[M - H - HF] ⁻	
	APCI	FFA	345 (100%)	[M + Na] ⁺	357 (6%)	[M + Cl] ⁻
			340 (31%)	[M + NH ₄] ⁺	321 (100%)	[M - H] ⁻
		323 (29%)	[M + H] ⁺			
		305 (9%)	[M + H - H ₂ O] ⁺			
	APPI (toluene)	FFA	248 (100%)	[M + H] ⁺		
			230 (6%)	[M + H - H ₂ O] ⁺		
		TAP	388 (100%)	[M + H + CH ₃ OH] ⁺	355 (100%)	[M] ⁻
			373 (44%)	[M + NH ₄] ⁺	319 (9%)	[M - HCl] ⁻
FF		356 (49%)	[M + H] ⁺	283 (12%)	[M - 2(HCl)] ⁻	
		338 (78%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	184 (13%)	[M - CH ₂ (CH ₂ OH)NHCOCHCl ₂] ⁻	
CAP		390 (50%)	[M + H + CH ₃ OH] ⁺	357 (100%)	[M] ⁻	
		375 (84%)	[M + NH ₄] ⁺	321 (10%)	[M - HCl] ⁻	
		358 (15%)	[M + H] ⁺	285 (11%)	[M - 2(HCl)] ⁻	
		340 (100%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	184 (12%)	[M - CH ₂ (CH ₂ F)NHCOCHCl ₂] ⁻	
APPI (toluene)		FFA	323 (100%)	[M + H] ⁺	322 (100%)	[M] ⁻
			305 (63%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	321 (8%)	[M - H] ⁻
	TAP			286 (27%)	[M - HCl] ⁻	
				250 (35%)	[M - 2(HCl)] ⁻	
	FF			151 (24%)	[M - CH ₂ (CH ₂ OH)NHCOCHCl ₂] ⁻	
	CAP	248 (100%)	[M + H] ⁺			
		230 (35%)	[M + H - H ₂ O] ⁺			
APPI (toluene)	TAP	373 (24%)	[M + NH ₄] ⁺	354 (100%)	[M - H] ⁻	
		356 (14%)	[M + H] ⁺	282 (88%)	[M - H - 2(HCl)] ⁻	
	FF	338 (100%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	266 (24%)	[M - 2(HCl) - OH] ⁻	
				225 (35%)	[M - 2(HCl) - NH ₂ COCH ₂] ⁻	
	CAP	375 (40%)	[M + NH ₄] ⁺	356 (28%)	[M - H] ⁻	
		358 (5%)	[M + H] ⁺	285 (17%)	[M - 2(HCl)] ⁻	
	FF	340 (100%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	266 (40%)	[M - H ₂ FCI ₂] ⁻	
				264 (100%)	[M - H - 2(HCl) - HF] ⁻	
CAP	323 (8%)	[M + H] ⁺	321 (81%)	[M - H] ⁻		
	305 (100%)	[M + H - H ₂ O] ⁺	250 (100%)	[M - 2(HCl)] ⁻		
	275 (17%)	[M + H - H ₂ O - CH ₂ O] ⁺	249 (58%)	[M - H - 2(HCl)] ⁻		
		192 (22%)	[M - 2(HCl) - NH ₂ COCH ₂] ⁻			

API, atmospheric pressure ionization; ESI, electrospray; H-ESI, thermally assisted electrospray; APCI, atmospheric pressure chemical ionization; APPI, atmospheric pressure photoionization; TAP, thiamphenicol; CAP, chloramphenicol; FF, florfenicol; FFA, florfenicol amine. Ions with relative abundance less than 5% were not included.

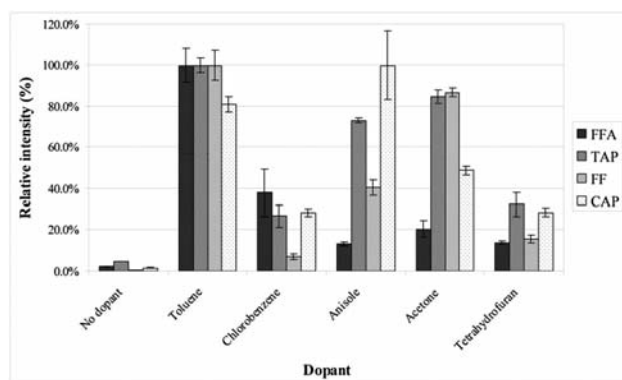


Figure 2. Relative intensity of the base peak of the full-scan spectrum for the studied compounds with each dopant using atmospheric pressure photoionization.

methanol adducts were obtained as base peak of the spectrum depending on the ionization source, as has been commented in the previous texts. However, these ions always generated the protonated molecule as the first step of their fragmentation. The product ion scan spectra of the protonated molecules $[M+H]^+$ in the triple quadrupole was quite similar for the four compounds. For instance, the loss of water (m/z 230) was the base peak for FFA, and it was one of the most intense peaks (46–83%) for CAP, TAP and FF. Additionally, ions arising from the successive losses of H_2O , HF or CH_2O , were also observed, and they were the base peak of CAP and TAP spectra (m/z 275 and 308, respectively). The loss of nitro (CAP) and methylsulfonyl groups (TAP, FF and FFA) only occurred after these successive losses. For instance, the metabolite FFA yielded two ions at m/z 131 and 130 because of the fragmentation of the methylsulfonyl group after the loss of H_2O and HF, and the native drugs CAP, TAP and FF showed a common product ion at m/z 241 as a consequence of the equivalent successive losses, being the base peak of the spectrum for FF. Figure 3 shows the common fragmentation pathways proposed for the protonated molecules of phenicols, established from the results obtained in multiple-stage MS (MS^n). The first step is the loss of water that might be due to the cleavage of the C(3)–O bond with cyclization and charge migration (F1). This mechanism has been previously described for amino alcohols ($NH_2-(CH_2)_n-OH$), being slightly more favoured when $n=2$.^[29] The resulting three-membered aziridinium ring might endure losses via formation of stable iminium ions (F2 for CAP and TAP and F3 for all), as Sigsby *et al.* suggested for amine compounds,^[30] and producing the cleavage of the previously formed ring. The product ion F2 (m/z 275 and 308 for CAP and TAP, respectively) was only observed when the substituent R_1 is a hydroxyl group, indicating that the hydrogen of this hydroxyl group should participate in the fragmentation mechanism. Afterwards, the iminium ions (F2 and F3) could undergo the neutral loss of $COCl_2$ (F4, m/z 165 or 198, for CAP and TAP, respectively, and F6). Increasing the collision energy, the $R_3-C(7)$ bond homolysis occurred, yielding radical product ions stabilized by resonance (F5, m/z 229 for TAP; and F7, m/z 241 for CAP, TAP and FF or 131, for FFA). Finally, the cyclization of the radical ion F7 via the loss of hydrogen (F9, m/z 130 for FFA) or chlorine (F8, m/z 206 for FF) could result in highly stable isoquinolinium-like structures. As all the native drugs generated the ion m/z 241 (F7), this fragment could be proposed for the screening of analogue compounds of the phenicol drug family, and because the two chlorine

atoms are still present in the structure of the fragment ion, the isotope m/z 243 could be used as an additional confirmation transition.

Regarding the deprotonated molecules $[M-H]^-$, CAP and TAP showed a similar fragmentation pattern and FF had a differentiate behaviour (Table 3), while FFA could not be ionized in negative mode. The MS/MS spectra for CAP and TAP showed numerous fragment ions arising from the common losses $CHOCl$, $2(HCl)$, $CHOCl+NHCHCl$ and $CH_2Cl_2+C(CH_2OH)NCO$, and the similarities between the product ion spectra were even higher if product ions of low abundance were considered. As a result, a common fragmentation pathway could be proposed for CAP and TAP (Fig. 4). The proposed mechanism for the product ions at m/z 257 for CAP and m/z 290 for TAP is the intramolecular nucleophilic substitution reaction from the negatively charged nitrogen to the C(2), with cyclization and loss of HCl, in a similar way to what happened with the loss of water from the protonated molecules. The resulting three-membered ring, as it is rather unstable, could rapidly open yielding the loss of the carbonyl in C(1) and obtaining the product ion F1. According to MS^n experiments, F1 lost HCl (F2, m/z 221 for CAP) and CH_2NCl (F3, m/z 194 and 227, for CAP and TAP, respectively), and F3 showed a further loss of water yielding F4, (m/z 176 and 209, for CAP and TAP, respectively). In the literature, the product ion at m/z 257 for CAP has been assigned to the simultaneous loss of chloride and the hydroxymethyl substituent at C(2') position (structure F1'),^[22–26] but this assignment is not compatible with our MS^3 experiments, and the alternative mechanism shown in Fig. 4 is more reliable. Additionally, the elimination of two units of HCl was also observed (F5), and considering that the fragment shifted 36 Da from the deprotonated molecule was not obtained for any phenicol, the loss of $2(HCl)$ should occur in a single step. The presence of the fragment ion HCl_2^- at low abundances (<5%) indicated that the fragmentation occurred via the formation of an ion–molecule complex,^[31] which would produce fragment F5 through deprotonation and ion HCl_2^- through displacement of that complex. Lastly, the deprotonated molecule showed also side chain losses (fragments F6, F7, F8 and F9; m/z 237, 207, 152 and 179 for CAP and 270, 240, 185 and 212 for TAP) that might also occur by the initial formation of ion–molecule complexes and further deprotonation or displacement.

In contrast, FF showed little fragmentation with a fragment at m/z 336, the base peak of the spectrum, generated by the loss of HF from the molecular ion, and the ions at m/z 219 and m/z 185. This behaviour might be due to the strong intramolecular hydrogen bond between the hydroxyl in the C(1') position and the fluorine in the fluoromethyl side chain, as has been described by Krusic *et al.* for compounds with similar structures.^[32] Thus, the first loss observed would be the elimination of HF obtaining the product ion at m/z 336 and forming a four-membered ring (Fig. 5). Moreover, the intramolecular chlorine nucleophilic substitution at the C(1') might yield the product ion at m/z 219, either directly from the deprotonated molecule (m/z 219 was observed at low abundance in the ion trap MS^2 experiments) or from the product ion at m/z 336. Furthermore, ion m/z 336 fragmented via the formation of an ion–molecule complex, yielding the product ion at m/z 185 by deprotonation and the product ion at m/z 152 by displacement.

Finally, the radical ions $[M]^{-\cdot}$ of CAP, TAP and FF obtained by APCI in the negative mode were fragmented in the triple quadrupole obtaining the product ion spectra (Table 3), and the common fragmentation pathway showed in Fig. 6 is proposed. In general, the fragmentation pattern of the radical ion of the

Table 3. Observed ions in the product ion spectra of phenolics

Precursor ion	[M + H] ⁺			[M - H] ⁻			[M] ⁻		
	m/z (%Rel.Ab.)	Ion assignment (CE, eV)	m/z (%Rel.Ab.)	Ion assignment (CE, eV)	m/z (%Rel.Ab.)	Ion assignment (CE, eV)			
CAP	323 (14)	[M + H] ⁺ (12)	321 (87)	[M - H] ⁻ (10)	322 (15)	[M] ⁻ (10)			
	305 (46)	[M + H - H ₂ O] ⁺	257 (68)	[M - H - CHOC] ⁻	286 (12)	[M - HCl] ⁻			
	275 (100)	[M + H - H ₂ O - CH ₂ O] ⁺	249 (15)	[M - H - 2(HCl)] ⁻	250 (100)	[M - HCl - HCl] ⁻			
	241 (11)	[M + H - H ₂ O - H ₂ O - NO ₂] ⁺	221 (5)	[M - H - CHOC - HCl] ⁻	220 (13)	[M - HCl - HCl - CH ₂ O] ⁻			
	165 (16)	[M + H - H ₂ O - CH ₂ O - COCCl ₂] ⁺	194 (34)	[M - H - CHOC - NHCHCl] ⁻	192 (25)	[M - HCl - HCl - NH ₂ COCH ₂] ⁻			
			176 (32)	[M - H - CHOC - NHCHCl - H ₂ O] ⁻	151 (37)	[M - CH ₂ (CH ₂ OH)NHCOCCHCl ₂] ⁻			
TAP	356 (11)	[M + H] ⁺ (13)	152 (100)	[M - H - CH ₂ Cl ₂ - C(CH ₂ OH)NCO] ⁻	355 (21)	[M] ⁻ (10)			
	338 (53)	[M + H - H ₂ O] ⁺	354 (21)	[M - H] ⁻ (15)	319 (8)	[M - HCl] ⁻			
	308 (100)	[M + H - H ₂ O - CH ₂ O] ⁺	290 (31)	[M - H - CHOC] ⁻	283 (100)	[M - HCl - HCl] ⁻			
	241 (12)	[M + H - H ₂ O - H ₂ O - SO ₂ CH ₃] ⁺	282 (11)	[M - H - 2(HCl)] ⁻	266 (16)	[M - HCl - HCl - OH] ⁻			
	229 (22)	[M + H - H ₂ O - CH ₂ O - SO ₂ CH ₃] ⁺	240 (32)	[M - H - CH ₂ Cl ₂ - CH ₂ O] ⁻	253 (9)	[M - HCl - HCl - CH ₂ O] ⁻			
	198 (10)	[M + H - H ₂ OCH ₂ O - COCCl ₂] ⁺	227 (18)	[M - H - CHOC - NHCHCl] ⁻	225 (64)	[M - HCl - HCl - NH ₂ COCH ₂] ⁻			
			212 (16)	[M - H - CHOC - NHCHCl - H ₂ O] ⁻	184 (55)	[M - CH ₂ (CH ₂ OH)NHCOCCHCl ₂] ⁻			
			209 (20)	[M - H - CH ₂ Cl ₂ - C(CH ₂ OH)NCO] ⁻	169 (19)	[M - CH ₂ (CH ₂ OH)NHCOCCHCl ₂ - CH ₃] ⁻			
FF	358 (17)	[M + H] ⁺ (12)	185 (100)	[M - H] ⁻ (12)	357 (22)	[M] ⁻ (10)			
	340 (83)	[M + H - H ₂ O] ⁺	356 (30)	[M - H - HF] ⁻	321 (13)	[M - HCl] ⁻			
	241 (100)	[M + H - H ₂ O - HF - SO ₂ CH ₃] ⁺	336 (100)	[M - H - HF - CH(CH ₂)NCOCHCl] ⁻	285 (100)	[M - HCl - HCl] ⁻			
	206 (10)	[M + H - H ₂ O - HF - SO ₂ CH ₃ - Cl] ⁺	219 (14)	[M - H - HF - C(CH ₂)NCOCHCl ₂] ⁻	270 (21)	[M - HCl - HCl - CH ₃] ⁻			
			185 (25)	[M - H - HF - C(CH ₂)NCOCHCl ₂] ⁻	265 (62)	[M - HCl - HCl - HF] ⁻			
FFA	248 (3)	[M + H] ⁺ (15)			250 (14)	[M - HCl - HCl - HF - CH ₃] ⁻			
	230 (100)	[M + H - H ₂ O] ⁺			202 (14)	[M - HCl - HCl - HF - CH ₃ - SO] ⁻			
	131 (4)	[M + H - H ₂ O - HF - SO ₂ CH ₃] ⁺			184 (19)	[M - CH ₂ (CH ₂ F)NHCOCCHCl ₂] ⁻			
	130 (6)	[M + H - H ₂ O - HF - SO ₂ CH ₃ - H] ⁺			169 (9)	[M - CH ₂ (CH ₂ F)NHCOCCHCl ₂ - CH ₃] ⁻			

CAP, chloramphenicol; TAP, thiamphenicol; FF, florfenicol; FFA, florfenicol amine; CE, collision energy. Ions with relative abundance less than 5% were not included except for FFA.

API-MS/MS of phenicol drug family

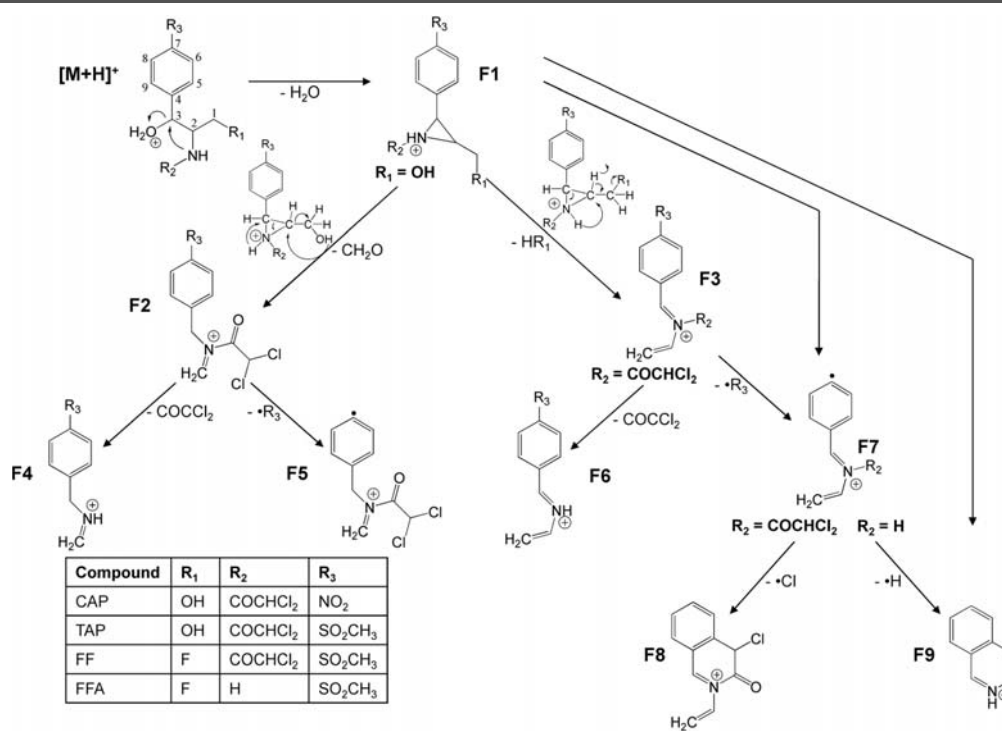


Figure 3. Proposed fragmentation pathway of the $[M+H]^+$ of phenicols, established with multiple-stage mass spectrometry.

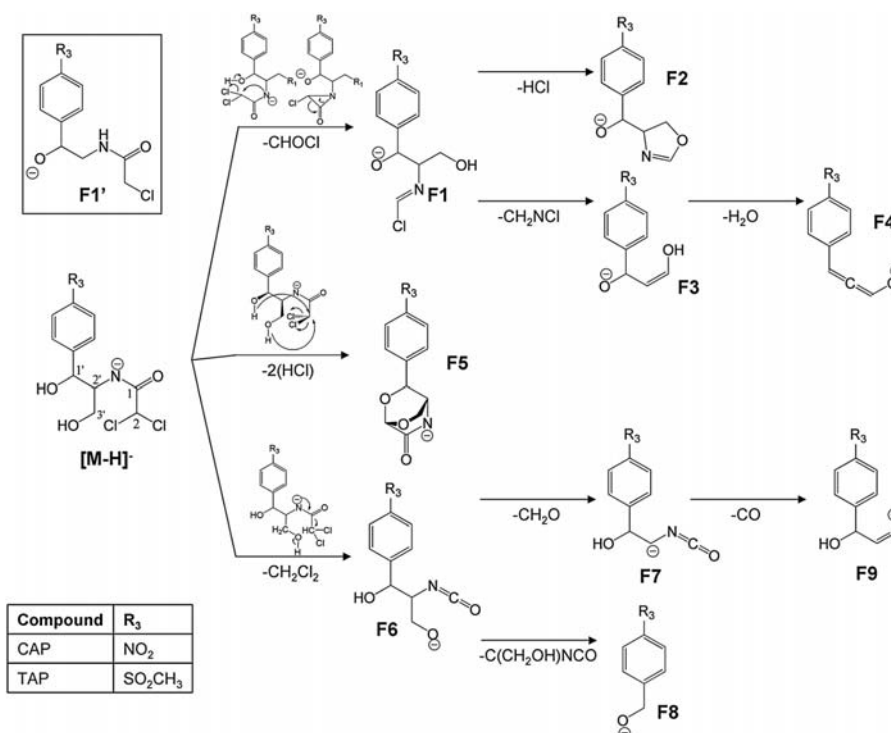


Figure 4. Proposed fragmentation pathway of the $[M-H]^-$ of chloramphenicol (CAP) and thiamphenicol (TAP), established with multiple-stage mass spectrometry.

compounds was quite similar in contrast to what happened with the deprotonated molecules. Direct electron capture is favoured by the presence of the highly electronegative chlorine atoms in

the structure, so it is reasonable to think that the negative charge will remain in a chlorine and the fragmentation will be initiated in that part of the molecule. Thus, the base peak of the spectra was

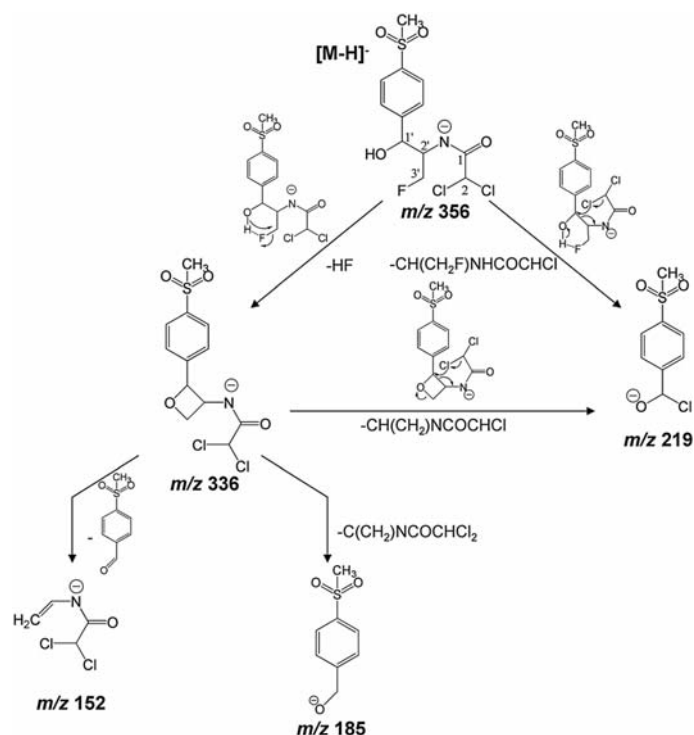


Figure 5. Proposed fragmentation pathway of the $[M-H]^-$ of florfenicol, established with multiple-stage mass spectrometry.

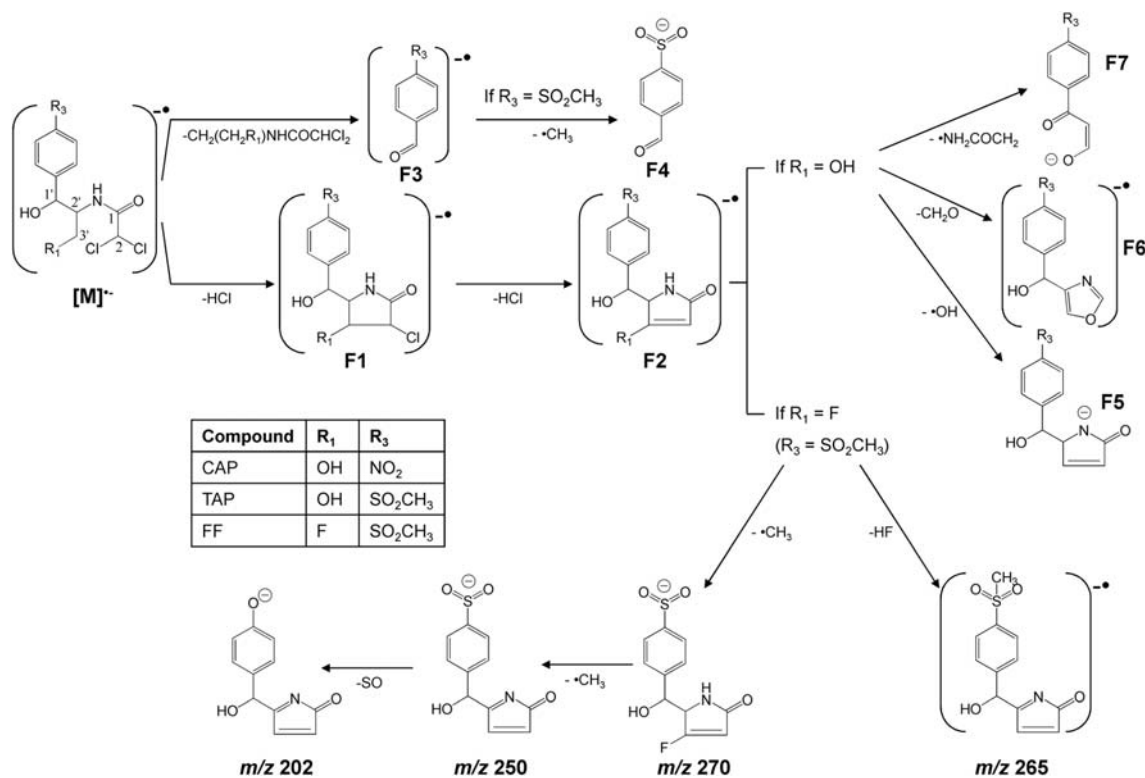


Figure 6. Fragmentation pathway of the $[M]^-$ of chloramphenicol (CAP), thiamphenicol (TAP) and florfenicol (FF), established with multiple-stage mass spectrometry.

the loss of two HCl units (product ion F2 at m/z 250, 283 and 285 for CAP, TAP and FF, respectively). However, the loss of a single HCl was also observed at low relative abundances (fragment ion F1 at m/z 286, 319 and 321 for CAP, TAP and FF, respectively), in contrast to what happened with the deprotonated molecules where the simultaneous loss of two HCl was observed. Additionally, the cleavage of the C(1')–C(2') bond with hydrogen rearrangement yielded the product ion F3 (at m/z 151 for CAP and m/z 184 for TAP and FF), which for FF and TAP could suffer a σ -bond cleavage, producing the loss of $\cdot\text{CH}_3$ (F4 at m/z 169). The other product ions obtained (Table 3) were different for FF, because of the presence of the fluorine atom in the structure. Whereas CAP and TAP underwent the single σ -bond cleavage of the hydroxyl at R₁ (product ion F5, m/z 266 for TAP), FF showed the neutral loss of HF (m/z 265). This ion yielded the product ion at m/z 202 through the consecutive losses of $\cdot\text{CH}_3$ (m/z 250) and SO from the methylsulfonyl group. It must be pointed out that the experiments performed in the quadrupole-Orbitrap mass analyzer showed the presence of two product ions at m/z 202 Da (Figure S1, Supporting Information). One ion matched the molecular composition $[\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_3\text{N}]^-$ with 1.0 ppm of error, which corresponds to the structure proposed in the fragmentation pathway, and the other agreed with the elemental composition $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_3\text{FS}]^-$ (1.1 ppm of error). The pathway leading to this last structure is not clear, but it might arise from an intramolecular substitution reaction of the fluorine to the C(1').

Ultra high-performance liquid chromatography–MS/MS

The UHPLC-MS/MS behaviour of the phenicol drug family was studied using the three API sources and the UHPLC conditions described in the Experimental Section. As the maximum sensitivity was always obtained monitoring FFA in positive and CAP, TAP and FF in negative mode, polarity switching was performed at 1.45 min, between the retention times of FFA (1.14 min.) and TAP (1.54 min.). The most intense product ions from the base peak obtained in each API source were selected as quantitation and confirmation transitions for SRM. In negative ESI and APPI, the quantitation transition corresponded to the loss of *N*-(alkyl) acetamide for CAP and TAP. This transition was used as confirmation for FF as the loss of HF is favoured providing higher signal intensity. In negative APCI, the quantitation product ion was always that arising from the loss of 2(HCl) from $[\text{M}]^-$; while for confirmation, the loss of 2(HCl) + HF was used for FF and the ions F3 and F7 for CAP and TAP, respectively (Fig. 6). For FFA, the most intense transition corresponded to the loss of water from the

protonated molecule (m/z 248 \rightarrow m/z 230), which is the most commonly used in the literature.^[6,9,22] However, this transition is not selective enough and might lead to errors in quantitation and even to false negatives. For this reason, the more selective third generation product ions at m/z 130 and m/z 131 was chosen that, as can be seen in Fig. 3 (structures F9 and F7, respectively), involved cleavages in different parts of the structure. The SRM transitions proposed for each API source are listed in Table 4 with their optimum collision energies and ion ratios.

Instrumental limits of detection (ILODs), on the basis of a signal-to-noise ratio of 3:1 in the confirmation transition, were estimated by the injection of standards at very low concentration levels. For the ESI sources, very low ILODs were obtained for the compounds analyzed in negative mode (0.4, 0.7 and 0.3 pg for CAP, TAP and FF, respectively); whereas for FFA, the ILOD was an order of magnitude higher (24 pg). These values are low enough for CAP, which as the only banned substance that required very low ILODs. It must be pointed out that an increase of the vaporizer temperature (H-ESI) only improved the ILOD for FFA (10 pg). For the APCI source, ILODs were slightly higher (2, 5 and 1 pg for CAP, TAP and FF, respectively) than those found in ESI, although a great reduction for FFA (1 pg) was obtained, which is in agreement with the improvement observed for this compound using H-ESI instead of ESI. The ILODs obtained with the APPI source were higher (500, 75, 100 and 200 pg for CAP, TAP, FF and FFA, respectively) than with the other sources indicating that this source offered less ionization efficiency for these compounds. According to these results, H-ESI is recommended for the analysis of phenicols by UHPLC-MS/MS.

Conclusions

The ionization behaviour of phenicols with API sources has shown that the most abundant ions generated are highly dependent on the source. Thus, great care must be taken when selecting precursor ions for MS/MS. For instance, in positive ESI, adducts (Na^+ , NH_4^+) must be selected instead of the $[\text{M} + \text{H}]^+$ for CAP, TAP and FF; while in APCI, the protonated molecule must be chosen, and for APPI, the most suitable precursor would be the loss of water. This fact is not as important in negative mode, where the deprotonated molecule was always the base peak except for APCI, where the high concentration of thermal electrons favours the formation of radical ions.

Fragmentation pathways for the phenicol drug family have been established by multiple-stage MS, and they allowed us to conclude

Table 4. Quantitation and confirmation transitions used in selected reaction monitoring mode

Compound	Polarity	API source	Quantitation (CE, eV)	Confirmation (CE, eV)	IR (%RSD)
CAP	Negative	ESI/H-ESI/APPI	321.0 \rightarrow 152.0 (15)	321.0 \rightarrow 257.0 (9)	1.42 (7)
		APCI	322.0 \rightarrow 250.0 (11)	322.0 \rightarrow 151.0 (16)	1.58 (3)
TAP	Negative	ESI/H-ESI/APPI	354.0 \rightarrow 185.0 (20)	354.0 \rightarrow 290.0 (11)	1.14 (4)
		APCI	355.0 \rightarrow 283.0 (10)	355.0 \rightarrow 225.0 (16)	1.83 (12)
FF	Negative	ESI/H-ESI/APPI	356.0 \rightarrow 336.0 (10)	356.0 \rightarrow 185.0 (22)	1.25 (3)
		APCI	357.0 \rightarrow 285.0 (11)	357.0 \rightarrow 265.0 (13)	1.82 (11)
FFA	Positive	All	248.1 \rightarrow 130.0 (26)	248.1 \rightarrow 131.0 (24)	1.80 (7)

API, atmospheric pressure ionization; CE, collision energy; IR, ion ratio; %RSD, relative standard deviation; CAP, chloramphenicol; TAP, thiamphenicol; FF, florfenicol; FFA, florfenicol amine; API, atmospheric pressure ionization; ESI, electrospray; H-ESI, thermally assisted electrospray; APCI, atmospheric pressure chemical ionization; APPI, atmospheric pressure photoionization. $n = 3$.

that in positive mode, the common product ion at m/z 241 can be proposed for the screening of this family of compounds, because all the parent drugs showed this ion in their MS/MS spectra. Additionally, in negative mode, a new fragmentation mechanism and a new structure for product ions at m/z 257 and m/z 290, usually chosen for confirmation purposes for CAP and TAP, respectively, have been suggested. Moreover, the combination of multiple-stage MS and HRMS has enabled to demonstrate that at m/z 202 for FF in negative APCI, there are two ions with different elemental compositions arising from two independent fragmentation mechanisms.

Regarding UHPLC-MS/MS, H-ESI is recommended because it provided the best sensitivity for the compounds, but selectivity must be also considered to prevent errors in quantitation. Taking this fact into account, the use of the product ions at m/z 130 and m/z 131 are recommended for quantitation and confirmation of FFA instead of product ions at m/z 230 and m/z 130, which are the most commonly used in the literature.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support by the Spanish Government under the projects CTQ2012-30836 of the Ministry of Economy and Competitiveness and UNBA10-4E-441 of the Ministry of Science and Innovation. Élide Alechaga thanks the Ministry of Education for a PhD grant.

References

- [1] European Commission. Council Regulation (EEC) 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.* **2009**, L15, 1.
- [2] European Commission. Commission Decision (EC) No. 181/2003 of 30 January 2002 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off. J. Eur. Commun.* **2003**, L71, 17.
- [3] European Commission. 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.* **2002**, L221, 8.
- [4] A. A. M. Stolker, U. A. T. Brinkman. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1067, 15.
- [5] J. Shen, X. Xia, H. Jiang, C. Li, J. Li, X. Li, S. Ding. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, 877, 1523.
- [6] S. B. Turnipseed, J. E. Roybal, A. P. Pfenning, P. J. Kijak. Use of ion-trap liquid chromatography–mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products. *Anal. Chim. Acta* **2003**, 483, 373.
- [7] J. M. Van de Riet, R. A. Potter, M. Christie-Fougere, B. G. Burns. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2003**, 86, 510.
- [8] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography–atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1011, 67.
- [9] S. Zhang, Z. Liu, X. Guo, L. Cheng, Z. Wang, J. Shen. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, 875, 399.
- [10] K. Fujita, H. Ito, M. Nakamura, M. Watai, M. Taniguchi. Determination of chloramphenicol residues in bee pollen by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.* **2008**, 91, 1103.
- [11] A. Tyagi, P. Vernekar, I. Karunasagar, I. Karunasagar. Determination of chloramphenicol in shrimp by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS). *Food Addit. Contam., Part A* **2008**, 25, 432.
- [12] S. R. R. Siqueira, J. L. Donato, G. de Nucci, F. G. R. Reyes. A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine and bovine using LC-ESIMS/MS. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 4012.
- [13] T. Taka, M. C. Baras, Z. F. C. Bet. Validation of a rapid and sensitive routine method for determination of chloramphenicol in honey by LC–MS/MS. *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, 29, 596.
- [14] F. Barreto, C. Ribeiro, R. B. Hoff, T. D. Costa. Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive. *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, 29, 550.
- [15] M. L. Gómez-Pérez, P. Plaza-Bolaños, R. Romero-González, J. L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography–Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2012**, 1248, 130.
- [16] D. R. Rezende, N. F. Filho, G. L. Rocha. Simultaneous determination of chloramphenicol and florfenicol in liquid milk, milk powder and bovine muscle by LC–MS/MS. *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, 29, 559.
- [17] S. B. Turnipseed, S. B. Clark, J. M. Storey, J. R. Carr. Analysis of veterinary drug residues in frog legs and other aquacultured species using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 4430.
- [18] J. Wu, L. Chen, P. Mao, Y. Lu. Determination of chloramphenicol in aquatic products by graphene-based SPE coupled with HPLC-MS/MS. *J. Sep. Sci.* **2012**, 35, 3586.
- [19] L. Chen, B. Li. Magnetic molecularly imprinted polymer extraction of chloramphenicol from honey. *Food Chem.* **2013**, 141, 23.
- [20] J. Zhan, Y. Zhong, X. Yu, J. Peng, S. Chen, J. Yin, J. Zhang, Y. Zhu. Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2013**, 138, 827.
- [21] C. Robert, N. Gillard, P. Y. Brasseur, G. Pierret, N. Ralet, M. Dubois, P. Delahaut. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit. Contam., Part A* **2012**, 30, 443.
- [22] X. Xia, Y. Wang, X. Wang, Y. Li, F. Zhong, X. Li, Y. Huang, S. Ding, J. Shen. 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* **2012**, 1292, 96.
- [23] M. J. Bogusz, H. Hassan, E. Al Enazi, Z. Ibrahim, M. Al Tufail. Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography–electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, 807, 343.
- [24] L. Verzegnassi, D. Royer, P. Mottier, R. H. Stadler. Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit. Contam., Part A* **2003**, 20, 335.
- [25] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 704.
- [26] P. Mottier, V. Parisod, E. Gremaud, P. A. Guy, R. H. Stadler. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2003**, 994, 75.
- [27] S. B. Turnipseed, J. E. Roybal, W. C. Andersen, L. R. Kuck. Analysis of avermectin and moxidectin residues in milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using an atmospheric pressure chemical ionization/atmospheric pressure photoionization source. *Anal. Chim. Acta* **2005**, 529, 159.
- [28] T. J. Kauppila, T. Kotiaho, R. Kostiainen, A. P. Bruins. Negative ion-atmospheric pressure photoionization-mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2004**, 15, 203.

- [29] E. de Hoffmann, V. Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, **2007**, 286–288.
- [30] M. L. Sigsby, R. J. Day, R. G. Cooks. Fragmentation of even electron ions: protonated amines and esters. *Org. Mass Spectrom.* **1979**, *14*, 556.
- [31] J. H. Bowie. The fragmentations of even-electron organic negative ions. *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 349.
- [32] P. J. Krusic, A. A. Marchione, F. Davidson, M. A. Kaiser, C. C. Kao, R. E. Richardson, M. Botelho, R. L. Waterland, R. C. Buck. Vapor pressure

and intramolecular hydrogen bonding in fluorotelomer alcohols. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 6232.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site.

INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA A L'ARTICLE CIENTÍFIC IV

Atmospheric pressure ionization-tandem mass spectrometry of the phenicol drug family.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Journal of Mass Spectrometry (2013) **48**, 1241-1251

Table 1S. Ions in the full-scan spectra of phenicols in APPI using different dopants.

Dopant	Compound	Positive mode		Negative mode		
		<i>m/z</i> (%Rel.Ab.)	Ion assignment	<i>m/z</i> (%Rel.Ab.)	Ion assignment	
Toluene	FFA	248 (100%)	[M+H] ⁺			
		230 (35%)	[M+H - H ₂ O] ⁺			
	TAP	373 (24%)	[M+NH ₄] ⁺	354 (100%)	[M-H] ⁻	
		356 (14%)	[M+H] ⁺	282 (88%)	[M-H - 2(HCl)] ⁻	
		338 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	266 (24%)	[M - 2(HCl) - OH] ⁻	
				225 (35%)	[M - 2(HCl) - NH ₂ COCH ₂] ⁻	
	FF	375 (40%)	[M+NH ₄] ⁺	356 (28%)	[M-H] ⁻	
		358 (5%)	[M+H] ⁺	285 (17%)	[M - 2(HCl)] ^{-*}	
		340 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	266 (40%)	[M - H ₂ FCI ₂] ⁻	
				264 (100%)	[M-H - 2(HCl) - HF] ⁻	
	CAP	323 (8%)	[M+H] ⁺	321 (81%)	[M-H] ⁻	
		305 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	250 (100%)	[M - 2(HCl)] ^{-*}	
		275 (17%)	[M+H - H ₂ O - CH ₂ O] ⁺	249 (58%)	[M-H - 2(HCl)] ⁻	
				192 (22%)	[M - 2(HCl) - NH ₂ COCH ₂] ⁻	
	Chlorobenzene	FFA	248 (100%)	[M+H] ⁺		
230 (51%)			[M+H - H ₂ O] ⁺			
TAP		373 (27%)	[M+NH ₄] ⁺	390 (38%)	[M-H + HCl] ⁻	
		356 (13%)	[M+H] ⁺	354 (100%)	[M-H] ⁻	
		338 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	282 (7%)	[M-H - 2(HCl)] ⁻	
FF		375 (64%)	[M+NH ₄] ⁺	392 (34%)	[M-H + HCl] ⁻	
		358 (5%)	[M+H] ⁺	356 (100%)	[M-H] ⁻	
		340 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	336 (13%)	[M-H - HF] ⁻	
				264 (17%)	[M-H - 2(HCl) - HF] ⁻	
CAP		323 (10%)	[M+H] ⁺	357 (11%)	[M-H + HCl] ⁻	
		305 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	321 (100%)	[M-H] ⁻	
		275 (21%)	[M+H - H ₂ O - CH ₂ O] ⁺	250 (6%)	[M - 2(HCl)] ^{-*}	
Anisole		FFA	248 (100)	[M+H] ⁺		
			230 (68%)	[M+H - H ₂ O] ⁺		
		TAP	373 (23%)	[M+NH ₄] ⁺	354 (84%)	[M-H] ⁻
	356 (17%)		[M+H] ⁺	282 (100%)	[M-H - 2(HCl)] ⁻	
	338 (100%)		[M+H - H ₂ O] ⁺	185 (51%)	[M-H - CH(CH ₂ OH)NHCOCHCl ₂] ⁻	
	FF	375 (53%)	[M+NH ₄] ⁺	356 (50%)	[M-H] ⁻	
		358 (20%)	[M+H] ⁺	264 (100%)	[M-H - 2(HCl) - HF] ⁻	
		340 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	185 (83%)	[M-H - CH(CH ₂ F)NHCOCHCl ₂] ⁻	
	CAP	323 (25%)	[M+H] ⁺	321 (100%)	[M-H] ⁻	
		305 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	250 (89%)	[M - 2(HCl)] ^{-*}	
	Acetone	FFA	248 (100)	[M+H] ⁺		
			230 (65%)	[M+H - H ₂ O] ⁺		
		TAP	373 (20%)	[M+NH ₄] ⁺	354 (100%)	[M-H] ⁻
			356 (11%)	[M+H] ⁺	282 (92%)	[M - 2(HCl)] ⁻
			338 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺	266 (38%)	[M - 2(HCl) - OH] ⁻
				225 (35%)	[M - 2(HCl) - NH ₂ COCH ₂] ⁻	
FF		375 (35%)	[M+NH ₄] ⁺	356 (19%)	[M-H] ⁻	
		358 (5%)	[M+H] ⁺	264 (100%)	[M-H - 2(HCl) - HF] ⁻	
		340 (100%)	[M+H - H ₂ O] ⁺			

	CAP	323 (24%)	$[M+H]^+$	321 (100%)	$[M-H]^-$
		305 (100%)	$[M+H - H_2O]^+$	250 (92%)	$[M - 2(HCl)]^+$
				192 (22%)	$[M - 2(HCl) - NH_2COCH_2]^-$
Tetrahydrofuran	FFA	248 (100%)	$[M+H]^+$		
		230 (16%)	$[M+H - H_2O]^+$		
	TAP	338 (100%)	$[M+H - H_2O]^+$	354 (100%)	$[M-H]^-$
				282 (64%)	$[M-H - 2(HCl)]^-$
				266 (27%)	$[M - 2(HCl) - OH]^-$
	FF	340 (100%)	$[M+H - H_2O]^+$	356 (44%)	$[M-H]^-$
				264 (100%)	$[M-H - 2(HCl) - HF]^-$
	CAP	305 (100%)	$[M+H - H_2O]^+$	321 (100%)	$[M-H]^-$
				250 (43%)	$[M - 2(HCl)]^+$

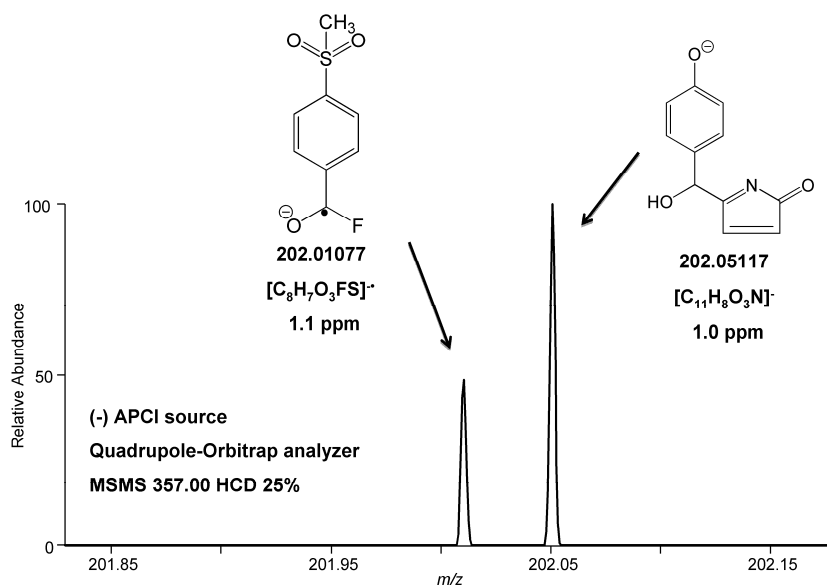


Figure 1S: Product ion scan of the $[M]^-$ of FF obtained with the quadrupole-orbitrap instrument, showing the two product ions at m/z 202 and their proposed structures.

3.2.2. ARTICLE CIENTÍFIC IV

Ion-molecule adduct formation in tandem mass spectrometry.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Rapid Communications in Mass Spectrometry, en viat

ION-MOLECULE ADDUCT FORMATION IN TANDEM MASS SPECTROMETRY

Élida Alechaga, Encarnación Moyano*, Maria Teresa Galceran

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona.

Diagonal 645, 08028, Barcelona, Spain.

* Corresponding author: Encarnación Moyano

Phone: +34-93-402-1286

Fax: +34-93-402-1233

e-mail: encarna.moyano@ub.edu

Keywords: tandem mass spectrometry, ion-molecule adducts, orbitrap, triple quadrupole,
ion trap

Abstract

Nowadays most LC-MS methods rely on tandem mass spectrometry not only for quantitation and confirmation of compounds by multiple reaction monitoring (MRM), but also for the identification of unknowns from their product ion scan spectra. However, gas phase reactions between charged and neutral species inside the mass analyzer can occur yielding to product ions at m/z values higher than that of the precursor ion, or at m/z values difficult to explain by logical losses, that complicate MS/MS spectra interpretation. In this work, the formation of adducts in the mass analyzer was studied using several mass spectrometers with different mass analyzers (ion trap, triple quadrupole and quadrupole-orbitrap). Heterocyclic amines (A α C, MeA α C, Trp-P-1 and Trp-P-2), photoinitiators (BP and THBP) and pharmaceuticals (phenacetin and

levamisole), were selected as model compounds and infused in LCQ Classic, TSQ Quantum Ultra AM and Q-Exactive Orbitrap (ThermoFisher Scientific) mass spectrometers using electrospray as ionization source. The generation of ion-molecule adducts depended on the compound and also on the instrument employed. Adducts with neutral organic solvents (methanol and acetonitrile) were only observed in the ion trap instrument (LCQ Classic), due to the ionization source on-axis configuration and the lack of gas phase barriers, which allowed inertial entrance of the neutrals into the analyzer. Adduct formation (only with water) in the triple quadrupole instruments was much lower than in the ion trap and quadrupole-orbitrap mass spectrometers, due to the lower residence time of the reactive product ions in the analyzer. The moisture concentration in the CID and/or damper gas had a great effect in beam-like analyzers such as the triple quadrupole, but not in trap-like analyzers, probably because of the long residence time allowed adduct formation even with very low concentrations of water inside the mass spectrometer.

1. Introduction

Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) has become a robust and well-established analytical approach for the analysis of small molecules in food, biological and environmental matrices. This technique allows the unequivocal identification and the accurate quantitation of small amounts of a wide range of compounds in complex matrices. A vast majority of the LC-MS methods developed rely on the high sensitivity and selectivity of tandem mass spectrometry for the identification and quantitation of the analytes by collision-induced-dissociation (CID) of a precursor ion and the selection of characteristic product ions. Additionally, the role of product ion scan spectra is of a high importance for the identification and structural characterization of unknowns. The identification of the molecular/pseudo molecular ions generated in the ionization source to assign elemental compositions, the use of mass spectra databases (precursor and product ions) for compound identification and characterization, and the study of the fragmentation pathways of specific analytes/families of compounds are valuable strategies that help in the screening of metabolites or related compounds.

Generally, in a MS/MS spectrum of a mono-charged ion the expected product ions are of lower mass-to-charge ratio (m/z) than the precursor ion. However, in some cases, product

ions at m/z values higher than that of the precursor ion, or at m/z values difficult to explain by logical losses have been observed, suggesting that ion-molecule gas phase reactions inside the mass analyzer may occur. Although the formation mechanism of these “unexpected” product ions has been reported by different authors [1-3] the cause remains unclear. On the one hand, adducts arising from the reaction of product ions with impurities such as water or organic solvents have been reported. Some authors pointed out that these impurities might be residual mobile phase neutral molecules that remain inside the mass spectrometric system [1,4-7]. It has been proposed that CID or damper gas residual moisture is the source for water adduct ions [3,8-11] and even that atmospheric moisture could be adsorbed on the inner stainless surfaces of the mass spectrometer [8,10]. Moreover, it has also been pointed out that residual water from the fore-vacuum zones of the MS instrument can be leaked during the operation of the electric switching allowing the injection of neutral molecules into the mass analyzer [4]. Recently gas phase reactions between product ions and the actual CID gas (N_2) have been also described [12]. In rare occasions, additional intramolecular gas phase reactions of ion-molecule adducts formed in the mass analyzer have been reported, which justify some of the observed product ions that are difficult to explain even by adduct formation [2,13]. Overall, the presence of these ion-molecule adducts often complicates MS/MS spectra interpretation, which could lead to dubious identifications. In addition, this phenomenon has been suggested as a possible cause for inconsistency in quantitation based on MRM acquisition if product ions involved in reversible water losses are selected for quantitation or confirmation purposes [14].

As stated above, many factors affecting the formation of these ion-molecule adducts have been proposed. However, in most studies only one or two of the cited aspects have been evaluated. Moreover, it is difficult to establish the relevance of each factor causing adduct formation since many of them are interdependent. In this work, the adduct formation in mass spectrometric systems is studied. Several mass spectrometers based on different mass analyzer technologies (ion trap, triple quadrupole and quadrupole-Orbitrap) and hybrid configurations (90° vs. 180°) are used to evaluate how the mass spectrometer configuration can affect the adduct ion generation. In addition, other aspects regarding the influence of mobile phase constituents and moisture of CID gas in the formation of adduct ions are also discussed.

2. Experimental

2.1. Reagents and materials

All standards were high purity grade unless stated otherwise. 2-amino- α -carboline (A α C, CAS No. 26148-68-5), 2-amino-3-methyl- α -carboline (MeA α C, CAS No. 68006-83-7), tryptophan p 1 (Trp-P-1, CAS No. 62450-06-0), and tryptophan p 2 (Trp-P-2, CAS No. 62450-07-1) were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Phenacetin (PHEN, CAS No. 62-44-2), levamisol (LEV, CAS No. 16595-80-5), benzophenone (BP, CAS No. 119-61-9), and 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (THBP, CAS No. 131-55-5) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). The chemical structures of all the studied compounds are depicted in Figure 1. Solvents (methanol, acetonitrile and water, all LC-MS grade) were purchased from Sigma-Aldrich. Stock standard solutions at 1000 mg kg⁻¹ were prepared in methanol and acetonitrile by weight and stored at -20°C. Working standard solutions at 1 mg kg⁻¹ were prepared by appropriate dilution with methanol or acetonitrile.

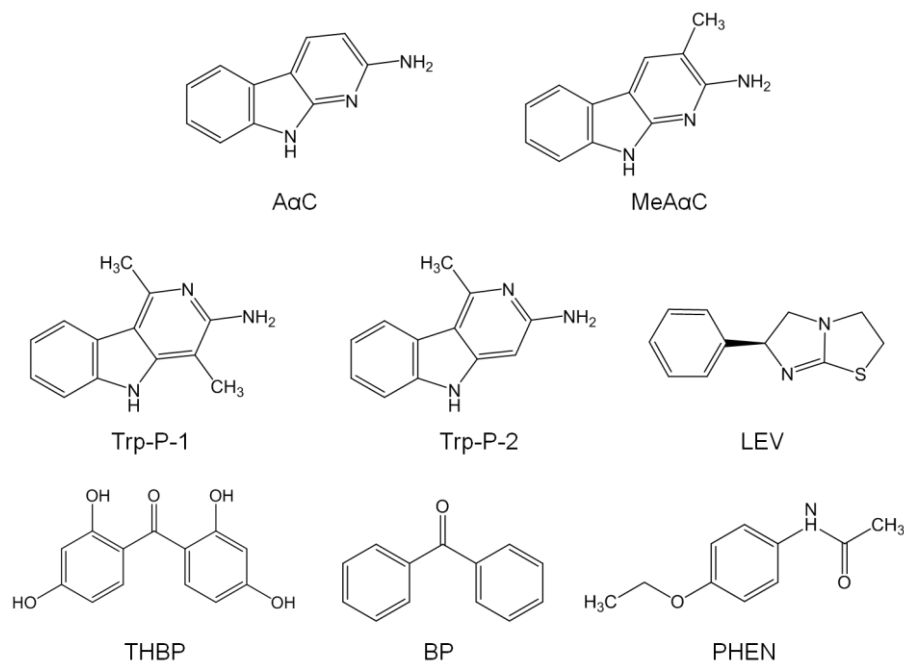


Figure 1. Chemical structures and acronyms of the studied compounds.

2.2. Instrumentation and methods

Full-scan and product ion scan were acquired using several MS instruments. Mass spectra were acquired from direct infusion of 1 mg kg⁻¹ standard solution (in methanol or acetonitrile) at 5 μL min⁻¹ using the built-in syringe pump, and also from the infusion of the same standard (5 μL min⁻¹) in 200 μL min⁻¹ of mobile phase at four different compositions (100% acetonitrile, 100% methanol, acetonitrile:water 1:1, and methanol:water 1:1) using a zero dead volume T-piece for mixing. An Accela 1000 liquid chromatography instrument (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) was used to supply the mobile phase. When the mobile phase was changed the LC-MS system was flushed for at least an hour to ensure stabilization of the experimental conditions. An ion trap LCQ Classic (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany), with helium (purity grade 5.0) as damping and CID gas, was operated in fullscan and multi-stage mass spectrometry (MSⁿ) product ion scan modes using an isolation width of 1.0 *m/z*, normalized collision energy values ranging between 5 and 100%, and activation energy parameters (AQ) between 0.35 and 0.45. Electrospray (ESI) was used as ionization source under the following working conditions when performing direct infusion: spray voltage was 5.4 kV; sheath gas and auxiliary gas were 6 and 2 arbitrary units (a.u.), respectively; capillary temperature was held at 200°C; capillary voltage was 8 V. For experiments regarding the infusion of standards in mobile phase flow rate, the sheath gas and auxiliary gas values were increased up to 75 and 15 a.u. respectively, whereas the rest of the source parameters were maintained at the same values.

A triple quadrupole TSQ Quantum ultra AM (argon purity 5.0 as CID gas, 1.0 mTorr) from ThermoFisher Scientific (Bremen, Germany) equipped with a H-ESI I ionization source was operated in fullscan and product ion scan modes using collision energy values between 0 and 55 eV. The ionization source parameters when working with direct infusion were as follows: spray voltage was 3.0 kV; sheath gas, auxiliary gas and ion sweep gas were 5, 0 and 0 a.u., respectively; vaporizer temperature was held at 30 °C; ion transfer tube temperature was 300 °C. When working with infusion of the standards in mobile phase, the sheath gas and auxiliary gas values were increased up to 40 and 20 a.u., respectively.

A quadrupole-orbitrap Q-Exactive (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany) with N₂ (purity 4.5) as CID and damper gas, was used in full scan mode. Orbitrap was run at a resolution of 17,500 full width half maximum (FWHM), the automatic gain control

(AGC) was set at 10^6 corresponding to an injection time of approximately 5 ms. During product ion scan experiments the isolation width in the quadrupole was 1.0 m/z and the resolution in the Orbitrap was 17,500 FWHM. Nevertheless, the AGC value had to be lowered down to $2 \cdot 10^5$ to maintain the same injection time (5 ms). The normalized collision energy (NCE %) was varied between 10 and 100% in tandem mass spectrometry experiments. H-ESI II source was used as ionization source under the following working conditions: spray voltage was set at 3.0 kV; vaporizer and ion transfer tube temperatures were held at 30 and 320 °C, respectively; sheath gas was 10 a.u. and neither auxiliary gas, nor ion sweep gas were used when working with direct infusion, while values of 40, 10 and 0 a.u. were applied when the infusion was performed in mobile phase, respectively. Data acquisition was performed in positive ionization mode for A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, PHEN, LEV and BP and negative ionization mode for THBP in all instruments. N₂ (purity grade 4.5) was used in all mass spectrometers for desolvation in the ionization source.

3. Results and discussion

In this work, four carbolines (A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2), two pharmaceuticals (PHEN, LEV) and two photoinitiators (BP, THBP) have been selected as model compounds to study the factors that might affect ion-molecule adduct formation. All of the selected model compounds have shown unexpected product ions when studying their fragmentation in tandem mass spectrometry. Standard solutions of the model compounds prepared in either methanol or acetonitrile have been introduced into different mass spectrometry systems to study the causes that favor the adduct ion generation. The standard solutions were both directly infused into the ESI-MS system and also introduced in a carrier solvent (mobile phase) pumped by a liquid chromatography system. In this last case, different mobile phase compositions were tested.

Aside from product ion reactivity, CID and/or damper gas residual moisture, residence time of product ions inside the mass analyzer and ion source axis configuration have been suggested as the main contributors to the formation of adducts in tandem mass spectrometry. So, mass spectrometers with single (ion trap) or hybrid (triple-quadrupole, quadrupole-orbitrap) mass analyzers, with capabilities of performing tandem mass spectrometry either in-time or in-space have been used in this work. Moreover, product ion elemental composition assignments have been confirmed by accurate mass

measurements in the quadrupole-orbitrap mass spectrometer. The selected MS instruments present various configurations (schematics in Figure S1, supporting information) of the ion source (on- and off-axis) and the collision cell (at angles of 90° or 180°). Additionally, each of them uses CID and/or damper gas of different purity, 99.999% or 99.995% pure, corresponding to maximum accounted moisture levels of 3 or 10 ppm, as reported by the supplier.

As a first step, the product ion scan spectra of all the model compounds were acquired in both a "trap-like" mass analyzer (ion trap, Figure S1A, supporting information) and a "beam-like" mass analyzer (triple-quadrupole, Figure S1B, supporting information) and using high purity gases as damper gas and/or for CID fragmentation (less than 3 ppm of moisture). For all the model compounds the product ion spectra were significantly different in each mass spectrometer. As an example, Figure 2 shows the product ion scan spectra obtained for both THBP and PHEN using both instruments. Regarding THBP, aside from the ions at m/z 135 and m/z 109 that corresponded to the cleavage of the benzoyl bond, and to the loss of water (m/z 227) from the precursor ion (m/z 245), other product ions were also observed in the ion trap product ion scan spectrum (Figure 2A). Ions at m/z 153 and m/z 167 might be assigned as adduct ions probably originated by ion-molecule reactions between the product ion at m/z 135 and water and methanol molecules, respectively. However, these adduct ions were not observed in the product ion spectrum obtained in the triple-quadrupole (Figure 2B). For PHEN, adduct formation has been observed when performing 3rd generation multistage mass spectrometry (MS³) in the ion trap. The product ions in the ion trap MS/MS spectrum, m/z 162, m/z 152, m/z 138 and m/z 110 (Figure 2C), can be assigned to the losses of water, C₂H₄, C₂H₂O, and the concurrent losses of C₂H₄ and C₂H₂O, respectively, from the precursor at m/z 180. Nevertheless, in the MS³ spectrum of m/z 110 (also depicted in Figure 2C) several product ions at m/z higher than the precursor ion were also present. These product ions (m/z values 110, 111, 124 and 125) were water and methanol adducts generated by ion-molecule reactions with product ions arising from the losses of ammonia and water (m/z 93 and m/z 92, respectively). This fact was further corroborated by the so-called "ping-pong effect" produced by the cyclic loss and gain of the neutral molecules (water or methanol). This phenomenon can be followed by multistage mass spectrometry by subsequently isolating and fragmenting the adduct and the product ion produced by the adduct in each step, as has been previously described for other compounds [9,15,16]. However, when product ions of 3rd generation were obtained in the triple-quadrupole

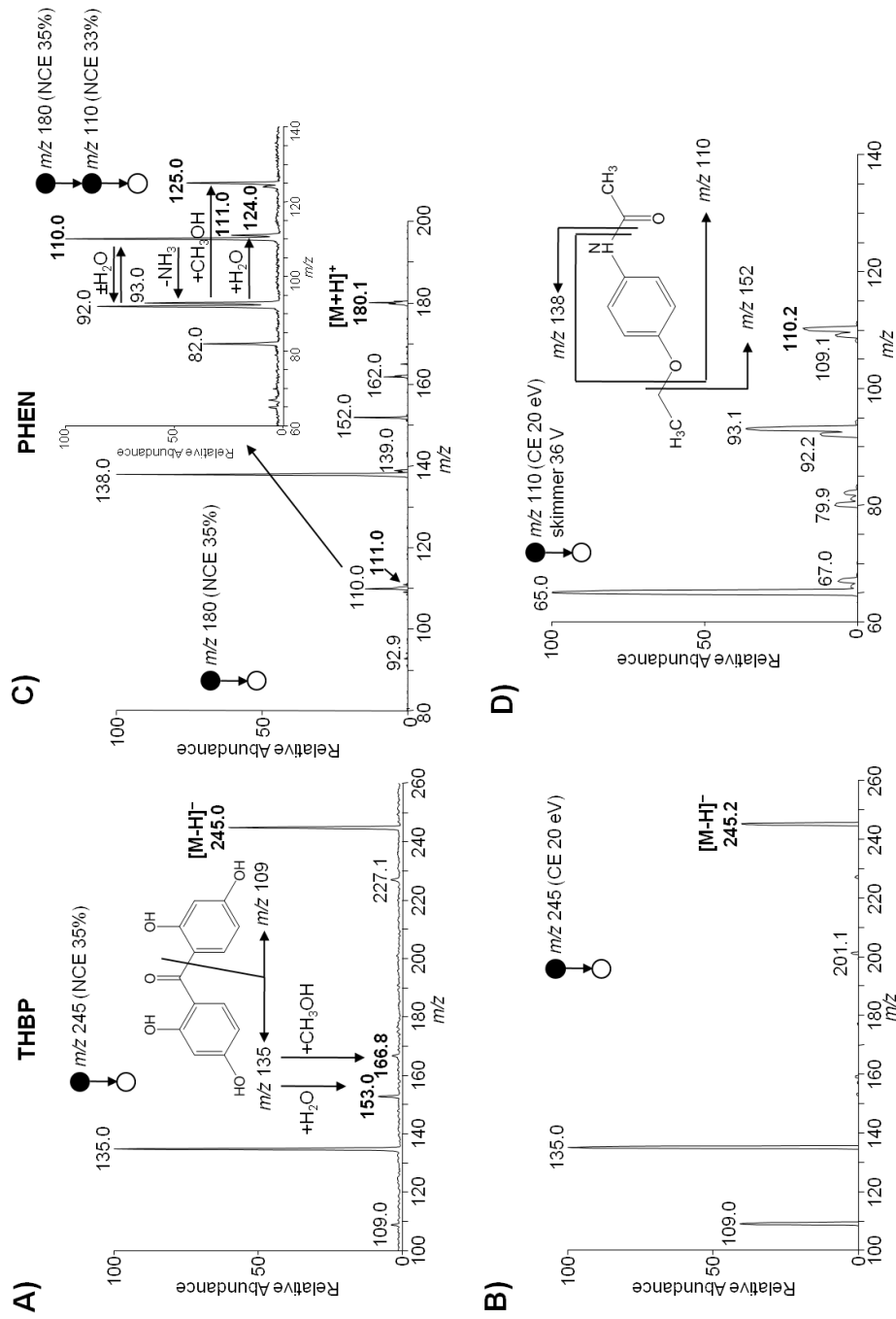


Figure 2. Product ion scan spectra of THBP and PHEN obtained by direct infusion in different mass spectrometers. A) ion trap MS/MS of THBP (NCE 30%), B) triple-quadrupole MS/MS (CE 20 eV) of THBP, C) ion trap MS/MS (NCE 35%) and MS^3 (precursor m/z 110, NCE 33%) of PHEN; D) triple-quadrupole MS/MS of m/z 110 (CE 20 eV) obtained by in-source fragmentation (skimmer voltage 36 V) of PHEN.

(MS/MS fragmentation of 2nd generation product ion at m/z 110 originated by in-source fragmentation), the adduct ions commented above m/z 111, 124 and 125 (Figure 2D) were not present in the MS/MS spectrum. The rest of the model compounds showed the same behavior, that is, ion-molecule adducts (water, methanol and/or acetonitrile) were observed at high relative abundances when using the ion trap, whereas with the triple-quadrupole organic solvent adducts were not observed, and the presence of water adducts was minimal, only noticeable for the most reactive compounds such as the carbolines (A α C, MeA α C, Trp-P-1 and Trp-P-2).

To further explore the influence of the mobile phase organic solvent in adduct ion generation, the ion trap product ion scan spectrum of each model compound was obtained by infusing the standard solutions in different binary and ternary mobile phase mixtures of methanol:water:acetonitrile, and noticeable differences in the MS/MS spectra were observed. As an example, Figure 3 shows the MS/MS spectra acquired for MeA α C. As it can be seen, when the mobile phase was changed from acetonitrile:water 1:1 (Figure 3A) to methanol:water 1:1 (Figure 3D), the adduct species changed from acetonitrile (m/z 222) to methanol (m/z 213). When both solvents were present both methanol and acetonitrile adduct ions were observed with relative intensities depending on the solvent percentage (Figure 3B and 3C). Additionally, the water adduct (m/z 199) was always present at high relative intensities. However, when these experiments were performed in a triple-quadrupole and in a quadrupole-orbitrap (Figure S1C, supporting information) instruments, both with off-axis ion source configuration and a 90° transmission lenses and/or collision cell, the presence of ion-molecule adducts was reduced drastically. No adducts with methanol or acetonitrile were observed, and the same product ion mass spectrum was obtained regardless of the organic solvent used. This can be explained because in early MS instruments such as the ion trap LCQ Classic, the inertial entrance of neutral solvent molecules into the mass analyzer region is favored by the linear configuration (on-axis source, mass analyzer at a 180° angle) of the mass spectrometer, and the vacuum level (10^{-5} Torr) is not low enough to properly evacuate all the neutral molecules. Nowadays, almost all modern mass spectrometric systems use off-axis ionization source configurations and gas phase barriers (sweep gas or curtain gas) to reduce background noise and also to improve sensitivity, preventing the formation of ion-molecule adducts with solvents from the mobile phase.

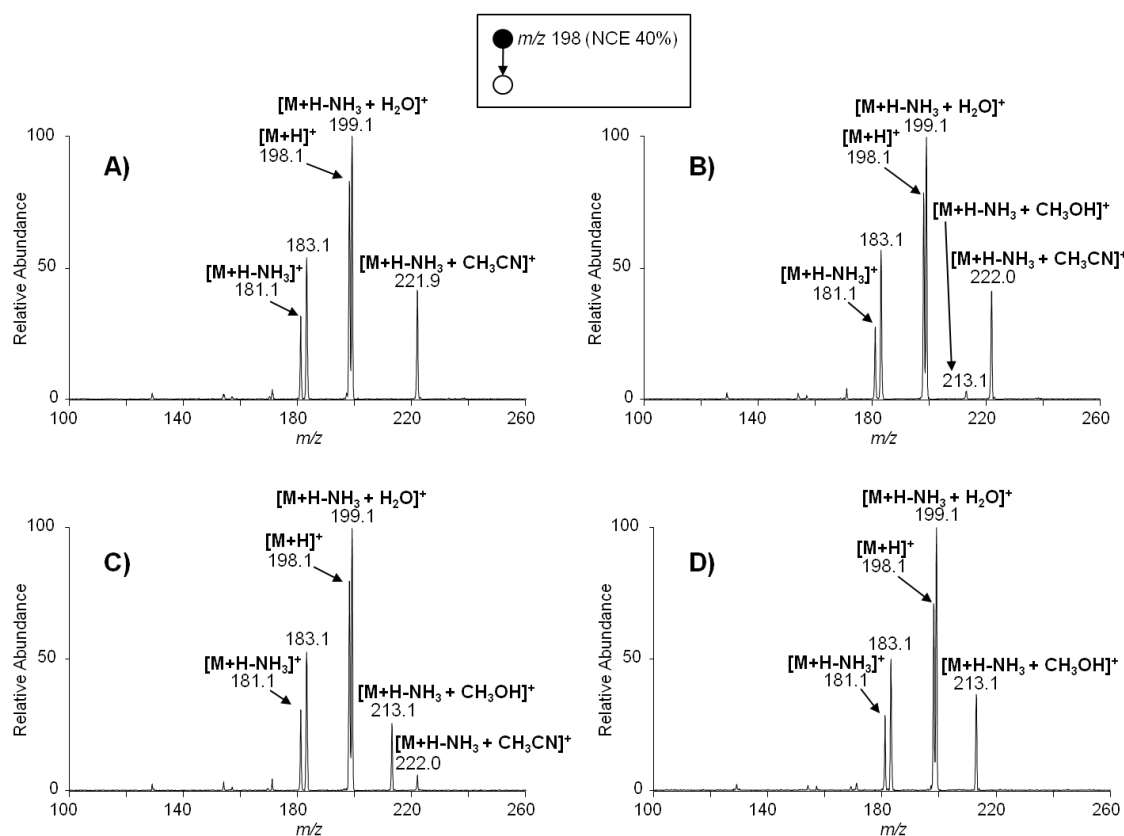


Figure 3. Product ion spectra of a standard solution of MeA α C (precursor ion m/z 198, NCE 40%) acquired in an ion trap mass spectrometer by infusion (5 $\mu\text{L min}^{-1}$) of the standard into different mobile phase (300 $\mu\text{L min}^{-1}$) compositions: A) acetonitrile:water 1:1; B) methanol:acetonitrile:water 2.5:48.75:48.75; C) methanol:acetonitrile:water 48.75:2.5:48.75; D) methanol:water 1:1.

To evaluate the effect of the collision cell layout, two QqQ instruments, one with a 90° curved collision cell (TSQ) and another with a linear collision cell (API 3000, scheme shown in Figure S1D, supporting information), were compared. Figure 4 shows the MS/MS spectra of Trp-P-2 acquired in the two triple quadrupole instruments where it can be observed that the relative intensity of the water adduct (m/z 199) is slightly higher (22%) in the API 3000 (Figure 4, bottom), than in the TSQ (5%) instrument (Figure 4, top). However, the observed difference in the relative intensity of the water adduct ion can be also attributed to other factors such as the pressure inside the mass analyzer region, that is one order of magnitude higher in the API 3000 mass spectrometer (10^{-5} Torr) than in the TSQ instrument (10^{-6} Torr), allowing a higher content in neutral molecules. The origin of the water molecules causing the observed adducts may be the mobile phase

solvent or the moisture of the CID gas used in the collision cell (up to 10 ppm in the N₂ used in the API 3000 *vs.* less than 3 ppm in the Ar used in the TSQ). Since adducts with neutral organic solvent molecules such as methanol and acetonitrile are not present in the API 3000 MS/MS spectra, the most probable origin of the water inside the MS system seems to be the moisture of the CID gas. This is in agreement with some results found in the literature that indicated the generation of adducts when performing tandem mass spectrometry experiments using CID gas doped with D₂O [8]. However, it must be pointed out that these experiments used a very high water concentration in the CID gas (~2.300 ppm of D₂O *vs.* <10 ppm of water present in a 99.995% CID gas) and that could be the cause for such strong dependence.

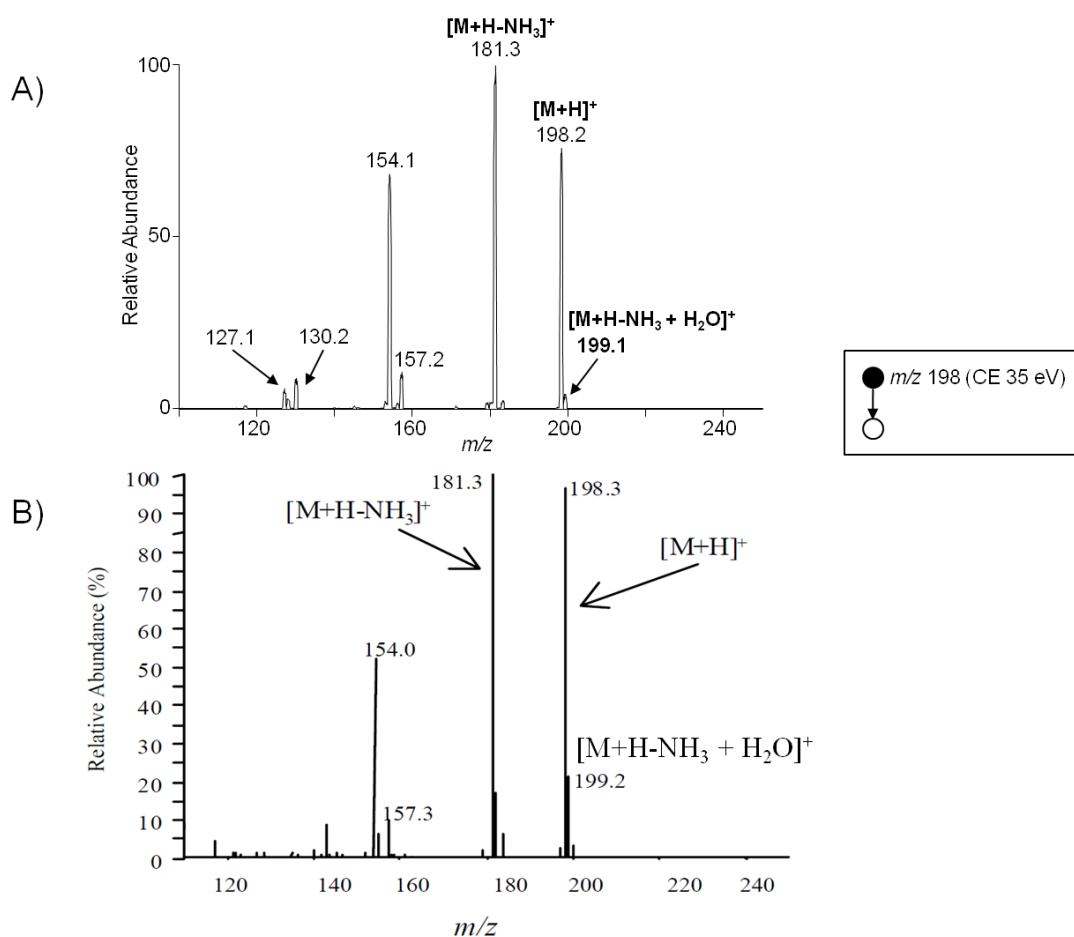


Figure 4. Product ion scan spectra of Trp-P-2 obtained in two triple-quadrupole mass spectrometers: A) TSQ (off-axis configuration of both ionization source and mass analyzer) and B) API 3000 (off-axis configuration of the ionization source and on-axis configuration of the mass analyzer), reprinted with permission from [17], copyright (2004) Elsevier.

To provide further evidence on the effect of CID gas moisture in adduct formation, the product ion spectra of the model compounds acquired in the TSQ triple-quadrupole (Ar, < 3 ppm moisture) were compared with those observed in the Q-Exactive quadrupole-orbitrap (N₂ < 10 ppm moisture). It must be taken into account that both instruments have tandem mass analyzer off-line configuration (90° transmission lenses and/or collision cell). As an example, Figure 5 shows the MS/MS spectra of AαC obtained in the triple-quadrupole (Figure 5, top) and in the quadrupole-orbitrap (Figure 5, bottom). As it can be seen, the ion ratio of the water adduct ion (*m/z* 185) and the product ion (*m/z* 167) from which it was generated (promoting ion) was much higher in the Q-Exactive (ion ratio: 1.4) instrument than in the TSQ (ion ratio: 0.1). Water adducts with high relative intensities were obtained in the Q-Exactive for the rest of the studied compounds, as it is shown in Table 1, that lists the relative abundances of the ion-molecule adducts and their corresponding promoting ions in the quadrupole-orbitrap mass spectrometer. As it can be seen, adduct relative intensities ranged from very low, (2.3% relative abundance for LEV), to high relative abundances, such as 60% for AαC, and in some cases they even became the base peak at some collision energies (Figure 5B). This indicates that water adduct formation is favored in the quadrupole-orbitrap, either by CID/damper gas with higher moisture content or by the longer residence time of product ions in this instrument. Since the quadrupole-orbitrap instrument operated under a much lower vacuum (10⁻¹⁰ Torr) than the triple-quadrupole (10⁻⁶ Torr), less residual ambient moisture was expected, and as a consequence less water adduct formation should be also observed. However, as the quadrupole-orbitrap used a CID/damper gas that contained up to 10 ppm of water (99.995% purity), further experiments were performed to assess the importance of the CID gas moisture content in the formation of water adducts. To this end, a moisture trap was installed between the gas supply and the quadrupole-orbitrap mass spectrometer gas inlet and the experiments were repeated. Nonetheless, the observed relative intensity did not decrease either after installing the moisture trap, or after performing a system bake-out (heating the mass analyzer area for 10 h) to remove moisture absorbed to the inner surfaces of the instrument. Additional experiments were performed in a single orbitrap mass spectrometer (Exactive also from ThermoFisher Scientific) which used high purity N₂ as CID/damper gas (less than 3 ppm of water), and the all-ion fragmentation spectra of the model compounds showed water adducts with relative intensities similar to those observed in the Q-Exactive also operating in all-ion fragmentation mode (data not shown). This led to the conclusion that the small residual moisture content present in the

system is enough to generate water adducts in orbitrap mass spectrometers when dealing with highly reactive ions. This is in agreement with the work of Beuck *et al.*, who also observed no impact in adduct formation when the N₂ used as CID gas was changed for another of a higher purity (5.0) when working with an ion trap-orbitrap instrument [15].

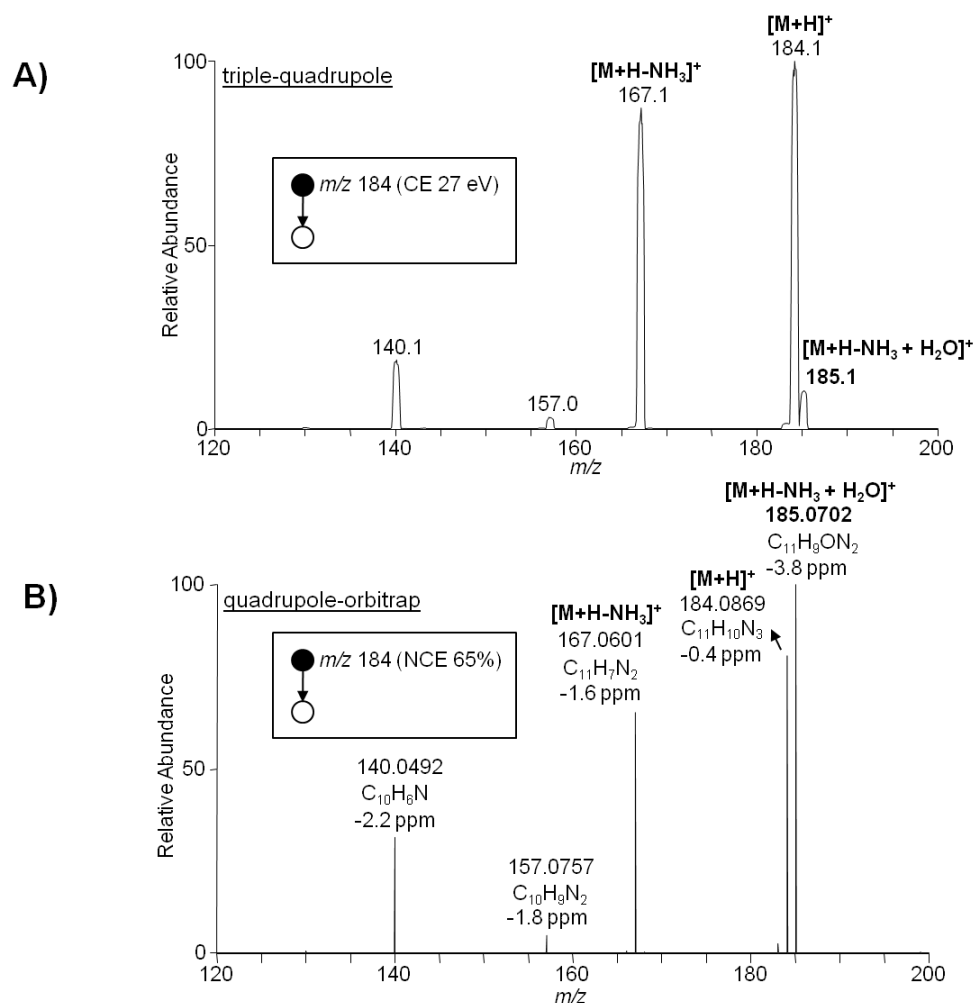


Figure 5. Product ion scan spectra of A α C in (A) a triple-quadrupole and (B) a quadrupole-orbitrap mass spectrometer.

A possible reason as to why even at small moisture quantities water adduct formation can be observed in orbitrap mass spectrometers might be the several ion trapping steps taking place during the instrument operation. When a MS/HRMS spectrum is performed, product ions are trapped several times (C-trap, HCD cell, orbitrap) which results in a high residence time (milliseconds) that allows high interaction of the reactive product ion with the residual moisture. The same behavior was found by other authors, for instance, Chan *et al.* observed that adduct formation not only was proportional to the product ion affinity

Table 1. Relative intensities, ion assignments and mass accuracies for the ion-molecule adducts and the product ions from which they have been generated (promoting ions) using a quadrupole-orbitrap mass spectrometer.

Compound	Precursor ion m/z (NCE, %)	Ion-molecule adduct		Promoting product ion			
		m/z (% Rel. Ab.)	Ion assignment	Mass accuracy (ppm)	m/z (% Rel. Ab.)	Ion assignment	Mass accuracy (ppm)
A α C	184.0868 (80)	185.0704 (60.6%)	[M+H-NH ₃ + H ₂ O] ⁺	-2.8	167.0601 (88.7%)	[M+H-NH ₃] ⁺	-1.7
MeA α C	198.1022 (75)	199.0862 (40.9%)	[M+H-NH ₃ + H ₂ O] ⁺	-2.2	181.0756 (100%)	[M+H-NH ₃] ⁺	-2.1
Trp-P-1	212.1178 (80)	213.1017 (7.1%)	[M+H-NH ₃ + H ₂ O] ⁺	-2.7	195.0913 (73.4%)	[M+H-NH ₃] ⁺	-1.9
Trp-P-2	198.1021 (80)	199.0861 (5.5%)	[M+H-NH ₃ + H ₂ O] ⁺	-2.6	181.0755 (54.4%)	[M+H-NH ₃] ⁺	-2.8
PHEN	180.1019 (55)	111.0440 (6.0%)	[M+H-C ₄ H ₉ NO + H ₂ O] ⁺	-0.5	93.0336 (3.3%)	[M+H-C ₄ H ₉ NO] ⁺	0.9
		110.0600 (100%) ^a	[M+H-C ₄ H ₈ O ₂ + H ₂ O] ⁺	-0.6	92.0495 (4.6%)	[M+H-C ₄ H ₈ O ₂] ⁺	0.3
BP	183.0806 (50)	95.0492 (10.3%)	[M+H-C ₇ H ₆ O + H ₂ O] ⁺	1.0	77.0386 (1.9%)	[M+H-C ₇ H ₆ O] ⁺	0.3
THBP	245.0456 (40)	153.0194 (20.6%)	[M+H-C ₆ H ₆ O ₂ + H ₂ O] ⁺	0.7	135.0090 (83.3%)	[M+H-C ₆ H ₆ O ₂] ⁺	1.4
LEV	205.0794 (80)	146.0600 (2.3%)	[M+H-CH ₅ N ₂ S + H ₂ O] ⁺	-0.3	128.0496 (3.0%)	[M+H-CH ₅ N ₂ S] ⁺	1.0
		95.0492 (5.0%)	[M+H-C ₃ H ₈ N ₂ S + H ₂ O] ⁺	0.5	77.0385 (1.3%)	[M+H-C ₃ H ₈ N ₂ S] ⁺	-0.6

^a ion at m/z 110.0600 is also a product ion [M+H-C₄H₆O]⁺ obtained directly from the precursor.

for the neutral molecule (reactivity) but also to the residence time of the product ion in the mass analyzer [3]. Attygale *et al.* compared the formation of adducts with halogenated benzoic acids using different mass spectrometers and no adducts were observed when triple-quadrupole and Q-TOF (beam-like) instruments were used whereas they were frequently present when using ion trap and Q-trap (trap-like) mass spectrometers [13].

4. Conclusions

In this work, adduct ion generation has been studied taking into account several factors such as instrument configuration and CID gas impurities. The results have demonstrated that adduct formation can occur more frequently than expected. The main factor affecting adduct formation in tandem mass spectrometry is the instrument configuration. The use of an on-axis ionization source, without gas phase barriers (curtain or ion sweep gases) and a relatively low vacuum level in the MS instrument (such as in the LCQ Classic ion trap mass spectrometer) led to high relative abundances of adducts with solvent molecules (water and organic solvents) from the mobile phase. Conversely, the off-axis ionization sources used in modern mass spectrometers prevented mobile phase adduct generation and only water adducts, originated from the moisture of the CID and/or damper gas are observed. In beam-like analyzers such as the triple quadrupoles, ion-molecule gas phase reactions forming water adducts can be further reduced by increasing the quality of the CID gas. However, in trap-like instruments this approach (the use of moisture traps or CID/damper gases of a high purity) does not greatly affect adduct formation, as the long residence time inside the analyzer or the multiple entrapments performed seem to be the most important factors in this case. For other mass analyzers such as the triple-quadrupole, TOF or Q-TOF, the presence of ion-molecule adducts is less probable and only should be taken into account for those compounds generating highly reactive product ions such as the carbolines.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the financial support received from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under the project CTQ2012-30836 and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain)

under the project 2014 SGR-539. The authors also wish to acknowledge Dr. Josep Caixach's assistance with the Exactive mass spectrometer.

References

- [1] A. Weisz, D. Andrzejewski, H.M. Fales, A.Mandelbaum, Attachment of neutrals during tandem mass spectrometry of sulfonic acid dyes and intermediates in an ion trap. *J. Mass. Spectrom.* 37 (2002) 1025-1033.
- [2] J. Sultan, Collision induced dissociation of deprotonated guanine: Fragmentation of pyrimidine ring and water adduct formation. *Int. J. Mass Spectrom.* 273 (2008) 58-68.
- [3] C. Chan, F. U. Axe, M. Bolgar, A. B. Attygalle, Reactivity of gaseous sodiated ions derived from benzene dicarboxylate salts toward residual water in the collision gas. *J. Mass Spectrom.* 45 (2010) 1130-1138.
- [4] Z. Guan, J.M. Liesch, Solvation of acylium fragment ions in electrospray ionization quadrupole ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 264-276.
- [5] S. Kölliker, M. Oehme, L. Merz, Unusual MSⁿ fragmentation patterns of 2,1-dinitrophenylhydrazine and its propanone derivative. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 2117-2126.
- [6] F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser. *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 812-828.
- [7] R. Tuytten, F. Lemièrre, E. L. Esmans, W. A. Herrebout, B. J. Van Der Veken, E. Dudley, R. P. Newton, E. Witters. In-Source CID of guanosine: gas phase ion-molecule reactions. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 17 (2006) 1050-1062.
- [8] R. Tuytten, F. Lemièrre, W. Van Dongen, E.L. Esmans, E. Witters, W. Herrebout, B. Van Der Veken, E. Dudley, R.P. Newton, Intriguing Mass Spectrometric Behavior of Guanosine Under Low Energy Collision-Induced Dissociation: H₂O Adduct Formation and Gas-Phase Reactions in the Collision Cell. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1291-1304.
- [9] S. K. Lee, H. J. Kim, C. Jin, J. Lee, Formation of the unusual [M+H-11 Da]⁺ ion peak in the collision-induced dissociation mass spectrum of [M+H]⁺ ion of hydrochlorothiazide. *J. Mass Spectrom.* 44 (2009) 1538-1541.

- [10] C. P. Chander, G. Raju, G. Mathai, R. Srinivas, H. K. Gaikwad, R. Bantu, L. Nagarapu, Electrospray ionization tandem mass spectrometry of 3-phenyl-N-(3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide derivatives: unusual fragmentation involving loss of 11 u. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26 (2012) 207-214.
- [11] P. Neta, B. Godugu, Y. Liang, Y. Simón-Manso, X. Yang, S. E. Stein, Electrospray tandem quadrupole fragmentation of quinolone drugs and related ions. On the reversibility of water loss from protonated molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 3271-3278.
- [12] Y. Liang, P. Neta, Y. Simón-Manso, S. E. Stein, Reaction of arylum ions with the collision gas N₂ in electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 29 (2015) 629-636.
- [13] A.B. Attygalle, N. Kharbatia, J. Bialecki, J. Ruzicka, A. Svatos, E. J. Stauber, An unexpected ion-molecule adduct in negative-ion collision-induced decomposition ion-trap mass spectra of halogenated benzoic acids. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20 (2006) 2265-2270.
- [14] P. Neta, M. Farahani, Y. Simón-Manso, Y. Liang, X. Yang, S. E. Stein, Unexpected peaks in tandem mass spectra due to reaction of product ions with residual water in mass spectrometer collision cells. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 28 (2014) 2645-2660.
- [15] S. Beuck, T. Schwabe, S. Grimme, N. Schlörer, M. Kamber, W. Schänzer, M. Thevis, Unusual Mass Spectrometric Dissociation Pathway of Protonated Isoquinoline-3-Carboxamides Due to Multiple Reversible Water Adduct Formation in the Gas Phase. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 2034-2048.
- [16] M. Thevis, M. Kohler, N. Schlörer, W. Schänzer, Gas Phase Reaction of Substituted Isoquinolines to Carboxylic Acids in Ion Trap and Triple Quadrupole Mass Spectrometers after Electrospray Ionization and Collision-Induced Dissociation. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 19 (2008) 151-158.
- [17] E. Barceló-Barrachina, E. Moyano, L. Puignou, M. T. Galceran, Evaluation of different liquid chromatography–electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 67-78.

INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA A L'ARTICLE CIENTÍFIC IV

Ion-molecule adduct formation in tandem mass spectrometry.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Rapid Communications in Mass Spectrometry, enviat

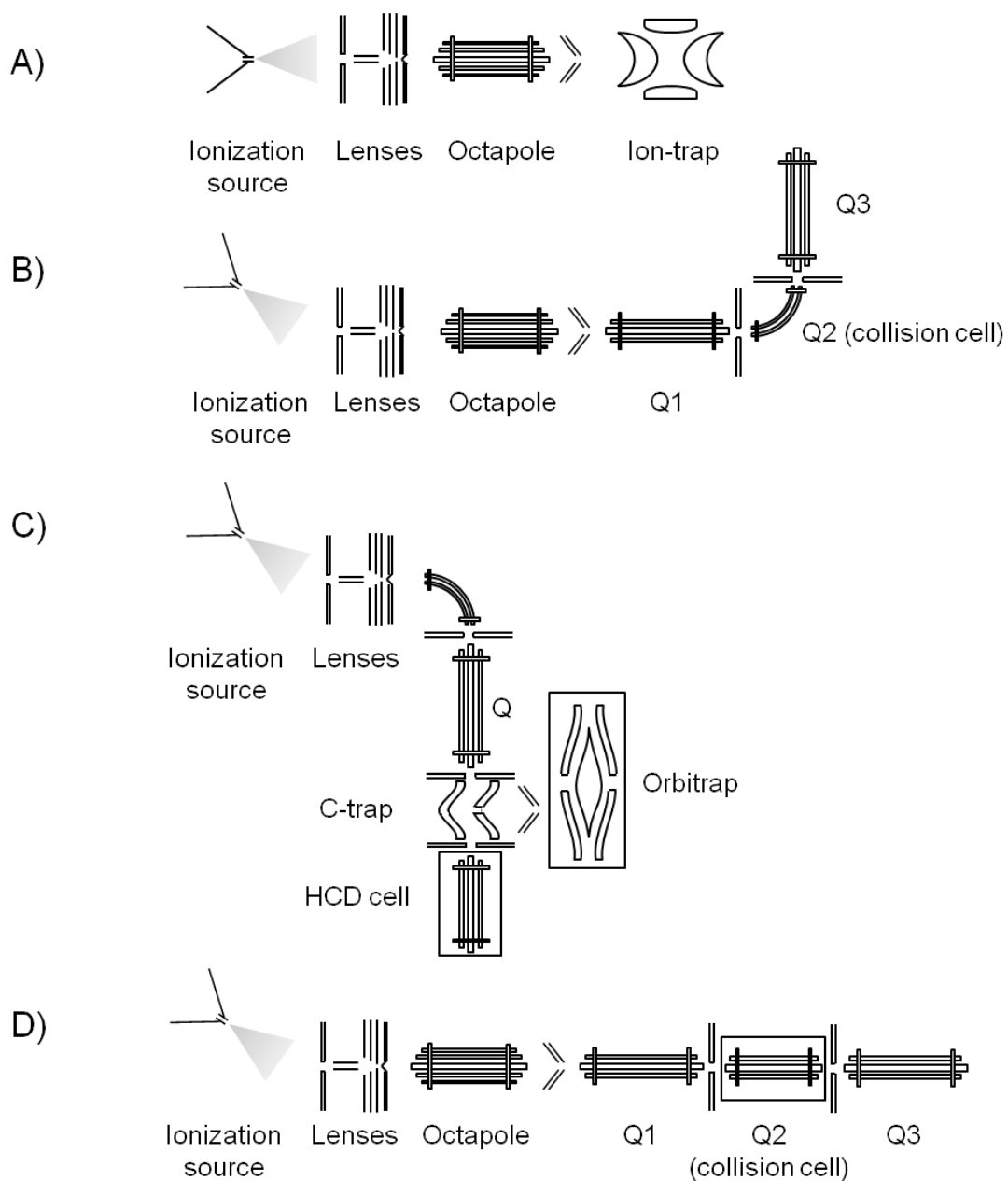


Figure S1. Schematics of mass spectrometers used in this work: A) ion trap LCQ; B) triple-quadrupole TSQ; C) quadrupole-orbitrap Q-Exactive; D) triple-quadrupole API 3000.

3.2.3. ARTICLE CIENTÍFIC VI

Wide-range screening of psychoactive substances by FIA-HRMS: identification strategies.

É. Alechaga, E. Moyano, M. T. Galceran

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2015) **407**, 4567-4580

Wide-range screening of psychoactive substances by FIA–HRMS: identification strategies

Élida Alechaga¹ · Encarnación Moyano¹ · Maria Teresa Galceran¹

Received: 20 January 2015 / Revised: 14 March 2015 / Accepted: 18 March 2015 / Published online: 11 April 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Recreational drugs (illicit drugs, human and veterinary medicines, legal highs, etc.) often contain lacing agents and adulterants which are not related to the main active ingredient. Serious side effects and even the death of the consumer have been related to the consumption of mixtures of psychoactive substances and/or adulterants, so it is important to know the actual composition of recreational drugs. In this work, a method based on flow injection analysis (FIA) coupled with high-resolution mass spectrometry (HRMS) is proposed for the fast identification of psychoactive substances in recreational drugs and legal highs. The FIA and HRMS working conditions were optimized in order to detect a wide range of psychoactive compounds. As most of the psychoactive substances are acid–base compounds, methanol–0.1 % aqueous formic acid (1:1 v/v) as a carrier solvent and electrospray in both positive ion mode and negative ion mode were used. Two data acquisition modes, full scan at high mass resolution (HRMS) and data-dependent tandem mass spectrometry (ddMS/HRMS) with a quadrupole–Orbitrap mass analyzer were used, resulting in sufficient selectivity for identification of the components of the samples. A custom-made database containing over 450 substances, including psychoactive compounds and common adulterants, was built to perform a high-throughput target and suspect screening. Moreover, online accurate mass databases and mass fragmenter software were used to identify unknowns. Some examples, selected among the analyzed samples of recreational drugs and legal highs using the FIA–HRMS(ddMS/HRMS) method developed,

are discussed to illustrate the screening strategy used in this study. The results showed that many of the analyzed samples were adulterated, and in some cases the sample composition did not match that of the supposed marketed substance.

Keywords Psychoactive substances · Flow injection analysis–high-resolution mass spectrometry · Orbitrap · Legal highs · Screening

Introduction

The recreational use of psychoactive substances is one of the main causes for concern in our society. Some illicit drugs such as cannabis, cocaine, and methamphetamine are still consumed in quite great quantities in Europe, and only heroin consumption seems to be declining [1]. Moreover, the consumption of multiple drugs is a common practice owing to either voluntary consumption of different drug products, or nonvoluntary consumption of impurities or adulterating agents, as well as the use of fraudulent products. For instance, some reports indicate that drug-induced deaths usually occur among individuals who have consumed multiple psychoactive substances [1]. In addition, new psychoactive substances, commonly known as “research chemicals” or “legal highs,” have appeared on the market. These drugs were synthesized in the last few decades originally for research purposes. As most of them have psychotropic effects that can mimic those of more traditional drugs of abuse, they have been intentionally manufactured and distributed, circumventing the existing laws concerning controlled substances. To this end, legal highs are sold mostly as “herbal blends,” “bath salts,” or “plant food” and are marketed as “not for human consumption” to avoid clinical health tests. Their use has also raised concern owing to the obvious misinformation shown on the packaging, where

✉ Encarnación Moyano
encarna.moyano@ub.edu

¹ Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

the actual composition is often not indicated. The high number of substances marketed as legal highs and their fast development and modification by drug designers challenge analytical tasks. The substances most frequently found in these products are synthetic cannabinoids, salvia, mephedrone, and synthetic cathinones, although substituted phenethylamines and other derivatives have also been reported [1–3].

In 1971 the United Nations adopted the Convention on Psychotropic Substances establishing the protocol for the control of psychoactive substances. Among the cathinone family, cathinone and methcathinone are listed in Schedule I and amfepramone and pyrovalerone are in Schedule IV of that convention, but other derivatives are not under international control. A few other cathinone derivatives are controlled in some EU member states, and by Council Decision of 2 December 2010, 4-methylmethcathinone (mephedrone) was submitted to control measures in EU member states [4]. No cannabinoids are under international control by the UN drug control conventions, but JWH-018, JWH-073, HU-210, and CP 47,497 (and its C6, C8, and C9 homologues) are scheduled drugs in some EU member states. In spite of the legal developments, new compounds are constantly being introduced on the black market and distributed by the Internet, hindering the control of these substances. Governmental institutions such as the European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction have started to control and to inform about psychoactive substances, adulterants, and frauds in recreational drug marketing. In Spain, many NGOs (e.g., Red Cross, Energy Control, and Ai Laket) are working on campaigns to collect samples donated by anonymous individuals in places where these substances are consumed. The purpose of these sampling campaigns is to obtain first-hand information on drug consumption and drug composition in order to inform young people about the risks of using recreational drugs. In many cases it has not been possible to identify the alleged substances, indicating that for recreational drugs, frauds and adulterations are frequent, and that analytical methods must be able to deal with the identification of unknown compounds that may not be related to the recreational drug supposedly provided.

Most of the analytical methods that deal with the screening or quantitation of psychoactive substances are based on liquid chromatography (LC) or gas chromatography coupled with low-resolution mass spectrometry (MS) and tandem MS (MS/MS) [5–10]. However, these analytical methods allow only targeted or nontargeted approaches for a small number of substances. Additionally, for the screening of a high number of synthetic drugs, the separation efficiency of ultra-high-performance LC (UHPLC) coupled with the high selectivity of high-resolution MS (HRMS) is often required. For instance, the screening of new synthetic cannabinoids has been performed with UHPLC-time-of flight (TOF) and UHPLC–quadrupole TOF (QTOF) systems [11, 12]. With the use of

HRMS, some unknown analogues within the cannabinoid family were identified in legal highs, but to perform such identification, chromatographic separations were needed. New MS approaches have also been proposed for the surveillance of emerging drugs of abuse [13], such as direct analysis in real time [14], desorption electrospray ionization (ESI) [15], and ion mobility [16], but most of these applications are focused on the targeted analysis of a reduced number of compounds, often belonging to one specific family of psychoactive substances. To the best of our knowledge, only one method based on flow injection analysis (FIA) coupled with MS has been published [17] for the targeted analysis of psychoactive substances, including mephedrone, ketamine, and amphetamine-like stimulants in urine. But to this day, no methods based on FIA–MS for global nontargeted analysis of recreational drugs have been published.

In this work, we report on the development of a method based on FIA coupled with HRMS for the screening of recreational drugs and legal highs. The method combines the simplicity of FIA and the high selectivity of HRMS. Full-scan HRMS and data-dependent MS/MS (ddMS/HRMS) on a quadrupole–Orbitrap system provide accurate mass structural information for the subsequent automated database search in both custom-made and online databases. The proposed method allows the fast and reliable identification of a wide range of compounds, including target compounds, suspect compounds, and unknowns, in drug samples.

Experimental

Reagents and materials

Cocaine (1 mg mL⁻¹ in acetonitrile, CAS no. 50-36-2), (±)-3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA; 1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 42542-10-9), ketamine hydrochloride (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 1867-66-9), (±)-amphetamine (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 300-62-9), (±)-methamphetamine (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 4846-07-5), ethylone hydrochloride (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 1112937-64-0), butylone hydrochloride (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 17762-90-2), 3-fluoromethcathinone hydrochloride (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 1346600-40-5), and 4-fluoromethcathinone hydrochloride (1 mg mL⁻¹ in methanol, CAS no. 7589-35-7), were purchased from Cerilliant (Round Rock, TX, USA). Benzocaine (analytical standard, CAS no. 94-09-7), levamisole (analytical standard, CAS no. 16595-80-5), phenacetin (98 %, CAS no. 62-44-2), caffeine (reagent plus, CAS no. 58-08-2), lidocaine (analytical standard, CAS no. 137-58-6), 2-aminoindan (97 %, CAS no. 2975-41-9), and *N*-methylephedrine (analytical standard, CAS no. 552-79-4) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). (+)-ephedrine hydrochloride (99 %,

CAS no. 134-71-4) was purchased from Analyticals Carlo Erba (Val de Reuil, France). LC/MS grade acetonitrile, methanol, and water were obtained from Fluka (Steinheim, Germany), and formic acid (98–100 %) was provided by Merck (Darmstadt, Germany). Stock solutions of the standards (1,000 mg kg⁻¹) were prepared individually by weight in methanol and were stored at -20 °C. Intermediate solutions were prepared monthly from the stock standard solution by appropriate dilution with methanol–0.1 % aqueous formic acid (1:1 v/v). All samples and mobile phases were filtered through 0.22- μ m nylon membrane filters purchased from Whatman (Clifton, NJ, USA) to avoid clogging of the electrospray capillary.

Instrumentation and methods

For FIA, a carrier solvent of a 1:1 mixture of methanol and 0.1 % aqueous formic acid at a flow rate of 150 μ L min⁻¹ was delivered by an Accela LC system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a quaternary UHPLC pump. A sample volume of 10 μ L was injected into the carrier flow via an Accela AS autosampler (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). MS was performed with a Q Exactive quadrupole–Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a heated ESI probe (HESI-II) as the ionization source and a high-energy collisional dissociation cell for MS/MS. Nitrogen (99.95 % pure, Air Liquide, Madrid, Spain) was used as the collision gas and for the heated ESI source. The electrospray voltage was set at 3.0 kV, the ion transfer tube temperature was set at 320 °C, and the vaporizer temperature adjuster was turned off. The sheath gas, auxiliary gas, and ion sweep gas flow rates were 40, 12 and 0 arbitrary units (a.u.), respectively. Data acquisition was performed for 1.5 min in full-scan data-dependent MS/MS mode with positive and negative polarities. For the full scan, a mass resolution of 70,000 full width at half maximum (FWHM) at m/z 200, an automatic gain control (AGC) target of 3×10^6 a.u., a maximum injection time of 100 ms, and a scan range from m/z 70 to m/z 1,000 were used. The product ion scan was performed at a mass resolution of 17,500 FWHM (at m/z 200), with an AGC target of 5×10^5 a.u. and a maximum injection time of 100 ms, and with an isolation width of 0.5 m/z . The stepped normalized collision energy (NCE) applied was 50 % with a 50 % step. The data-dependent intensity threshold was fixed at an underfill ratio of 20 % from the full-scan AGC, resulting in an intensity threshold of 4×10^5 a.u. An exclusion list with the ions observed in the full-scan mass spectra of blanks was also used, and the dynamic exclusion parameter was fixed at 10 s. For instrument calibration, two standard mixtures were used: a mixture of *n*-butylamine, caffeine, MRFA (Met-Arg-Phe-Ala) peptide, and Ultramark 1621 for positive ionization mode, and a solution of sodium dodecyl sulfate, sodium

taurocholate, and Ultramark 1621 for negative ionization mode. External mass axis calibration was applied, and data acquisition and data processing were performed with Xcalibur version 2.2 SP2 and Exact Finder version 2.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). For screening purposes, a custom-made database built with more than 450 compounds including illegal drugs, legal highs, medicines, known adulterants, cutting agents, lacing chemicals, common excipients, and drug precursors was used. Moreover, the MetFrag software suite [18] was also used for the screening of unknowns.

Sample analysis

Eight samples of recreational drugs (indicated by “RD”) were kindly provided by Spanish NGOs, seven samples of legal highs (indicated by “LH”) were bought from Internet distributors, and one tea sample (indicated by “T”) was acquired from a local store in Barcelona (Spain). Table 1 lists the sample identifier, the product type, and the brand name or the alleged substance. Powdered samples were dissolved in 1:1 acetonitrile–methanol, whereas samples that were not totally soluble in the solvent mixture were extracted for 10 min with 1:1 acetonitrile–methanol in an ultrasonic bath (Bandelin Electronic, Berlin, Germany) and then centrifuged. An aliquot of either the sample solution or the supernatant of the extracted sample was then diluted with 1:1 methanol–0.1 % aqueous formic acid to obtain a concentration of 20 μ g g⁻¹, and 10 μ L was injected into the FIA–HRMS system for screening purposes.

Results and discussion

The analysis of psychoactive substances is a challenging task owing to the constant innovation in the synthesis of new substances that renders most targeted analytical methods rapidly obsolete. For this reason, there is a need for global screening methods adaptable to the constant innovation in this area. In this work, the capability of a powerful hybrid mass analyzer such as the quadrupole–Orbitrap analyzer, which offers the possibility of applying acquisition methods that combine HRMS, tandem MS/MS, and data-dependent analysis (ddMS/HRMS), was evaluated for the identification and confirmation of these compounds even without any chromatographic separation. To this end, working conditions such as the ionization source, solvent composition, and data-dependent acquisition parameters were optimized, and the use of different data searching strategies was evaluated for the analysis of different drug samples.

FIA–HRMS(ddMS/HRMS) conditions

A wide-range screening MS method requires a mostly universal ionization technique working under operational conditions

Table 1 Screening results

Sample ID	Type	Marketed name/alleged substance	Detected compounds	Observed ion ^a	Accurate mass (m/z)	Exact mass (m/z)	Mass accuracy (ppm)	Isotope cluster fit (%)	MS/HRMS fit score
RD1	Recreational drug	Cocaine	Cocaine	[M + H] ⁺ ([C ₁₇ H ₂₂ NO ₄] ⁺)	304.15357	304.15433	-2.5	97.2	1.000
			Phenacetin	[M + H] ⁺ ([C ₁₀ H ₁₄ NO ₂] ⁺)	180.10170	180.10191	-1.2	93.8	0.921
			Levamisole	[M + H] ⁺ ([C ₁₁ H ₁₃ N ₂ S] ⁺)	205.07901	205.07940	-1.9	98.3	0.958
			Cinamylcocaine	[M + H] ⁺ ([C ₁₉ H ₂₄ NO ₄] ⁺)	330.16927	330.16998	-2.2	97.6	
			Tropacocaine	[M + H] ⁺ ([C ₁₅ H ₁₉ NO ₂] ⁺)	246.14826	246.14886	-2.4	96.8	
RD2	Recreational drug	Cocaine	Metamizole	[M] ⁻ ([C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₄ S] ⁻)	310.08702	310.08670	1.0	96.7	0.953
			N-Methyl-4-aminoantipyrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O] ⁺)	218.12838	218.12879	-1.9	91.3	
			Metamizole	[M] ⁻ ([C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₄ S] ⁻)	310.08702	310.08670	1.0	98.8	0.976
			N-Methyl-4-aminoantipyrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O] ⁺)	218.12840	218.12879	-1.8	93.6	
			Metamizole	[M] ⁻ ([C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₄ S] ⁻)	310.08701	310.08670	1.0	95.9	0.893
RD3	Recreational drug	Cocaine	N-Methyl-4-aminoantipyrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O] ⁺)	218.12835	218.12879	-2.0	96.7	0.992
			Amphetamine	[M + H] ⁺ ([C ₉ H ₁₄ N] ⁺)	136.11194	136.11208	-1.0	93.8	0.949
			Caffeine	[M + H] ⁺ ([C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂] ⁺)	195.08743	195.08765	-1.1	94.2	
			Phentermine	[M + H] ⁺ ([C ₁₀ H ₁₆ N] ⁺)	150.12753	150.12773	-1.3	97.5	
			MDMA	[M + H] ⁺ ([C ₁₁ H ₁₆ NO ₂] ⁺)	194.11739	194.11756	-0.9	96.8	0.915
RD4	Recreational drug	Cocaine	Metamizole	[M] ⁻ ([C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₄ S] ⁻)	310.08709	310.08670	1.3	98.2	0.939
			N-Methyl-4-aminoantipyrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O] ⁺)	218.12839	218.12879	-1.8	97.4	
			Metamizole	[M] ⁻ ([C ₁₃ H ₁₆ N ₃ O ₄ S] ⁻)	310.08714	310.08670	1.4	97.6	0.935
			N-Methyl-4-aminoantipyrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O] ⁺)	218.12841	218.12879	-1.7	98.5	
			Benzocaine	[M + H] ⁺ ([C ₉ H ₁₂ NO ₂] ⁺)	166.08612	166.08626	-0.8	96.8	0.964
LH1	Legal high	Raz	Caffeine	[M + H] ⁺ ([C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂] ⁺)	195.08746	195.08765	-1.0	97.7	0.922
			L-Dopa	[M + H] ⁺ ([CHNO] ⁺)	198.07587	198.07608	-1.1	97.9	0.987
			Glucose	[M - H] ⁻ ([C ₆ H ₁₁ O ₆] ⁻)	179.05650	179.05611	2.2	96.2	
			Desoxy-MDA	[M + H] ⁺ ([C ₁₁ H ₁₆ NO] ⁺)	178.12233	178.12264	-1.7	97.6	
			Caffeine	[M + H] ⁺ ([C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂] ⁺)	195.08728	195.08765	-1.9	97.4	1.000
LH2	Legal high	Smileys	2-Aminoindan	[M + H] ⁺ ([C ₉ H ₁₂ N] ⁺)	134.09623	134.09643	-1.5	96.1	0.863
			Ephedrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₀ H ₁₆ NO] ⁺)	166.12233	166.12264	-1.9	98.2	0.987
			N-Methyl-ephedrine	[M + H] ⁺ ([C ₁₁ H ₁₈ NO] ⁺)	180.13799	180.13829	-1.7	96.5	0.992
			Choline	[M] ⁺ ([C ₄ H ₁₄ NO] ⁺)	104.10674	104.10699	-2.4	97.3	
			Glycine betaine	[M + H] ⁺ ([C ₅ H ₁₁ NO ₂] ⁺)	118.08602	118.08626	-2.0	98.1	
LH3	Legal high	Lust	Citric acid	[M - H] ⁻ ([C ₆ H ₇ O ₇] ⁻)	191.02010	191.01973	1.9	97.4	0.873
			Mannitol	[M - H] ⁻ ([C ₆ H ₁₃ O ₆] ⁻)	181.07217	181.07176	2.3	97.5	
			FMC	[M + H] ⁺ ([C ₁₀ H ₁₃ NOF] ⁺)	182.09739	182.09757	-1.0	98.2	0.969
			Benzocaine	[M + H] ⁺ ([C ₉ H ₁₂ NO ₂] ⁺)	166.08597	166.08626	-1.7	96.8	
			Jungle Dust						

Table 1 (continued)

Sample ID	Type	Marketed name/alleged substance	Detected compounds	Observed ion ^a	Accurate mass (<i>m/z</i>)	Exact mass (<i>m/z</i>)	Mass accuracy (ppm)	Isotope cluster fit (%)	MS/HRMS fit score
LH5	Legal high	Groove-E	Fluoro- <i>N,N</i> -dimethylcathinone	[M + H] ⁺ ([C ₁₁ H ₁₅ NOF] ⁺)	196.11299	196.11322	-1.2	97.5	0.934
LH6	Legal high	Bliss-Extra	Caffeine	[M + H] ⁺ ([C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂] ⁺)	195.08745	195.08765	-1.0	97.6	0.889
			2-Aminoindan	[M + H] ⁺ ([C ₉ H ₁₂ N] ⁺)	134.09622	134.09643	-1.6	98.2	
			Taurine	[M + H] ⁺ ([C ₂ H ₈ NO ₃ S] ⁺)	126.02183	126.02194	-0.9	97.6	
			Choline	[M] ⁺ ([C ₄ H ₁₄ NO] ⁺)	104.10679	104.10699	-1.9	95.2	
			Glycine betaine	[M + H] ⁺ ([C ₃ H ₁₂ NO ₂] ⁺)	118.08610	118.08626	-1.4	92.8	
LH7	Legal high	Mitseez	Butylone	[M + H] ⁺ ([C ₁₂ H ₁₆ NO ₃] ⁺)	222.11214	222.11247	-1.5	98.2	0.931
			Caffeine	[M + H] ⁺ ([C ₈ H ₁₁ N ₄ O ₂] ⁺)	195.08739	195.08765	-1.3	97.6	1.000
			Tetrahydrocannabinol	[M - H] ⁻ ([C ₂₁ H ₃₉ O ₂] ⁻)	313.21764	313.21730	1.1	96.8	
TI	Tea	Marijuana tea	Tetrahydrocannabinolic acid	[M - H] ⁻ ([C ₂₂ H ₃₉ O ₄] ⁻)	357.20757	357.20713	1.2	97.4	

desoxy-MDA desoxymethylethoxyamphetamine, *FMC* fluoromethcathinone, *HRMS* high-resolution mass spectrometry, *MDMA* 3,4-methylenedioxyamphetamine, *MS* mass spectrometry

^a The composition is given in parentheses

suitable for a wide range of compounds. Most of the psychoactive substances are acid–base and polar compounds, so they may be easily ionized by electrospray (ESI) in positive and/or negative ion mode. For this reason, ESI was selected as the ionization source for the coupling of the FIA system to the mass spectrometer. Other aspects that have to be considered are the carrier solvent and the sample solvent, which must also be compatible with as many analytes as possible, ensuring their solubilization and facilitating their ionization. To this end, a solvent composed of a 1:1 mixture of methanol and 0.1 % aqueous formic acid was used as the carrier solvent, since most substances can be dissolved in this solvent, avoiding salt precipitation and not compromising the ionization efficiency in the ESI source. The presence of formic acid in the carrier solvent is recommended to improve the ionization of basic compounds when working in positive ion mode although it can suppress the ionization of acidic compounds when operating in negative ion mode. In this work, since most of the psychoactive drugs of general interest are basic compounds, 0.1 % formic acid was added to the carrier solvent. Moreover, the concentration of the analytes in the drug samples is usually high enough to be detectable in negative ion mode even under ion suppression conditions. To obtain FIA peaks wide enough to perform enough data-dependent experiments and to provide a minimum number of data points to reconstruct the FIA peak, the carrier solvent flow rate was adjusted to 150 $\mu\text{L min}^{-1}$.

The ESI source was operated under standard working conditions in order to be suitable for as many compounds as possible (see “Experimental”). The vaporizer temperature adjuster was turned off to minimize thermal degradation and in-source collision-induced dissociation (CID) fragmentation of the most labile compounds. The optimization of additional parameters for the coupling of the FIA system to the MS system and the HRMS and ddMS/HRMS working conditions was conducted by injecting a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ standard mixture that contained 20 compounds, including illegal drugs (cocaine, amphetamine, methamphetamine, MDMA), cathinones (butylone, 4-fluoromethcathinone), pharmaceuticals (benzocaine, phenacetin, lidocaine), veterinary drugs (ketamine, levamisole), and some psychoactive substances commonly used as adulterants in recreational drugs [ephedrine, *N*-methylephedrine, 2-aminoindan, caffeine]. Additionally, to achieve a nondirected screening method, for data acquisition the hybrid quadrupole–Orbitrap analyzer was operated using two scan events; a high-resolution full scan (70,000 FWHM, *m/z* 200) for identification and quantitation purposes, and a data-dependent product ion scan (ddMS/HRMS) for confirmation and structural elucidation. In this second scan event, ions were isolated at low resolution in the quadrupole, fragmented in the high-energy collisional dissociation cell, and scanned in the Orbitrap at high resolution. Nevertheless, to prevent data-dependent experiments on background noise

ions and guarantee the detection of analytes with low intensity, several strategies were performed simultaneously. First, the data-dependent threshold value was optimized (between 10^5 and 10^6 a.u.) using the standard mixture mentioned above, and 4×10^5 a.u. was selected since it resulted in data-dependent experiments for all the compounds but not for background noise ions. Second, an exclusion list with those ions detected in the carrier flow was used to automatically omit high-intensity background ions in the data-dependent analysis. Finally, to prevent repeated ddMS/HRMS experiments of already detected precursor ions, an exclusion time of 10 s was set, thus launching the data-dependent experiment on the less intense ions.

Another important aspect to be taken into account in a FIA–MS analysis is the complexity of the mass spectra and the possible interferences due to the absence of a chromatographic separation. The increase of mass resolution from 17,500 (minimum value) to 140,000 FWHM (maximum value) reduces the probability of isobaric interferences and improves the quality of isotope patterns. Nevertheless, increasing the working mass resolution in the Orbitrap leads to a longer scan duty cycle. In this work, to guarantee sufficient selectivity, the mass resolution of the survey scan (HRMS full scan) was set at 70,000 FWHM (at m/z 200). However, in the data-dependent event the Orbitrap was operated at a mass resolution of 17,500 FWHM (m/z 200) in order to achieve a faster duty cycle, without compromising selectivity as the system operated in MS/MS mode with precursor ion selection. Another parameter to consider is the collision energy, since the optimum value depends on the chemical structure of the precursor ion, and not all the useful product ions can be generated simultaneously at the same collision energy. To obtain for a given compound independent product ion scans with useful ions in the whole m/z range, a stepped NCE of 50 %, with 50 % steps, was used in this work. This strategy allows an averaged spectrum to be obtained from the product ion scan spectra acquired at three NCEs (25, 50, and 75 %). Since this spectrum included ions generated at both low and high collision energies, it guaranteed more structural information, especially for those compounds for which standards were not available (suspect and unknown analysis) and for which the optimal collision energy was not known.

As an example of the FIA–HRMS(ddMS/HRMS) method developed, Fig. 1 shows the full-scan HRMS spectrum in positive ion mode (bottom left) corresponding to the FIA peak (top left) of a standard mixture where the $[M + H]^+$ ions of each compound are identified with a mass accuracy better than 5 ppm. Additionally, in Fig. 1 (bottom right) the ddMS/HRMS spectrum obtained for the precursor ion at m/z 238.1 corresponding to ketamine is shown. As can be seen, the averaged product ion scan obtained after the application of the stepped NCE shows product ions in the whole m/z range which are in agreement with those ions previously reported by other

authors using UHPLC–MS/MS with a QTOF instrument [19]. Although the ESI source operated under mild conditions, in-source CID fragmentation can occur. The full-scan HRMS spectrum must be carefully studied to prevent false identifications, and the possible fragment ions must be identified, since they might be considered as independent compounds. For this reason, in this work those ddMS/HRMS product ions also present in the full-scan HRMS spectrum were suspected to be in-source CID fragment ions. To confirm their in-source CID fragmentation nature, a more detailed study of the MS/HRMS spectra of those suspected ions was performed. For instance, ions at m/z 91.05396 and m/z 119.08522 observed in the full-scan HRMS spectrum (Fig. 1) were also present in the ddMS/HRMS spectra of amphetamine and methamphetamine, so they were discarded from the identification list and were identified as in-source CID fragments (tropylium and phenylpropanylium ions, respectively).

Sample screening

A custom-made database was built with more than 450 compounds, including illegal drugs, legal highs, common adulterants, cutting agents, some human and veterinary medicines, and common excipients. For each substance the compound name, CAS number, elemental composition, and the chemical structure were included in each compound record. Moreover, taking into account the functional groups in the chemical structure of each compound, we also added the expected ionization mode. Finally, if standards were available, MS/MS experiments were performed and the ddMS/HRMS spectra were added to the mass spectral library. If they were not available, expected product ions obtained from the literature were included in the database.

Drug samples were processed as indicated in “Experimental” and were injected into the FIA–HRMS(ddMS/HRMS) system. No sample treatment was performed, and samples were just dissolved in 1:1 acetonitrile–methanol, filtered to remove nonsoluble excipients, and analyzed directly. Raw data files were processed using Exact Finder and were interrogated by the custom-made database to automatically identify the elemental compositions and possible structures. For each sample, a list with the detected compounds classified into three categories was created: the first category included the identified target compounds, the second group contained compounds included in the database for which identification was based on literature information (suspect compounds), and the third one included the rest of the ions detected above a fixed threshold for which no compounds could be assigned (unknowns). The criteria applied for positive identification of an elemental composition were a mass accuracy better than 5 ppm and an isotope cluster fit better than 85 % (both mass relative deviation and relative intensity differences, for each isotope peak within the cluster ion, were taken into account). Finally, the chemical structures

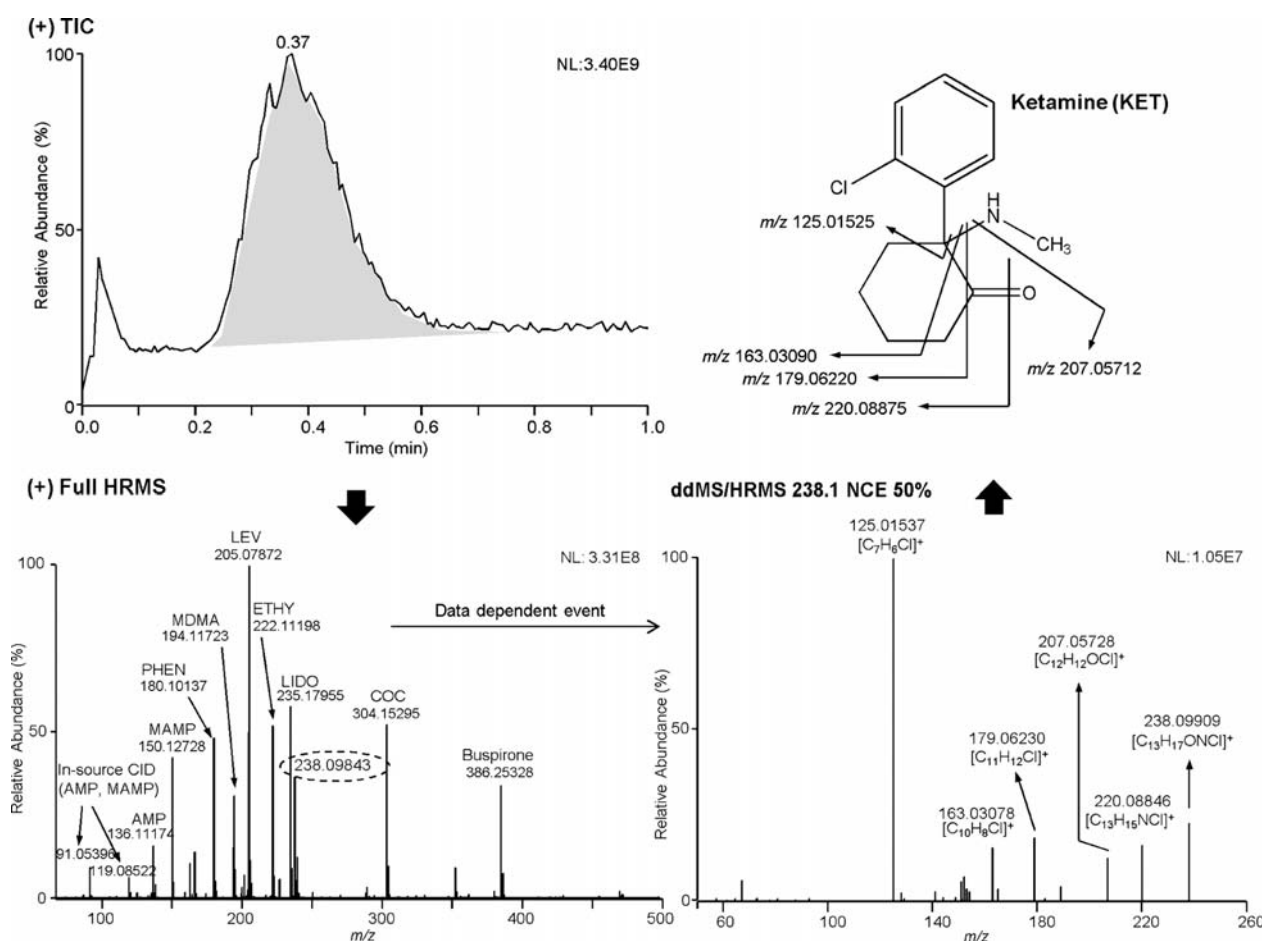


Fig. 1 Flow injection analysis–high resolution mass spectrometry (HRMS)/data-dependent mass spectrometry (ddMS)/HRMS of a 200 ng mL⁻¹ standard mixture of compounds and mass spectrometry/HRMS of the ion at *m/z* 238.1, corresponding to the anesthetic ketamine. All ions provided mass accuracies better than 5 ppm. AMP amphetamine,

CID collision-induced dissociation, COC cocaine, ETHY ethylone, LEV levamisole, LIDO lidocaine, MAMP methamphetamine, MDMA 3,4-methylenedioxyamphetamine, NCE normalized collision energy, PHEN phenacetin, TIC total ion current

assigned to the target compounds were confirmed by comparison of the ddMS/HRMS spectra with those in the mass spectral library, which had to provide a score higher than 0.850. For the suspect compounds, the expected product ions according to the bibliographic information were sought in the ddMS/HRMS product ion scan. The identification of unknowns required a more detailed data search. First, elemental compositions were assigned to the different unknowns taking into account both the accurate mass and the isotope pattern fit. Then, the formulae were used for the online search in databases for drugs and related compounds and for the *in silico* fragmentation by the mass fragmenter software program MetFrag, which sorted the candidates according to the match between the predicted product ions and the experimental ddMS/HRMS product ions. Once the unknown had been identified, LC–MS/MS and HRMS bibliographic information on the suspected compound was compared with the experimental data to provide further evidence for the identification, and if the standard was available, it was bought

and analyzed by FIA–HRMS(ddMS/HRMS) to definitely confirm its identity. Table 1 lists the compounds identified in the analyzed samples along with the identification criteria (mass accuracy, isotope cluster fit, and MS/HRMS match score), and those that could be confirmed are highlighted. The results obtained are discussed in the following section, and some examples illustrating the different screening approaches are given.

Selected examples

Target screening Figure 2 shows the full-scan mass spectrum in positive ion mode obtained for the RD1 sample, allegedly cocaine. The predominant ions in the spectrum, *m/z* 180.10170, 205.07901, and 304.15357, were assigned to the chemical compositions [C₁₀H₁₄NO₂]⁺ (mass accuracy -1.2 ppm, isotope cluster fit 93.8 %), [C₁₁H₁₃N₂S]⁺ (mass accuracy -1.9 ppm, isotope cluster fit 98.3 %), and [C₁₇H₂₂NO₄]⁺ (mass accuracy -2.5 ppm, isotope cluster fit 97.2 %), respectively. After

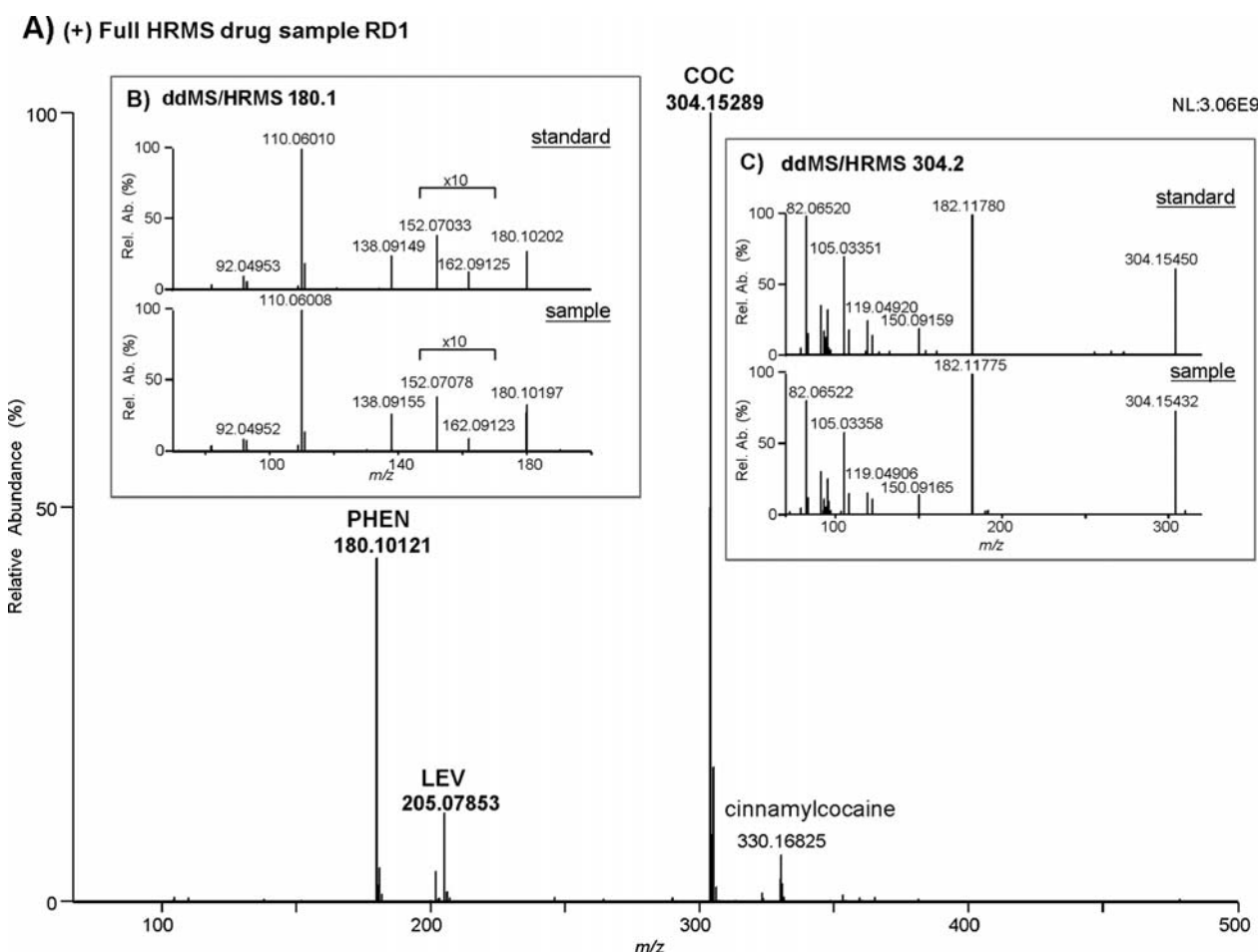


Fig. 2 Positive ion full-scan HRMS spectrum of a cocaine sample adulterated with phenacetin and levamisole (A), and ddMS/HRMS spectra of the sample and standards of phenacetin (B) and cocaine (C). COC cocaine, LEV levamisole, PHEN phenacetin

the screening software had been run with the custom-made database, four candidates for the ion at m/z 180.10170 were found: the legal highs 2,3-methylenedioxyamphetamine, 3,4-methylenedioxyamphetamine, and 3,4-methylenedioxy-*N*-methylphenethylamine, and the analgesic and antipyretic drug phenacetin. Among them, only phenacetin can yield the product ions corresponding to the loss of water (m/z 162.09123) or ethylene (m/z 152.07077) from the protonated molecule. The comparison of the ddMS/HRMS spectrum of the sample and that of a phenacetin standard (Fig. 2, panel B) showed a good match (score 0.958), thus confirming the presence in the sample of this compound, which has been commonly listed as a cutting agent for cocaine. The ion at m/z 205.07901 was identified as the antihelminthic drug levamisole by the custom-made database, and it was confirmed by comparison of the ddMS/HRMS product ion scan spectrum with that in the mass spectral library (not shown), resulting in a score of 0.921 for the match. Lastly, the ion at m/z 304.15357 could correspond to cocaine or scopolamine, but only cocaine provided a good match for the product ion scan spectra (score 1.000). Additionally, considering the structure of

scopolamine, the loss of benzoic acid from the precursor ion (m/z 182.11777, Fig. 2, panel C) is not possible. In conclusion, the allegedly cocaine sample contained cocaine, but it was adulterated with phenacetin and levamisole.

Another example is given in Fig. 3, where the full-scan HRMS spectrum in positive ion mode obtained for the legal high sample LH7 is shown (Fig. 3a). The chemical composition $[C_{12}H_{16}NO_3]^+$ was assigned to the base peak of the spectrum (m/z 222.11214; mass accuracy -1.5 ppm; isotope cluster fit 98.2 %), and the database search provided three possible candidates for that composition, all of them belonging to the cathinone family: butylone, ethylone, and *x*-methylmethylone (where *x* can be 2, 5, or 6). The ddMS/HRMS spectrum fit scores for butylone and ethylone were above the established cutoff value (0.850) for confirmation, being 0.931 and 0.872, respectively. However, the ddMS/HRMS spectrum of the sample (Fig. 3b) showed two less abundant (less than 35 % relative abundance) product ions at m/z 191.07027 and m/z 72.08083 that were possible only for butylone, as can be seen in Fig. 3c. These product ions, which allowed the correct

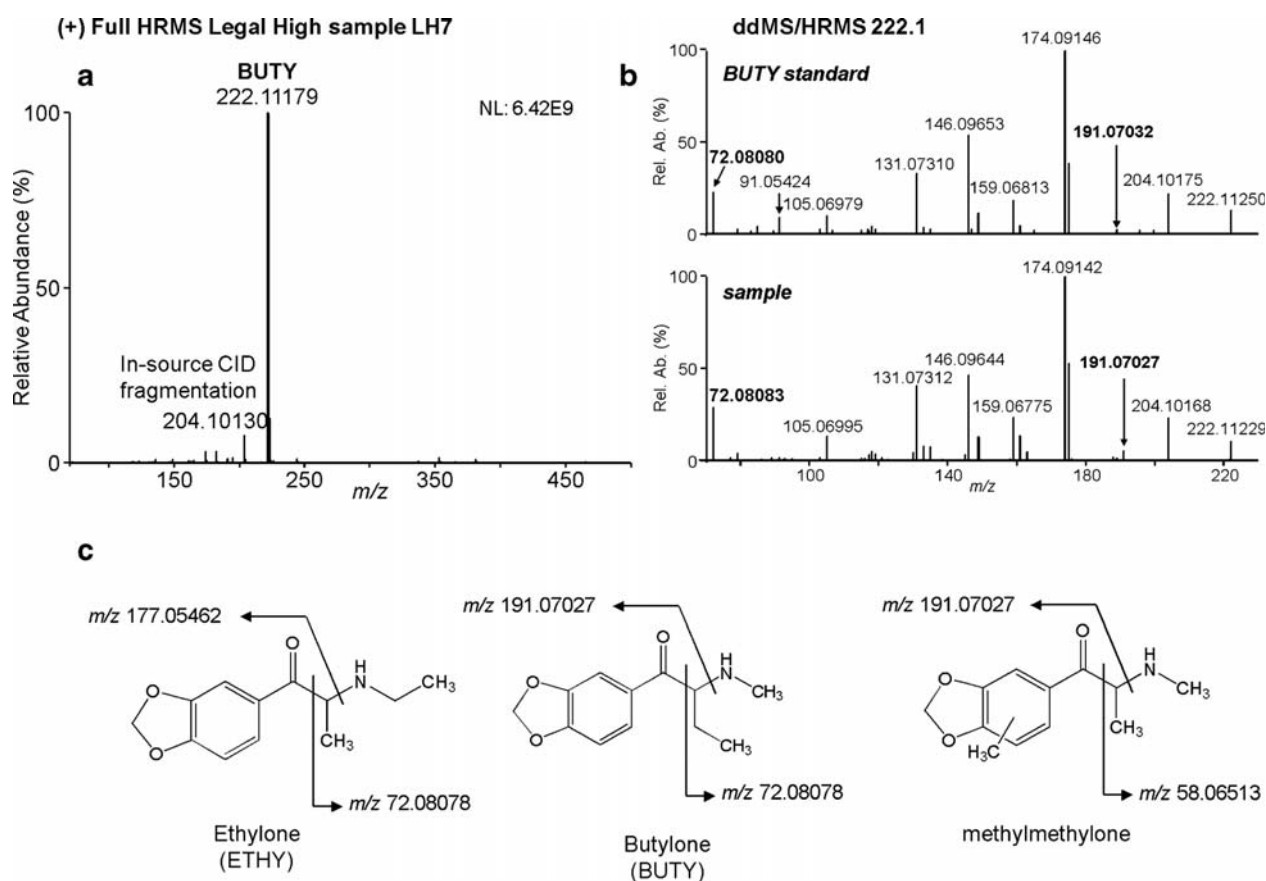


Fig. 3 **a** Full-scan HRMS spectrum of a legal high sample, positive for butylone, **b** ddMS/HRMS spectra of the sample and a butylone standard, and **c** structures and fragmentation of the three candidates

identification of the compound, were obtained at low (m/z 191) and high (m/z 72) collision energies, showing the importance of acquiring ddMS/HRMS data at different collision energies (stepped NCE).

Suspect screening As an example of the suspect screening approach, Fig. 4 shows the full-scan ESI (positive) HRMS spectrum of an alleged sample of amphetamine (RD5), and the ddMS/HRMS spectrum of the detected ion at m/z 150.12753. The presence of amphetamine and caffeine was confirmed following the targeted approach explained in the previous section, with precursor ion mass accuracies better than 4 ppm and ddMS/HRMS fit scores above 0.850 (Table 1). Additionally, ions at m/z 119.08544 and m/z 91.05432, were assigned to phenylpropanylium and tropylium ions, respectively, originating from in-source CID fragmentation of amphetamine. For the ion at m/z 150.12753, the estimated elemental composition was $[C_{10}H_{16}N]^+$ (mass accuracy -1.3 ppm, isotope cluster fit 97.5 %). According to our custom-made database, this ion matched the protonated molecules of methamphetamine and phentermine. However, the product ion scan spectrum obtained indicated the loss of NH_3

(m/z 133.10115), which was possible only if we considered the phentermine structure (Fig. 4). This ddMS/HRMS spectrum is in agreement with the product ion scan of phentermine obtained with a QTOF instrument by other authors [20], leading to a high-certainty identification of the presence of phentermine in this amphetamine sample. Moreover, in the ddMS/HRMS spectrum, the absence of the phenylpropanylium ion (m/z 119), a highly probable product ion for methamphetamine, makes it possible to discard this compound as a candidate.

The FIA–HRMS(ddMS/HRMS) method developed was also used for the analysis of a cannabis tea sample (T1). As expected, a more complex full-scan spectrum was obtained owing to the high number of extracted compounds, but even so tetrahydrocannabinol (m/z 313.21764) and its main metabolic precursor tetrahydrocannabinolic acid (m/z 357.20757) were identified in the full-scan negative ion HRMS spectrum of the sample (mass accuracy less than 1 ppm, isotope cluster fit more than 95 %) (Table 1). The corresponding ddMS/HRMS product ion scans were in good agreement with those published in the literature [21, 22]. So, even though no sample treatment and no chromatographic separation were used, the

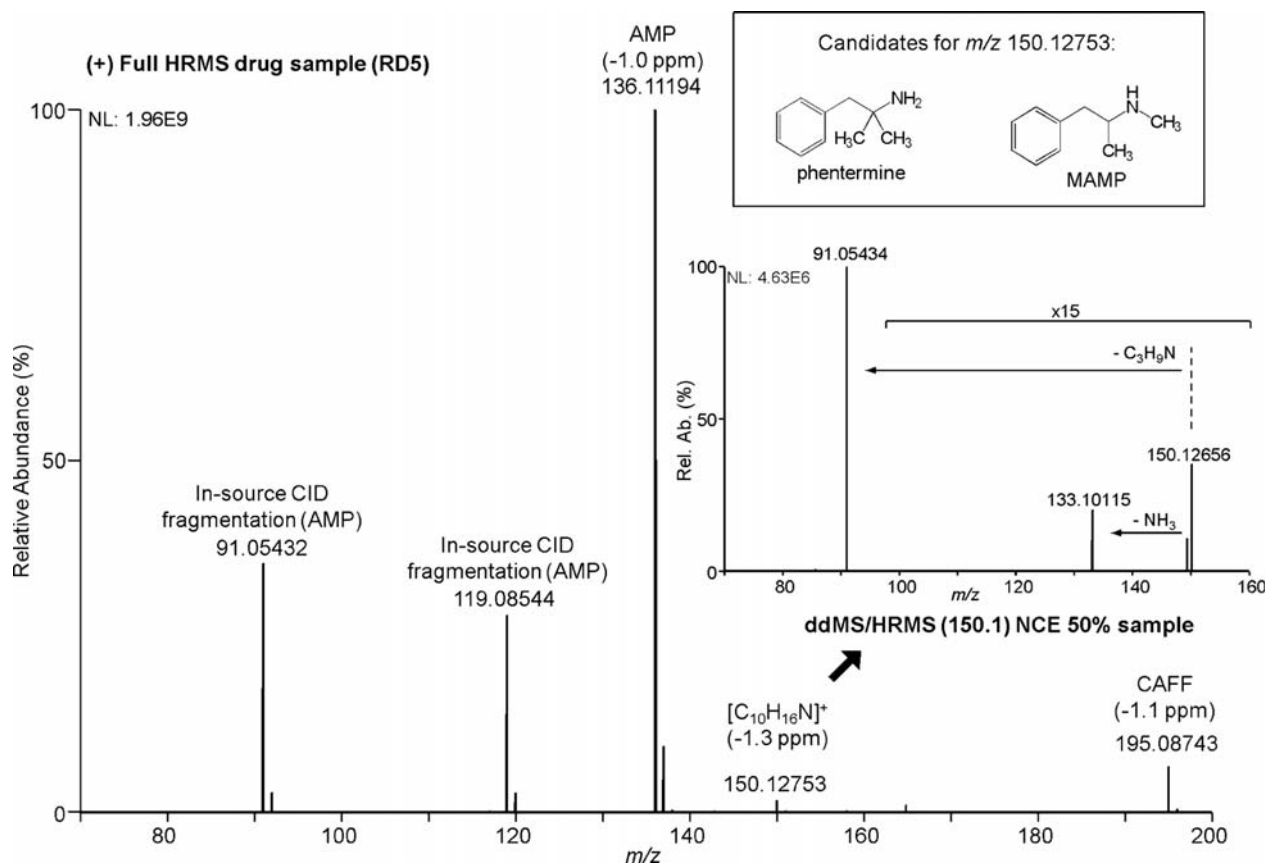


Fig. 4 Full-scan HRMS spectrum of a supposed sample of amphetamine, adulterated with caffeine and phentermine and structures of the candidates for ion at m/z 150.12753. AMP amphetamine, CAFF

caffeine, CID collision-induced dissociation, MAMP methamphetamine, NCE normalized collision energy

method developed demonstrated its applicability to complex samples.

In some cases it was not possible to unequivocally confirm the presence of a specific compound, because some positional isomers, especially those arising from benzene ring substituents, may show indistinguishable product ion scan spectra. For instance, this happened in the identification of the main component of the legal high sample LH4 (data not shown). In the full-scan positive ion HRMS spectrum, in addition to caffeine and benzocaine, an ion at m/z 182.09735 was also observed. This ion might be assigned to any of the three fluoromethcathinone isomers (2-fluoromethcathinone, 3-fluoromethcathinone, or 4-fluoromethcathinone; mass accuracy -1.0 ppm, isotope cluster fit 98.2 %), since all of them provide roughly the same product ion scan spectrum. Individual identification of these isomers was not possible even with the use of UHPLC-MS and a standard C_{18} column, and more selective columns are needed [23].

Unknown screening Figure 5 shows the mass spectra obtained for the analysis of an alleged sample of cocaine (RD2) in both positive mode and negative mode. As can be seen, in the

full-scan HRMS spectrum (positive ion mode), $[M + H]^+$ of cocaine (m/z 304.15433) is not present, and the base peak is the ion at m/z 218.12838. The full-scan spectrum in negative ion mode showed an ion at m/z 310.08702 as the base peak, and the isotope cluster indicated the presence of a sulfur atom, so the elemental composition $[C_{13}H_{16}O_4N_3S]$ was assigned to this ion (mass accuracy 1.0 ppm, isotope cluster fit 96.7 %). Nevertheless, none of the compounds in the custom-made database matched this formula. The elemental composition proposed from the negative ion mode and the spectrum list of the corresponding ddMS/HRMS spectrum were submitted to the MetFrag suite [18] for the online search for potential candidates. A list of candidate structures for the elemental composition with an error below 3 ppm was obtained after an automated search in the ChemSpider database (Royal Society of Chemistry). The returned potential candidates, in this case 888, were in silico fragmented by the MetFrag suite following general fragmentation rules and sorted by the matching of the predicted product ions with those in the ddMS/HRMS spectrum obtained for the unknown ion in the sample. Surprisingly, only two final candidates provided a matching score above 70 %: the analgesic metamizole (score

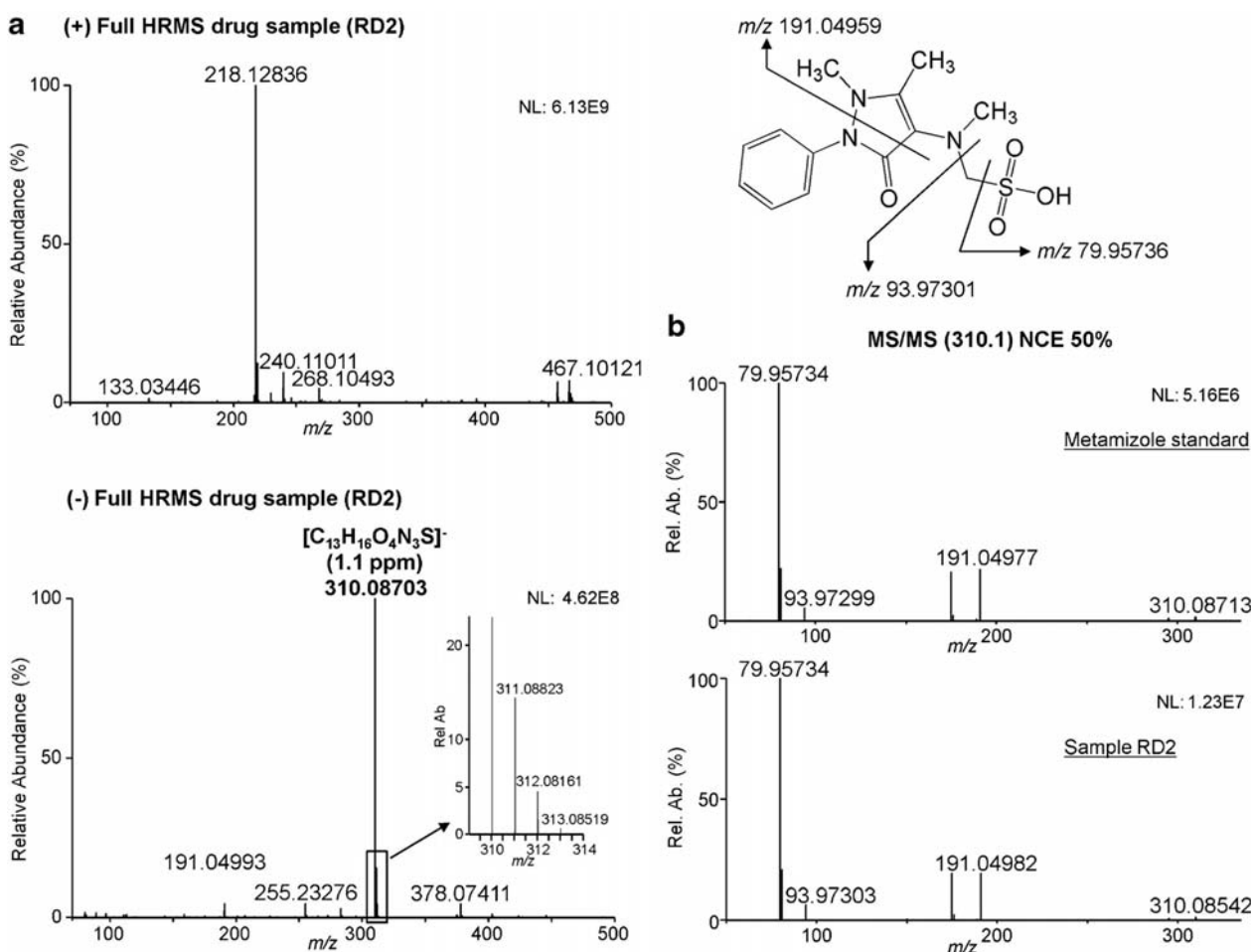


Fig. 5 a Positive ion and negative ion full-scan HRMS spectra of a fraudulent sample of cocaine containing metamizole, and b ddMS/HRMS spectrum of the ion at m/z 310.08703 in the sample and that of

a medicine containing metamizole. MS/MS tandem mass spectrometry, NCE normalized collision energy

100 %) and [[(1,5-dimethyl-3-oxo-2-phenyl-2,3-dihydro-1H-pyrazol-4-yl)methyl]amino]methanesulfonic acid (score 100 %), which is a close isomer of metamizole. Taking into account the availability of the analgesic in comparison with the related isomer, we supposed that the unknown compound would be metamizole. To confirm this identification, a medicine containing metamizole (Nolotil®) was analyzed using the FIA–HRMS(ddMS/HRMS) method. The mass spectra obtained for this medicine matched perfectly those obtained for the sample RD2 in both positive ion mode and negative ion mode, as well as the corresponding ddMS/HRMS spectrum (see Fig. 5, MS/HRMS score 0.953). For the ion at m/z 218.12838 observed in the full-scan mass spectrum in positive ion mode, the molecular formula matched that of *N*-methyl-4-aminoantipyrine, which is the hydrolysis product of metamizole. These results confirmed the presence of metamizole and indicated that this sample of cocaine was a fraud.

However, in many cases the fragmenter software provided too many candidates, all of them with a high score fit. For

instance, the full-scan HRMS spectrum (positive ion mode) of the legal high sample LH1 showed as the base peak the ion at m/z 198.07587, which could be assigned to the elemental composition $[C_9H_{12}O_4N]^+$ (mass accuracy 1.1 ppm, isotope cluster fit 97.9 %). Nevertheless, when a data search with the ChemSpider database and in silico fragmentation with MetFrag was performed, the number of candidates that matched a MetFrag score above 80 % was very high (more than 30 chemical structures). To be more selective and to reduce the number of candidates, the elemental composition was searched in the compound list of a more specific designer drug database (Designer Drugs, DigiLab Software, Altenholz, Germany), and then, only two possible candidates were obtained: syringaldehyde oxime and levodopa (L-dopa). Only L-dopa has the chemical structure with adequate functional groups to provide the product ions observed in the ddMS/HRMS spectrum of the sample, such as those generated from the losses of ammonia, water, and formic acid, as well as the ions at m/z 93, 107, and 111, which typically originate from

phenolic compounds. Additionally, when the *in silico* fragmentation with MetFrag (ChemSpider database) was applied, when L-dopa achieved a high score (98.6 %). Finally, the ddMS/HRMS spectrum obtained for the purchased L-dopa standard perfectly matched (score fit 0.987) that observed for the sample, thus confirming the presence in this legal high sample of L-dopa, a drug commonly used for the treatment of Alzheimer's disease.

As a final example, another legal high sample (LH2) showed as the base peak the ion at m/z 178.12233 in the full-scan HRMS spectrum (positive ion mode), and the elemental composition assigned to this ion was $[C_{11}H_{16}ON]^+$ (mass accuracy -1.7 ppm, isotope score fit 97.6 %). The results from the custom-made database indicated that many isomers of the cathinone family, such as mephedrone, 3-methylmethcathinone, ethcathinone, dimethylcathinone, and buphedrone, presented the same elemental composition, but for none of them was there a match with the ddMS/HRMS spectrum. Moreover, all the cathinone compounds were discarded since the characteristic loss of water from the protonated molecule, a common fragmentation for this family of compounds [2, 24], was not found in this spectrum. In addition, the ddMS/HRMS spectrum of the protonated molecule showed the losses of ammonia and C_2H_7N as the most abundant peaks in the mass spectrum. Among the substances included in the custom-made database, only methylphenethylamines showed these losses as main peaks in the MS/HRMS spectrum, thus indicating that the unknown ion could be a methylphenethylamine-related compound. The online search of the chemical structure and the *in silico* fragmentation using MetFrag (ChemSpider database) provided a list with 1,294 candidates, but only 206 of those had a score above 80 %. Among them, only two compounds had a methylphenethylamine-like structure, and both were isomers of desoxymethylenedioxyamphetamine: 6-(2-aminopropyl)-2,3-dihydrobenzofuran, and 5-(2-aminopropyl)-2,3-dihydrobenzofuran. For these research chemicals the fragmenter software provided high scores (97.5 %) and explained the most important product ions observed in the ddMS/HRMS spectrum of the sample. However, there was no standard commercially available to unequivocally confirm the presence of one of these isomers in the sample, and for that reason, only a tentative identification of the compound was achieved.

Screening results

The FIA–HRMS(ddMS/HRMS) method developed was applied to the analysis of 16 samples, including recreational drugs, legal highs, and herbal blends, to demonstrate its applicability (Table 1). As can be seen, caffeine was the substance most frequently found in the analyzed samples, probably because of its low price and high availability. Moreover, most of

the recreational drug samples were adulterated with pharmaceuticals such as levamisole, phenacetin, or phentermine. Adulteration may represent a higher risk for human health than the sole consumption of the psychoactive substance. The combined consumption of psychedelic substances such as amphetamine, caffeine, and phentermine (sample RD5) is discouraged by pharmaceutical companies since it could represent an increased danger to the consumer's health because of the synergic effect of the substances. Additionally, phenacetin (sample RD1) was withdrawn from the market in 1983 in the USA [25] and the EU because of its carcinogenic properties (group 2A classification, International Agency for Research on Cancer), and the adulteration of cocaine with levamisole (sample RD1) has been associated with the development of agranulocytosis in cocaine users [26, 27].

Many of the analyzed recreational drug samples may be considered as frauds, as the actual composition did not correspond to the labeled or marketed composition. For instance, samples RD2, RD3, RD4, RD7, and RD8, which were supposed to be cocaine, contained only metamizole. Also, most of the legal highs were supposed to be herbal blends, but the appearance of the sample (white powder) and the cleanness of the mass spectra suggested that they could be a mixture of mostly pure substances. In only two legal high samples did the presence of natural products such as choline and glycine betaine (samples LH3 and LH6) provide evidence for the herbal origin of the sample.

To obtain a general idea of the concentration of the compounds identified in the analyzed samples, a fast quantitation method using standard addition was applied when the standard of the identified substance was commercially available. The standard addition was performed in triplicate with four addition levels, and the FIA peak height was plotted versus added concentration. The results obtained ($n=3$, 95 % confidence level) are given in Table 2. As can be seen, most recreational drug samples exhibited low purity, with concentrations for the main active component between 18 and 66 % (w/w). Also, the concentration of adulterants such as caffeine, benzoic acid, and phenacetin was significant (5–17 % w/w). For legal highs, the concentrations found for cathinone derivatives in samples LH4 and LH7 are similar to those obtained by other authors in street samples using gas chromatography with flame ionization detection [7]. In the LH3 sample, the low concentration determined for ephedrine is consistent with its natural occurrence in plant extracts [28], thus confirming that this sample was indeed a plant supplement, as stated on the packaging.

Conclusions

The FIA–HRMS(ddMS/HRMS) method developed is a powerful tool that makes possible the screening of a wide

Table 2 Quantitation results

Sample ID	Compound	Concentration (% w/w±confidence interval)
RD1	Cocaine	41±4
	Phenacetin	17±1
	Levamisole	3.4±0.2
RD5	Amphetamine	45.2±0.4
	Caffeine	5.4±0.6
RD6	MDMA	33±1
LH1	Caffeine	66±8
	Benzocaine	4.9±0.2
LH2	Caffeine	5.3±0.6
LH3	2-Aminoindan	0.19±0.01
	Ephedrine	0.8±0.1
LH4	Caffeine	16.1±0.4
	FMC	52±2
	Benzocaine	10.8±0.6
LH5	2-Aminoindan	41±10

n=3, 95 % confidence level

range of compounds with minimal sample manipulation and in a short analysis time, providing both reliable identification and quantitative results in the field of analysis of recreational drugs and legal highs. The use of mild conditions in the ionization source to reduce in-source fragmentation, an acidic solvent to facilitate the ionization of basic compounds, and acquisition in both positive ion mode and negative ion mode allowed the detection of a large number of substances. Data acquired in high resolution, and processed and interrogated with the custom-made database provided the identification of target and suspect compounds on the basis of accurate mass measurements and isotope cluster fits from the full-scan HRMS spectra and scores from the ddMS/HRMS spectra. For identification of unknowns, the pros and cons of the use of additional online accurate mass databases combined with fragmenter software were discussed. The use of a stepped NCE is recommended to obtain sufficient structural information both for confirmation of target and suspect compounds, and to narrow down the chemical structure candidate list for unknowns. The illustrative examples support the strong potential of the method developed for the identification of target compounds, suspect compounds, and unknowns, and is proposed for the first time for the wide-range screening of psychoactive substances in recreational drugs and legal highs. The compounds found in the analyzed samples showed that adulteration of recreational drugs and legal highs with unrelated substances and frauds is quite common, and therefore, the use of wide-range screening methods is highly recommended.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the financial support received from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under project CTQ2012-30836 and from the Agency for Administration of University and Research Grants (Generalitat de Catalunya, Spain) under project 2014 SGR-539. The Spanish NGO Cruz Roja is thanked for kindly providing the recreational drug samples.

References

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2014) European drug report 2014. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon
- Fornal E (2013) Identification of substituted cathinones: 3,4-methylenedioxy derivatives by high performance liquid chromatography–quadrupole time of flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 81–82:13–19
- Ibanez M, Bijlsma L, van Nuijs AL, Sancho JV, Haro G, Covaci A, Hernandez F (2013) Quadrupole-time-of-flight mass spectrometry screening for synthetic cannabinoids in herbal blends. *J Mass Spectrom* 48(6):685–694
- European Commission. Council Decision of 2 December 2010 on submitting 4-mehtylmethcathione (mephedrone) to control measures. *Off J Eur Union L* 322:44–45
- Choi H, Heo S, Choe S, Yang W, Park Y, Kim E, Chung H, Lee J (2013) Simultaneous analysis of synthetic cannabinoids in the materials seized during drug trafficking using GC-MS. *Anal Bioanal Chem* 405(12):3937–3944
- Concheiro M, Anizan S, Ellefsen K, Huestis MA (2013) Simultaneous quantification of 28 synthetic cathinones and metabolites in urine by liquid chromatography–high resolution mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 405(29):9437–9448
- Leffler AM, Smith PB, de Armas A, Dorman FL (2014) The analytical investigation of synthetic street drugs containing cathinone analogs. *Forensic Sci Int* 234:50–56
- Zancajo VM, Brito J, Carrasco MP, Bronze MR, Moreira R, Lopes A (2014) Analytical profiles of “legal highs” containing cathinones available in the area of Lisbon, Portugal. *Forensic Sci Int* 244C:102–110
- Smith JP, Metters JP, Irving C, Sutcliffe OB, Banks CE (2014) Forensic electrochemistry: the electroanalytical sensing of synthetic cathinone-derivatives and their accompanying adulterants in “legal high” products. *Analyst* 139(2):389–400
- Strano-Rossi S, Odoardi S, Fisichella M, Anzillotti L, Gottardo R, Tagliaro F (2014) Screening for new psychoactive substances in hair by ultrahigh performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1372:145–156
- Grabauer M, Krol WL, Wiley JL, Thomas BF (2012) Analysis of synthetic cannabinoids using high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering: implications for nontargeted screening of designer drugs. *Anal Chem* 84(13):5574–5581
- Ibáñez M, Sancho JV, Bijlsma L, van Nuijs ALN, Covaci A, Hernández F (2014) Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances. *Trends Anal Chem* 57:107–117
- Thomas BF, Pollard GT, Grabauer M (2013) Analytical surveillance of emerging drugs of abuse and drug formulations. *Life Sci* 92(8–9):512–519
- LaPointe J, Musselman B, O’Neill T, Shepard JR (2015) Detection of “bath salt” synthetic cathinones and metabolites in urine via DART-MS and solid phase microextraction. *J Am Soc Mass Spectrom* 26(1):159–165

15. Morelato M, Beavis A, Kirkbride P, Roux C (2013) Forensic applications of desorption electrospray ionisation mass spectrometry (DESI-MS). *Forensic Sci Int* 226(1–3):10–21
16. Joshi M, Cetroni B, Camacho A, Krueger C, Midey AJ (2014) Analysis of synthetic cathinones and associated psychoactive substances by ion mobility spectrometry. *Forensic Sci Int* 244C:196–206
17. Lua IA, Lin SL, Lin HR, Lua AC (2012) Replacing immunoassays for mephedrone, ketamines and six amphetamine-type stimulants with flow injection analysis tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 36(8):575–581
18. Wolf S, Schmidt S, Muller-Hannemann M, Neumann S (2010) In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinforma* 11:148
19. Bijlsma L, Sancho JV, Hernandez F, Niessen WM (2011) Fragmentation pathways of drugs of abuse and their metabolites based on QTOF MS/MS and MS^E accurate-mass spectra. *J Mass Spectrom* 46(9):865–875
20. Paul M, Ippisch J, Herrmann C, Guber S, Schultis W (2014) Analysis of new designer drugs and common drugs of abuse in urine by a combined targeted and untargeted LC-HR-QTOFMS approach. *Anal Bioanal Chem* 406(18):4425–4441
21. Concheiro M, Lee D, Lendoiro E, Huestis MA (2013) Simultaneous quantification of Delta(9)-tetrahydrocannabinol, 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabitol in oral fluid by microflow-liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1297:123–130
22. Jung J, Kempf J, Mahler H, Weinmann W (2007) Detection of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A in human urine and blood serum by LC-MS/MS. *J Mass Spectrom* 42(3):354–360
23. Aurand C (2012) Isolation and LC-MS characterization of illicit bath salts in urine. *Reporter* 30.3(3):11–13
24. Zuba D (2012) Identification of cathinones and other active components of ‘legal highs’ by mass spectrometric methods. *Trends Anal Chem* 32:15–30
25. Food and Drug Administration (2010) Code of Federal Regulations Title 21. 21CFR 216.24. Revised 1 April 2010
26. Buchanan JA, Oyer RJ, Patel NR, Jacquet GA, Bornikova L, Thienelt C, Shriver DA, Shockley LW, Wilson ML, Hurlbut KM, Lavonas EJ (2010) A confirmed case of agranulocytosis after use of cocaine contaminated with levamisole. *J Med Toxicol* 6(2): 160–164
27. Czuchlewski DR, Brackney M, Ewers C, Manna J, Fekrazad MH, Martinez A, Nolte KB, Hjelle B, Rabinowitz I, Curtis BR, McFarland JG, Baumbach J, Foucar K (2010) Clinicopathologic features of agranulocytosis in the setting of levamisole-tainted cocaine. *Am J Clin Pathol* 133(3):466–472
28. Ranieri TL, Ciolino LA (2008) Rapid selective screening and determination of ephedrine alkaloids using GC-MS footnote mark. *Phytochem Anal* 19(2):127–135

3.3. DISCUSSIÓ DE RESULTATS.

En aquest apartat es discuteixen els resultats obtinguts en els treball experimental inclòs en aquests capítol. En primer lloc, s'ha estudiat la ionització dels fenícols (cloramfenicol, tiamfenicol, florfenicol i florfenicol-amina) en les principals fonts d'ionització utilitzades en l'acoblament LC-MS (ESI, APCI i APPI). Els espectres de *full scan* obtinguts (Article IV, Apartat 3.2.1) mostren un comportament similar per a tots els compostos excepte pel metabòlit florfenicol-amina (FFA), que no s'ionitza en mode negatiu i en mode positiu sempre dona com a pic base l'ió protonat (m/z 248). En canvi, els antibiòtics nadius cloramfenicol (CAP), tiamfenicol (TAP) i florfenicol (FF) que no tenen a la seva estructura cap grup funcional que pugui acceptar fàcilment un protó, tenen tendència en mode positiu, a formar adductes amb amoni, sodi o metanol, les abundàncies relatives dels quals depenen de les diferents fonts (Taula 2, Article IV, Apartat 3.2.1). Per exemple, a la Figura 3.2, on es mostren els espectres de *full scan* del TAP en mode positiu i negatiu en cadascuna de les fonts, es pot observar que en APCI en mode positiu l'adducte amb metanol és el pic base de l'espectre mentre que en H-ESI ho és l'adducte amb NH_4^+ . En mode negatiu s'obtenen tant els ions desprotonats com els ions radicals depenent de la font d'ionització (Figura 3.2). En APCI l'elevada concentració d'electrons lliures que es generen poden ser captats fàcilment pels àtoms electronegatius (clor i fluor) presents a l'estructura d'aquests compostos donant lloc a l'ió radical mentre que en APPI, en ser la quantitat d'electrons generats per fotoionització del dopant més baixa, la ionització dels compostos té lloc més aviat per transferència protònica. En els espectres de *full scan* també s'observa una certa fragmentació en la font que augmenta en les fonts d'ionització més energètiques. Per exemple, per al TAP en mode positiu (Figura 3.2), la pèrdua d'aigua passa d'un 5% d'abundància en H-ESI a ser el pic base en l'espectre en APPI.

En aquesta tesi s'han utilitzat els espectres de fragmentació dels ions protonats, desprotonats i radicals, obtinguts en un analitzador de triple quadrupol, a més dels espectres de fragmentació en etapes successives (MS^n) obtinguts en un analitzador de trampa d'ions, que permeten establir l'ordre genealògic dels ions, així com la

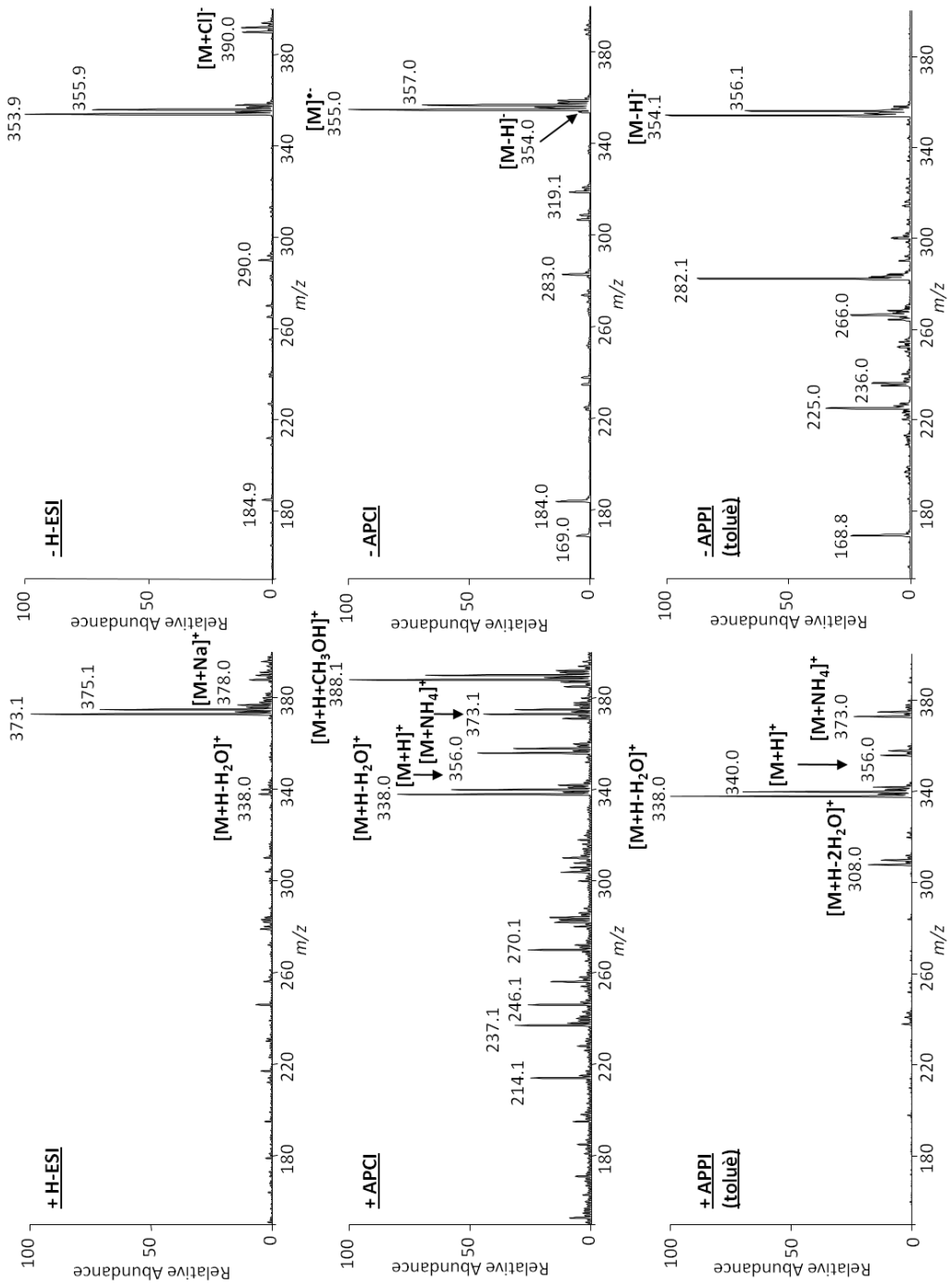


Figura 3.2. Espectres full scan del tiamfenicol (TAP) emprant les fonts d'electrosprai (H-ESI), APCI i APPI (toluè com a dopant) en mode positiu i negatiu. Les condicions d'adquisició s'indiquen a l'Article Científic IV (Apartat 3.2.1).

confirmació de les assignacions dels ions mitjançant la mesura de la massa exacta (errors < 5 ppm) emprant un espectròmetre de masses amb analitzador Q-orbitrap (Taula 3 de l'Article IV Apartat 3.2.1), per construir les rutes de fragmentació comunes per a cada tipus de precursor, que es mostren a les Figures 3, 4, 5 i 6 de l'esmentat article. En general, tant les molècules protonades com els ions radical segueixen una ruta de fragmentació comuna per a tots els compostos mentre que per a les molècules desprotonades la ruta depèn del compost ja que el FF perd HF en una primera etapa. Els ions protonats, mostren en primer lloc la pèrdua d'aigua mitjançant un mecanisme de ciclació i migració de càrrega característic en aminoalcohols (F1 de la Figura 3 de l'Article IV) i posteriors pèrdues dels substituents alquílics de l'anell aziridini (H₂O, HF i/o CH₂O). En el cas dels antibiòtics nadius, el posterior trencament dóna lloc a un ió comú per a tota la família, de m/z 241 (F7 en la Figura 3 de l'Article IV) que es pot proposar per a la identificació d'anàlegs de la família dels fenicols en mètodes d'identificació *non-target*. Pel que respecta als ions radical, els principals ions producte de la ruta comuna de fragmentació es donen per pèrdues de HCl i posterior trencament de la cadena alquíllica. Tot i que les pèrdues successives de HCl són comunes, no es poden proposar per a la identificació d'anàlegs ja que no són suficientment selectives. L'estudi de la ruta de fragmentació comuna pel CAP i TAP en ESI en mode negatiu ha permès proposar una estructura alternativa per a l'ió producte emprat comunament a la literatura per a la confirmació del CAP i el TAP (m/z 257 i 290, respectivament). A la Figura 3.3 es mostra a mode d'exemple l'espectre d'ions producte en ESI en mode negatiu per al CAP obtingut en un espectròmetre de masses de triple quadrupol (esquerra) i en un espectròmetre de masses de trampa d'ions (centre), així com l'espectre de tàndem en etapes successives de l'ió m/z 257 (dreta). A la part inferior de la Figura 3.3 es mostra l'estructura de la molècula desprotonada de CAP (m/z 321), l'estructura proposada a la bibliografia (A) [Bogusz i cols., 2004; Verzegnassi i cols., 2003; Gentili i cols., 2005; Mottier i cols., 2003] i la proposada en aquesta tesi (B) per a l'ió producte m/z 257, a més de l'estructura de l'ió producte m/z 194 on es pot observar que l'estructura A de l'ió m/z 257 no és compatible amb l'estructura de l'ió m/z 194, que s'obté en l'espectre de MS³. Per tant, en aquesta tesi es proposa un nou mecanisme (Figura 4, Article IV, Apartat 3.2.1) consistent en una substitució nucleofílica intramolecular que dóna lloc a la pèrdua de HCl i formació d'un cicle de tres membres que ràpidament s'obre i perd CO (Figura 3.2, estructura B).

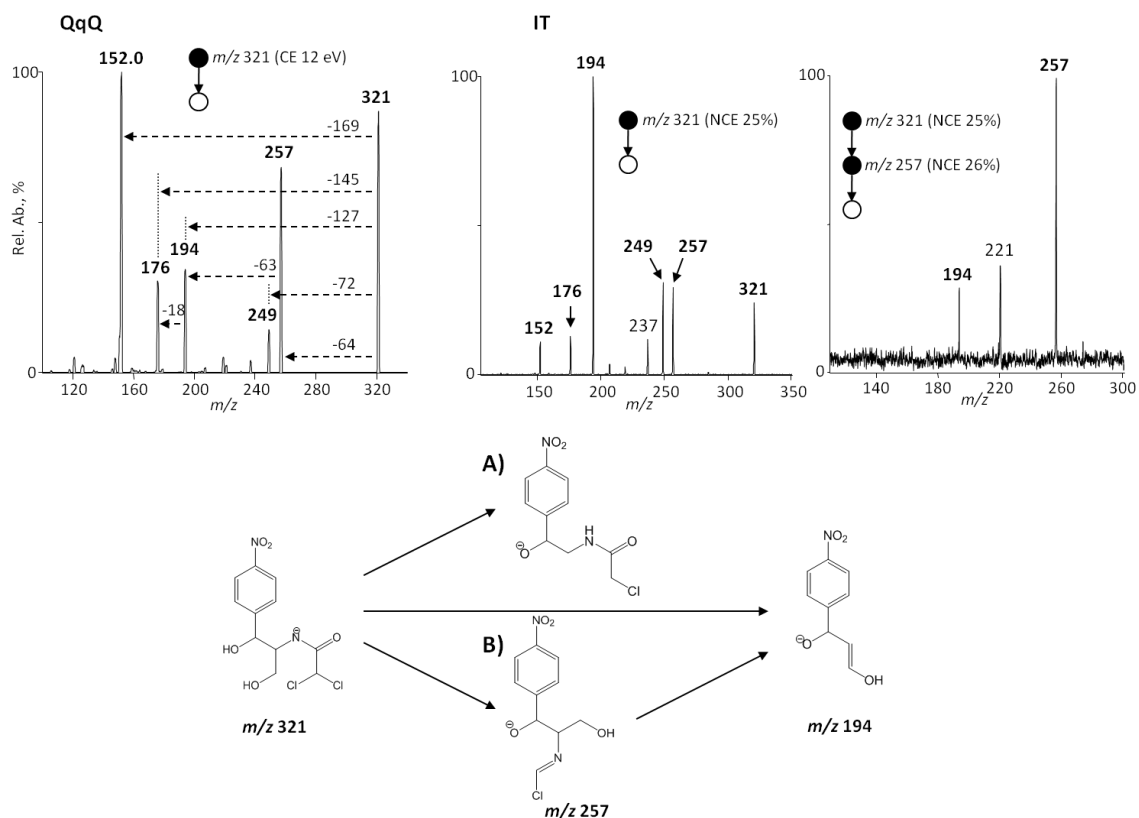


Figura 3.3. A dalt: Espectres de tàndem en triple quadrupol (esquerra) i trampa d'ions (centre) i espectre MS³ en trampa d'ions (dreta) del CAP. A baix: Estructura de la molècula desprotonada del CAP (m/z 321), estructura proposada per a l'ió producte m/z 257, (A) bibliografia (B) aquesta tesi, estructura de l'ió producte m/z 194. Referències bibliogràfiques: Bogusz i cols., 2004; Verzeznassi i cols., 2003; Gentili i cols., 2005; Mottier i cols., 2003.

Generalment, en els espectres de fragmentació d'un ió precursor monocarregat els ions producte obtinguts són de relació massa-càrrega inferior a la de l'ió precursor. No obstant això, en l'espectre de tàndem de quarta generació de la FFA que es mostra a la Figura 3.4 es poden observar diversos ions producte (m/z 144, 146 i 169) de m/z per sobre de la corresponent a l'ió precursor (m/z 130). Aquest fenomen s'havia observat prèviament en treballs realitzats en el grup d'investigació en el qual s'ha dut a terme aquesta tesi, els quals analitzaven amines aromàtiques heterocíclics, i on la presència d'aquests ions "estrany" es va atribuir a la formació d'adductes amb molècules neutres presents a l'interior de l'analitzador de masses i provinents de la fase mòbil [Toribio i cols., 2002; Barceló-Barrachina i cols., 2004]. En el cas de la FFA, els ions m/z 146 i 169

s'han assignat, respectivament, als adductes de l'ió producte de m/z 128 amb aigua i acetonitril, que són els dissolvents en el qual es realitza la infusió el patró (acetonitril:aigua 1:1, $300 \mu\text{l min}^{-1}$), mentre que l'ió m/z 144 s'ha assignat a l'adducte amb acetonitril de l'ió producte m/z 103.

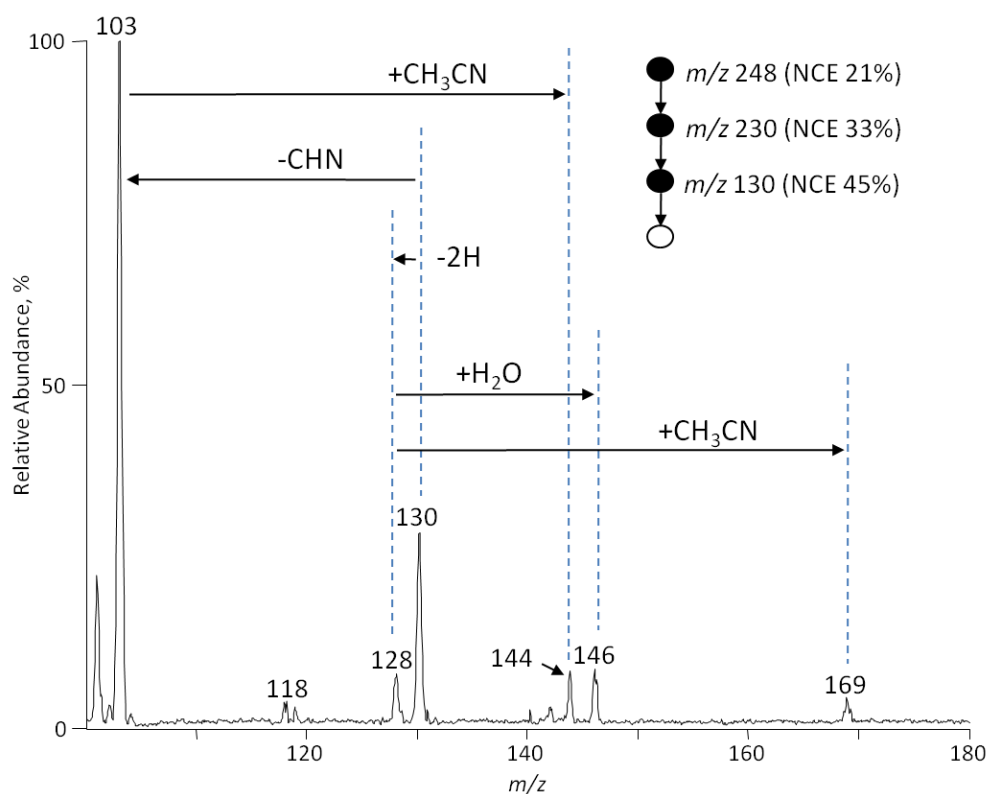


Figura 3.4. Espectre MS^4 de la FFA obtingut en un espectròmetre de masses amb analitzador IT on es pot observar la formació d'adductes ió-molècula.

L'observació d'aquests adductes va propiciar l'estudi dels factors que afecten a la formació d'adductes en espectrometria de masses en tàndem, treball que es troba recollit a l'Article V (Apartat 3.2.2) d'aquesta tesi doctoral. L'objectiu de l'estudi és avaluar la importància de les condicions d'anàlisi, dissolvents, humitat del gas de col·lisió, així com del tipus d'analitzador i la configuració de la font d'ionització (*on-axis/off-axis*) i de la cel·la de col·lisió (*on-axis* o en angle) de l'equip utilitzat en la formació d'adductes. Conèixer per quin motiu es formen aquests adductes i quins

factors afecten a la seva formació és important, ja que la presència d'adductes en els espectres de fragmentació pot dificultar-ne l'elucidació i afectar a la identificació d'anàlits emprant aquests espectres. A més, cal tenir present que la formació d'adductes ió-molècula no és un fet aïllat, ja que en aquesta tesi s'han observat adductes en analitzadors tan diferents com un IT, un QqQ o un Q-orbitrap, i amb diverses famílies de compostos (amines aromàtiques heterocícliques, fotoiniciadors, drogues veterinàries i/o analgèsics).

L'efecte de la orientació de la font d'ionització queda palès a la Figura 3.5, on es mostren els espectres de tàndem de la 2-amino-3-metil- α -carbolina (MeA α C) obtinguts en espectròmetres de masses amb un analitzador de trampa d'ions (LCQ) amb la font d'ionització en configuració *on-axis* (Figura 3.4A), un triple quadrupol (TSQ) amb la font en configuració *off-axis* (Figura 3.4B) i una trampa d'ions (LTQ) amb la font *off-axis* (Figura 3.4C). En tots els espectres s'observen adductes ió-molècula amb aigua, però només en l'espectre de l'espectròmetre de masses amb la font *on-axis* (Figura 3.4A) es poden veure adductes amb el solvent orgànic de la fase mòbil (metanol). Cal dir, a més, que aquest cas tant el tipus d'adductes (H₂O, metanol, acetonitril) com la intensitat dels mateixos depenen de la composició de la fase mòbil (Figura 3, Article V, Apartat 3.2.2). Aquests fets suggereixen que la orientació totalment en línia (*on-axis*) de la font i de l'analitzador (Figura S1A, Article V, Apartat 3.2.2), que comporta que les molècules neutres dels dissolvents de la pròpia fase mòbil puguin arribar a entrar dins de l'analitzador per la pròpia inèrcia de l'esprai, sigui la causa principal de la formació dels adductes en l'espectròmetre LCQ. Això també implica que els adductes amb aigua (*m/z* 199) observats en els espectres adquirits en espectròmetres amb font *off-axis* s'han d'explicar per alguna raó diferent de la configuració de la font. Alguns autors han proposat que l'origen de l'aigua que dóna lloc als adductes pot estar en l'adsorció de la humitat sobre les superfícies internes de l'espectròmetre de masses [Tuytten i cols., 2005; Chander i cols., 2012] o la humitat residual present en el gas emprat per a la dissociació induïda per col·lisió (*collision induced dissociation*, CID) o per a l'estabilització dels ions en la trampa (*dumper*) [Lee i cols., 2009; Chan i cols., 2010; Neta i cols., 2014]. Malgrat tot, els estudis duts a terme en aquesta tesi mostren que si bé l'aigua present als analitzadors dels espectròmetres de masses prové probablement de la humitat

residual del gas d'estabilització i/o col·lisió, la magnitud de l'efecte observat en l'espectre depèn molt de l'espectròmetre emprat. Així, en el cas dels espectròmetres de masses QqQ, la influència de la puresa del gas de col·lisió és molt marcada, tal i com es pot observar en la Figura 4 de l'Article V (Apartat 3.2.2) on es compara l'espectre adquirit en un espectròmetre que utilitza un gas de col·lisió d'alta puresa (Ar 99,999%) amb un altre que utilitza un gas amb més humitat (N₂ 99,95%). En canvi, en el cas de l'espectròmetre amb analitzador Q-orbitrap no es veu una variació en la intensitat relativa dels adductes abans i després de muntar una trampa d'humitat o emprant un equip de característiques similars (Exactive, amb analitzador orbitrap) amb un gas de col·lisió d'alta puresa. Això indica que en el cas dels analitzadors d'emmagatzematge (IT, orbitrap) l'elevat temps de residència (20-200 ms) permet la formació dels adductes proporcionant abundàncies relatives importants fins i tot amb concentracions extremadament baixes d'humitat. En canvi, en analitzadors de feix, amb un temps de residència baix (de l'ordre de μs) com ara el QqQ, la quantitat d'humitat present sí que afecta molt a la intensitat dels adductes, tot i que és inferior a la observada en espectròmetres amb analitzadors d'emmagatzematge (Figura 5, Article V, Apartat 3.2.2).

Com ja s'ha comentat en la introducció, la utilització de l'espectrometria de masses d'alta resolució emprant fons de ionització tova (que dona majoritàriament tan sols l'ió molecular protonat o desprotonat) ha permès avenços importants en la identificació de compostos desconeguts i, a més, ha propiciat l'ús de les tècniques d'espectrometria de masses "*ambient*", ja que proporciona la selectivitat necessària per eliminar les possibles interferències. En aquesta tesi i en una primera aproximació a l'anàlisi directa per espectrometria de masses, s'ha utilitzat l'anàlisi per injecció en flux (FIA) acoblat a un espectròmetre de masses amb analitzador Q-orbitrap per a desenvolupar un mètode per a l'anàlisi de drogues d'abús i nous productes estupefaents (Article VI, Apartat 3.2.3). L'estudi incideix en un tema d'importància social que és el desconeixement de la composició de molts productes emprats com a drogues d'abús, que en alguns casos contenen medicaments d'ús veterinari, especialment sedants, la qual cosa pot portar al consum inconscient de barreges contraindicades de compostos, dosis superiors a les recomanades, productes nocius o fraus [EMCDDA, 2014].

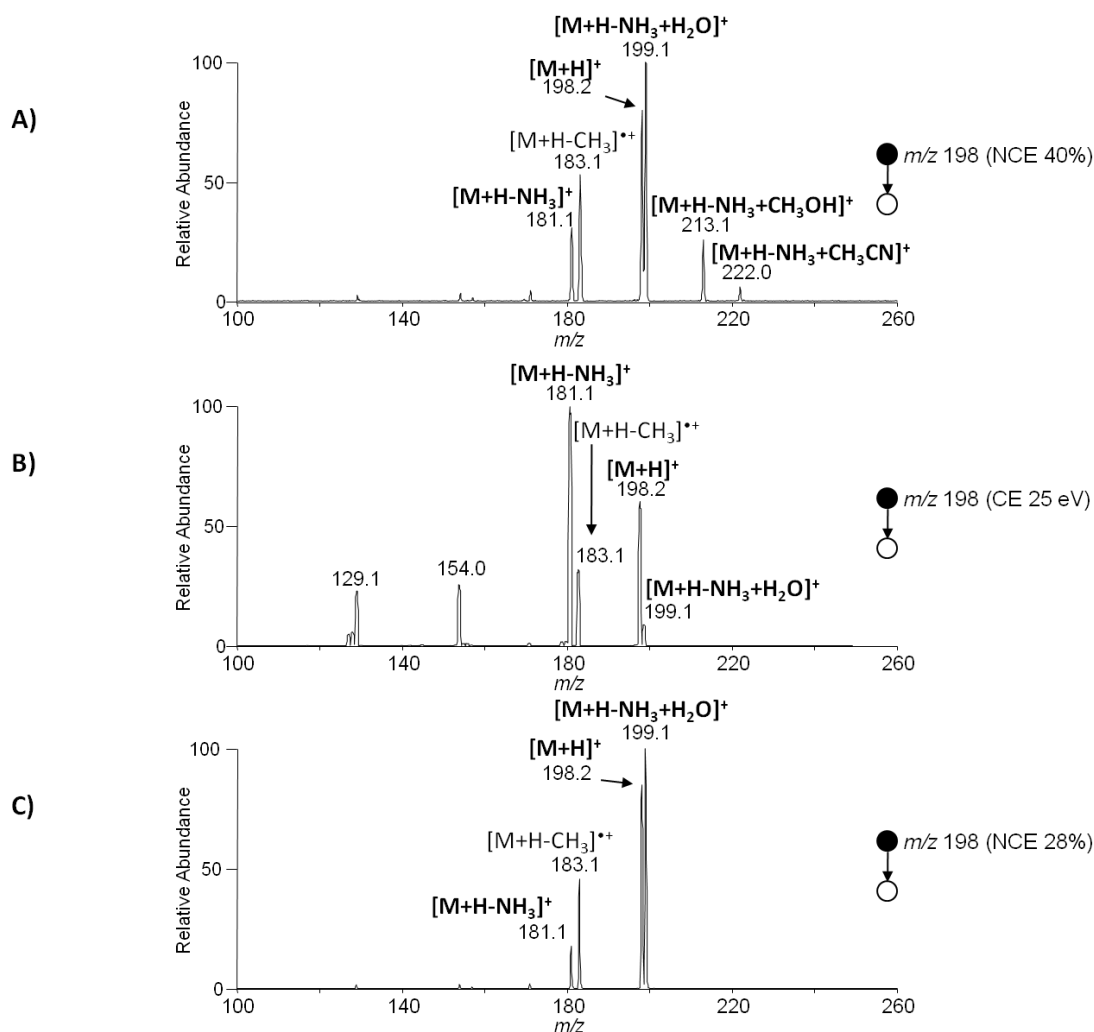


Figura 3.5. Espectre de d'ions producte de la 2-amino-3-metil- α -carbolina (MeA α C) obtingut en: A) IT, font *on-axis* (LCQ, ThermoFisher Scientific); B) QqQ, font *off-axis* (TSQ, ThermoFisher Scientific); C) IT, font *off-axis* (LTQ, ThermoFisher Scientific)

En aquesta tesi s'ha dut a terme una anàlisi global de productes estupefaents, determinant-ne tant el producte actiu principal (la pròpia droga) com els adulterants que també hi poden ser presents. Atès que es pot suposar que les mostres a analitzar contenen pocs constituents i en concentracions relativament elevades, s'ha utilitzat un mètode d'anàlisi directa (FIA) sense tractament ni separació cromatogràfica. D'aquesta manera, es disposa d'un mètode d'anàlisi molt ràpid i senzill. En aquest treball, donat que no es disposa del temps de retenció cromatogràfic, tota la informació per a la identificació dels compostos s'ha d'extreure dels espectres de masses de *full scan* i de tàndem. Per tant, cal aconseguir la màxima quantitat possible d'informació espectral i

que sigui de la màxima qualitat. Amb aquest objectiu, en aquesta tesi s'ha utilitzat un mètode DDA, efectuant l'escombratge *full scan* a resolució 70.000 (FWHM a m/z 200) per tal d'aconseguir una bona selectivitat. A més, per aconseguir la màxima informació estructural especialment necessària si es té en compte que no es pot emprar l'energia de col·lisió òptima per a cada compost, s'ha obtingut l'espectre d'ions producte mescla dels espectres de tàndem a tres energies de col·lisió diferents (*stepped*). En un mètode DDA cal garantir que tots els ions precursor s'hagin seleccionat i que no en quedin per fragmentar degut a un temps de cicle massa gran. Per tant, en aquesta tesi s'ha optat per adquirir els espectres d'ions producte a una resolució inferior (17.500 FWHM) per tal de millorar la velocitat d'escombratge, ja que es manté la selectivitat en seleccionar un únic ió precursor en el quadrupol, així com seleccionar adequadament el llinard d'intensitat dels experiments *data-dependent* i el temps d'exclusió dinàmic.

Tal com s'ha comentat a la introducció d'aquest capítol, la quantitat d'informació obtinguda és molt gran i es necessita un cribratge de les dades per tal de poder identificar els compostos presents en les mostres. Els procediments a emprar en l'anàlisi de compostos *target* i de compostos sospitosos han estat tractats en profunditat a la literatura, i en general les estratègies a emprar estan bastant estandarditzades. En canvi, si cal analitzar compostos desconeguts, en no tenir cap tipus d'informació prèvia sobre el compost, en molts casos cal ajustar l'estratègia a utilitzar en cada problema. La Figura 3.6 mostra el diagrama de flux que s'ha seguit per a la identificació dels components de les mostres analitzades. Com es pot observar, en l'anàlisi de compostos *target* i sospitosos s'ha seguit el procediment habitual de creuar els m/z dels ions observats en el espectre de *full scan* emprant el programari ExactFinder (ThermoFisher Scientific) amb la informació continguda en una base de dades que s'ha construït a partir de dades de la literatura amb prop de 450 compostos susceptibles de ser trobats en les mostres. Per a la identificació, es van emprar els criteris d'error de massa inferior a 5 ppm i coeficient de semblança del clúster isotòpic superior al 85%, i en el cas de disposar de patrons, un coeficient de semblança dels espectres de tàndem continguts en una llibreria pròpia amb espectres obtinguts en les mateixes condicions d'anàlisi superior al 90%.

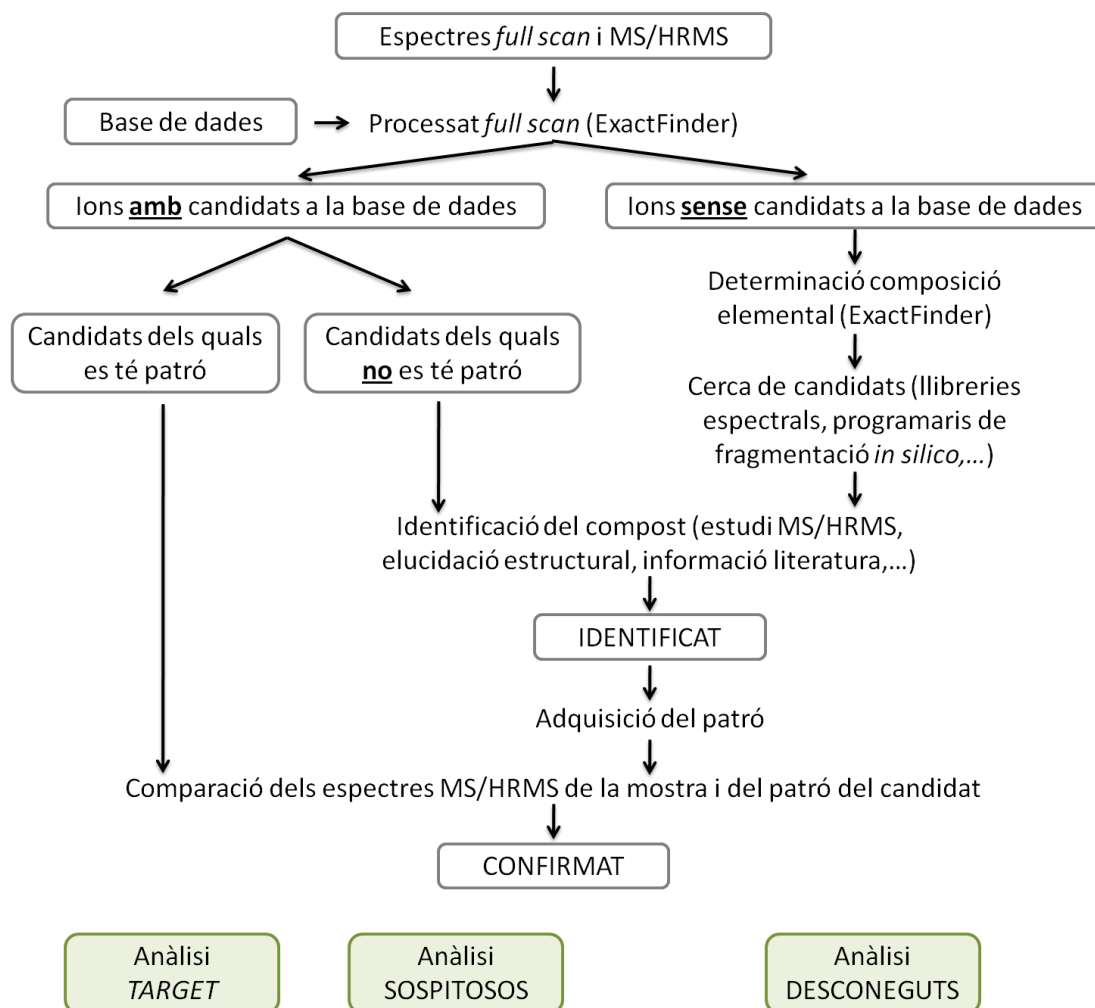


Figura 3.6. Esquema del procediment d'identificació seguit en el mètode d'anàlisi global de productes estupefaents per FIA acoblat a HRMS.

Per a l'anàlisi de compostos desconeguts, en aquesta tesi s'ha emprat un programari lliure de fragmentació *in silico* (MetFrag) que parteix de la composició elemental donada (obtinguda amb el programari ExactFinder amb els mateixos criteris estipulats abans) per trobar possibles estructures en una base de dades química (ChemSpider, PubChem, entre d'altres) i fragmentar virtualment cadascuna d'aquestes estructures seguint les normes generals de fragmentació. La comparació dels espectres virtuals amb l'experimental permet ordenar les estructures candidates segons el grau de similitud. Ara bé, el principal problema d'aquesta metodologia és que generalment el nombre d'estructures candidates és massa gran, com a resultat d'emprar una base de dades química el més complerta possible (ChemSpider). A més, els fragments obtinguts són

massa genèrics i per tant, la discriminació dels candidats és poc eficaç si l'ió a identificar no té una característica molt distintiva. Per exemple, en el nostre estudi aquesta opció només va ser viable en un cas, una suposada mostra de cocaïna de composició desconeguda. La presència d'un àtom de sofre en la composició elemental de l'ió observat en mode negatiu va permetre identificar aquest component com l'analgèsic metamizol (Figura 5, Article VI, Apartat 3.2.3). No obstant això, l'estudi de l'espectre de fragmentació del compost desconegut pot permetre trobar informació addicional que es pot emprar per a limitar la llista de candidats. En el cas de la mostra de *legal high* LH2 (Taula 1, Article VI, Apartat 3.2.3), l'espectre d'ions producte de l'ió desconegut m/z 178.1223 mostrava els ions producte característics d'una estructura derivada de la metilfenetilamina (pèrdues d'amoníac i C_2H_7N molt intenses). Aquesta informació va permetre reduir el número de candidats proposats pel programari de fragmentació *in silico* amb un índex de semblança superior al 80% de més de 206 compostos a només dos candidats: 6-(2-aminopropil)-2,3-dihidrobenzofurà i 5-(2-aminopropil)-2,3-dihidrobenzofurà, que són dos compostos relacionats amb la metilendioxiamentamina. El compost concret no va poder ser identificat, ja que no existeixen patrons comercials d'aquestes substàncies, així que només es va poder arribar a formular una identificació temptativa. Una altra estratègia proposada a la literatura per a la identificació de desconeguts és la utilització de llibreries espectrals, seguint la tendència de GC-MS. Per exemple, Wang i cols. van emprar la comparació d'arbres espectrals obtinguts en un espectròmetre de masses IT-orbitrap per a identificar adulterants il·legals en aliments funcionals emprant el programari MassFrontier (HighChem) que incorpora la funcionalitat de fragmentació *in silico* i també una llibreria espectral [Wang i cols., 2015]. En aquesta tesi, es va intentar la utilització de la llibreria espectral MZCloud (HighChem), de característiques semblants a l'anterior, per a la identificació de compostos sospitosos i desconeguts, però els coeficients de correspondència no superaven el 50%. Atès que ambdues llibreries han estat construïdes emprant equips amb analitzadors orbitrap, de manera que la variabilitat espectral deguda a emprar equips diferents queda disminuïda, aquest resultat insuficient és probablement degut a que l'espectre de fragmentació de la llibreria s'ha obtingut a una única energia de col·lisió, mentre que els espectres obtinguts en aquesta tesi i que es volen comparar s'han adquirit en mode "stepped" (combinat de tres energies de col·lisió), la qual cosa distorsiona els resultats de la

comparació d'espectres. Tot i així, l'aplicació de l'energia de col·lisió en mode "*stepped*" segueix sent recomanable per la gran quantitat d'informació estructural que proporciona, especialment si es té en compte que el nombre de compostos inclosos en aquestes llibreries encara no és suficient com per poder ser emprades de manera universal. Tot i així, la tendència general és avui dia crear llibreries obertes construïdes a partir de la col·laboració de diferents laboratoris (com ara MZcloud) de manera que en un futur es pugui emprar aquesta opció amb resultats satisfactoris.

CONCLUSIONS

En la present tesi doctoral s'ha estudiat l'aplicabilitat de l'espectrometria de masses per al desenvolupament de metodologia analítica per a la determinació de compostos veterinaris tant mitjançant el seu acoblament a la cromatografia de líquids com per anàlisi directa per injecció en flux (FIA). En concret, s'ha avaluat l'aplicabilitat de nous rebliments i fases estacionàries per a l'anàlisi de fenicols i aminoglicòsids i s'ha estudiat el comportament d'aquestes famílies de compostos en espectrometria de masses amb l'objectiu de proposar estratègies d'anàlisi *non-target*. Igualment, s'ha desenvolupat un mètode directe per a l'anàlisi global de nous productes estupefaents i s'han avaluat diferents estratègies per a la identificació dels compostos presents en les mostres.

De la realització del treball dut a terme en aquesta tesi es poden extreure les següents conclusions:

Sobre la separació per cromatografia de líquids,

- Les úniques fases estacionàries d'entre les estudiades que permeten retenir adequadament la florfenicol-amina (FFA), i en conseqüència, la separació de tots els fenicols són la fenil-hexil i la pentafluorofenil (PFP), gràcies a la combinació de les interaccions hidrofòbiques i π - π que es poden establir entre les fases i aquests compostos. La major retenció de la FFA en la fase estacionària PFP s'explica per una interacció de bescanvi catiònic amb els silanols desprotonats del suport quan el percentatge de modificador orgànic a la fase mòbil és suficient per permetre l'obertura de les cadenes de la fase estacionària.
- L'estabilitat dels temps de retenció en la columna amb la fase de fenil-hexil és molt millor (%RSD inferior a 0,7%) que la de la PFP (amb variacions de fins un 7%), que en ser de bescanvi iònic és molt sensible a petites diferències en la força iònica de la fase mòbil. En conseqüència, es proposa la columna fenil-hexil per a la separació cromatogràfica dels fenicols que a més, en tenir un rebliment de partícules de nucli sòlid, permet obtenir millor eficàcia cromatogràfica i un temps d'anàlisi fins a 6 cops menor que el dels mètodes publicats a la literatura.
- S'ha posat de manifest que la utilització d'una columna HILIC de sílice pura per a la separació dels aminoglicòsids requereix concentracions molt elevades de sals a

la fase mòbil, atès que el mecanisme predominant en la separació és el bescanvi catiònic.

- Es proposa utilitzar per a la separació dels aminoglicòsids una columna amb una fase estacionària multimodal Obelisc R, que permet regular la contribució de cadascun dels mecanismes d'interacció (HILIC, bescanvi catiònic, interacció per ponts d'hidrogen, fase invertida). L'ús d'una fase mòbil ternària acetonitril:aigua:àcid fòrmic permet aconseguir una bona separació dels aminoglicòsids en un temps d'anàlisi inferior a 10 minuts i sense la necessitat d'emprar concentracions elevades de sals o formadors de parells iònics a la fase mòbil, la qual cosa permet disposar d'un mètode compatible amb l'acoblament a l'espectrometria de masses.

Sobre l'estudi de fonts d'ionització i espectres de tàndem,

- Els espectres obtinguts en les diferents fonts d'ionització pels fenicols posen de manifest el comportament marcadament diferent d'aquests compostos en les fonts d'ionització a pressió atmosfèrica. Els fenicols tenen una tendència marcada a formar adductes (especialment en mode d'ionització positiu) per l'absència de grups fàcilment ionitzables, i a donar l'ió radical en APCI negatiu per la presència d'halògens en la seva estructura. S'ha proposat l'ús de la font ESI en mode negatiu per als antibiòtics nadius i en mode positiu per a la FFA, ja que proporciona la màxima intensitat de l'ió molecular (desprotonat o protonat) amb una mínima quantitat d'adductes i una molt baixa fragmentació a la font.
- L'estudi de les rutes de fragmentació dels fenicols ha permès proposar, a més dels ions més adients per a la seva determinació per monitorització de reaccions múltiples (MRM), l'ió producte a m/z 241, comú per a tots els antibiòtics nadius de la família dels fenicols, per a la identificació d'anàlegs d'aquesta família en mètodes d'anàlisi *non-target*. Es proposa també un nou mecanisme de fragmentació, consistent en una substitució nucleofílica intramolecular amb ciclació i pèrdua d'HCl i CO de l'ió precursor [M-H], per als ions producte a m/z

257 i 290, emprats habitualment per a la confirmació del cloramfenicol i el tiamfenicol.

- La mesura de la massa exacta dels ions producte en l'espectròmetre de masses Q-orbitrap ha permès confirmar la composició elemental dels ions de les rutes de fragmentació i proposar noves estructures per als ions producte a m/z 246 i 221 de l'estreptomina i la dihidroestreptomina, consistents en la pèrdua conjunta de la unitat d'estreptobiosamina i amoníac o cianamida, respectivament.
- S'ha demostrat que la formació d'adductes ió-molècula en l'etapa de fragmentació induïda per col·lisió es produeix en tot tipus d'analitzadors i, a més, és un fenomen relativament habitual. La configuració de l'analitzador ha resultat ser un dels aspectes més importants; els equips amb font d'ionització en configuració *on-axis* i analitzador en línia amb la font (180°) afavoreixen la formació d'adductes amb molècules de solvent provinents de la fase mòbil (aigua i solvents orgànics). En canvi, en els espectròmetres de masses amb font *off-axis* només s'observen els adductes amb aigua majoritàriament provinents de la humitat residual del gas de col·lisió.
- S'ha posat de manifest que la intensitat dels adductes ió-molècula formats dins els analitzadors depèn de la puresa del gas de col·lisió en el cas dels espectròmetres de masses de feix (QqQ), mentre que en els analitzadors d'emmagatzematge (IT, orbitrap) l'elevat temps de residència afavoreix la formació d'adductes amb intensitats elevades (80%-100%) fins i tot amb quantitats molt baixes d'humitat (<3 ppm).

Sobre l'anàlisi quantitativa de mostres,

- Es proposa un tractament de mostra basat en l'extracció en fase sòlida (SPE) amb cartutxos mixtos de fase invertida i bescanvi catiònic (MCX) per a la purificació i preconcentració dels fenicols en mostres de teixit animal (carn, peix i marisc) ja que permeten l'adequada recuperació tant dels fenicols nadius com del metabòlit polar. Per a l'anàlisi de mel, amb una elevada presència de substàncies polars interferents, es recomana l'ús de cartutxos de balanç hidrofílic-lipofílic (HLB). Per

a l'anàlisi d'aminoglicòsids, les notables diferències de basicitat dels compostos fan difícil trobar unes condicions òptimes per a l'adequada retenció i elució dels compostos en cartutxos de bescanvi catiònic fort o feble. Per tant, es recomana realitzar només la purificació de les mostres amb cartutxos HLB.

- Per tal d'aconseguir una quantificació veraç dels fenicols i dels aminoglicòsids en mostres d'aliments, es proposa l'ús del calibratge *matrix-matched* per a la correcció tant de l'efecte matriu com de les pèrdues d'anàlit durant el procés de tractament de mostra. A més, en l'anàlisi de kasugamicina (KAS) i estreptomicina en vegetals, es proposa la dilució de la mostra (1:5) amb l'objectiu de reduir la supressió de la ionització observada per la KAS la qual cosa permet millorar fins a 100 vegades la sensibilitat del mètode.
- Els mètodes d'anàlisi desenvolupats en aquesta tesi presenten bons paràmetres de qualitat indicant que són suficientment sensibles, selectius i robustos per ser aplicats a l'anàlisi de mostres. En concret, tots els mètodes desenvolupats presenten unes bones precisions (valors de %RSD inferiors a 15%), uns LOQs entre 0,1 i 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i permeten la detecció dels compostos a nivells de concentració per sota de l'MRL o MRPL establert per la legislació, i han proporcionat resultats satisfactoris en l'anàlisi de mostres fortificades (veracitats, expressades com a error relatiu, d'entre 2 i 23%).
- El fet que no s'hagin trobat positius en les mostres d'aliments d'origen animal adquirides en comerços locals i analitzades en aquesta tesi posa de manifest que les mesures de control de la presència de residus de medicaments veterinaris regulats funcionen adequadament.

Sobre l'anàlisi *non-target* i la identificació de compostos desconeguts,

- S'ha demostrat que l'anàlisi per injecció en flux acoblat a l'espectrometria de masses d'alta resolució (FIA-HRMS) és un mètode ràpid i adequat per a l'anàlisi global de mostres amb pocs components i concentracions relativament elevades, com són les mostres d'estupefaents. Per obtenir un mètode d'anàlisi apte per al major nombre de compostos, es recomana emprar com a solvent portador una

mescla de metanol:aigua 1:1 acidificada amb àcid fòrmic (0,1%) que afavoreix la ionització, i l'adquisició en modes positiu i negatiu d'ionització. També es recomana l'ús de condicions suaus d'ionització en una font d'ESI per reduir la possibilitat de fragmentacions a la font.

- Es proposa obtenir els espectres de fragmentació aplicant de manera esglaonada (*stepped*) l'energia de col·lisió a fi de facilitar la identificació de compostos desconeguts en els mètodes d'anàlisi *non-target*. Aquesta estratègia fa possible assegurar la presència d'ions producte en un interval ampli de m/z , la qual cosa és especialment útil quan no es coneix l'energia òptima de col·lisió de l'anàlit.
- La gran quantitat i qualitat d'informació proporcionada per la combinació d'un espectròmetre de masses d'alta resolució (Q-Exactive) amb un mode d'adquisició *data-dependent* ha permès la identificació de compostos en l'anàlisi directa per FIA-HRMS de mostres de productes estupefaents. Es proposa l'ús d'una base de dades pròpia construïda amb informació de la literatura per a la identificació de compostos *target* i sospitosos en base a criteris d'exactitud de massa (5 ppm d'error màxim) i adequació del clúster isotòpic (85% de semblança). Per a la confirmació dels compostos *target* es recomana utilitzar una llibreria espectral pròpia amb espectres MS/HRMS adquirits en les mateixes condicions d'anàlisi per tal d'assegurar un coeficient de semblança prou elevat (mínim 85%).
- S'ha demostrat la dificultat d'establir una estratègia única per a la identificació de desconeguts. Es proposa l'ús de programaris de fragmentació *in silico* per a la identificació de compostos desconeguts, atès que l'ús de llibreries espectrals públiques no proporciona resultats suficientment fiables (coeficients de semblança baixos). La interpretació dels espectres de tàndem ha estat fonamental per proporcionar informació addicional que faciliti la identificació del compost desconegut.
- Els resultats obtinguts amb el mètode FIA-HRMS demostren la gran quantitat d'adulteracions i fraus presents en les mostres d'estupefaents, i posen de manifest la necessitat de desenvolupar mètodes de cribratge *non-target*, així com estratègies adequades per a la identificació dels components de les mostres. L'aplicació d'aquest mètode, ha permès identificar la presència de nombrosos

medicaments d'ús humà i veterinari (fenacetina, benzocaïna, levamisol) emprats com a adulterants en mostres d'estupefaents, així com la presència de l'analgèsic metamizol en una mostra fraudulenta de cocaïna.

BIBLIOGRAFIA

Almeida M P, Rezende C P, Souza L F, Brito R B. Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 29 (2012) 517-525.

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

Azzouz A, Jurado-Sánchez B, Souhail B, Ballesteros E. Simultaneous determination of 20 pharmacologically active substances in cow's milk, goat's milk, and human breast milk by gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 59 (2011a) 5125-5132.

Azzouz A, Souhail B, Ballesteros E. Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 84 (2011b) 820-828.

Baggiani C, Giovannoli C, Anfossi L, Passini C, Baravalle P, Giraudi G. A connection between the binding properties of imprinted and nonimprinted polymers: a change of perspective in molecular imprinting. *J Am Chem Soc* 134 (2012) 1513-1518.

Baggio A, Gallina A, Benetti C, Mutinelli F. Residues of antibacterial drugs in honey from the Italian market. *Food Addit Contam B* 2 (2009) 52-58.

Barbieri C M, Pilch D S. Complete thermodynamic characterization of the multiple protonation equilibria of the aminoglycoside antibiotic paromomycin: a calorimetric and natural abundance ¹⁵N NRM study. *Biophys J* 90 (2006) 1338-1349.

Barceló-Barrachina E, Moyano E, Puignou L, Galceran M T. Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *J Chromatogr A* 1023 (2004) 67-78.

Barclay M L, Begg E J. Aminoglycoside adaptive resistance: importance for effective dosage regimens. *Drugs* 61 (2001) 713-721.

Barreto F, Ribeiro C, Hoff R B, Dalla Costa T. Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC directive. *Food Addit Contam* 29 (2012) 550-558.

Bell D S, Jones A D. Solute attributes and molecular interactions contributing to "U-shape" retention on a fluorinated high-performance liquid chromatography stationary phase. *J Chromatogr A* 1073 (2005) 99-109.

Berendsen B, Stolker L, de Jong J, Nielen M, Tserendorj E, Sodnomdarjaa R, Cannavan A, Elliott C. Evidence of natural occurrence of the banned antibiotic chloramphenicol in herbs and grass. *Anal Bioanal Chem* 397 (2010) 1955-1963.

Berendsen B J A, Elbers I J W, Stolker A A M. Determination of the stability of antibiotics in matrix and reference solutions using a straightforward procedure applying mass spectrometric detection. *Food Addit Contam* 28 (2011) 1657-1666.

Beynon J H. Qualitative analysis of organic compounds by mass spectrometry *Nature* 174 (1954) 735-737.

Biancotto G, Contiero L, Benetti C, Calligaris M, Tibaldi E, Cerni L, Francese M. Depletion of chloramphenicol in trout after a hypothetical therapeutic treatment. *Anal Chim Acta* 637 (2009) 173-177.

Bignardi C, Cavazza A, Corradini C, Salvadeo P. Targeted and untargeted data-dependent experiments for characterization of polycarbonate food-contact plastics by ultra high performance chromatography coupled to quadrupole orbitrap tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1372 (2014) 133-144.

Bobály B, Guillarme D, Fekete S. Systematic comparison of a new generation of columns packed with sub-2 μm superficially porous particles. *J Sep Sci* 37 (2014) 189-197.

Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, Laganà A, Mele M, Nazzari M. Simple confirmatory assay for analyzing residues of aminoglycoside antibiotics in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1067 (2005) 93-100.

Bogusz M J, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. Rapid determination of chloramphenicol and its glucuronide in food products by liquid chromatography-electrospray negative ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 807 (2004) 343-356.

Bohm D A, Stachel C S, Gowik P. Validation of a method for the determination of aminoglycosides in different matrices and species based on an in-house concept. *Food Addit Contam* 30 (2013) 1037-1043.

Bononi M, Tateo F. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of chloramphenicol in propolis extracts available on the Italian market. *J Food Compos & Anal* 21 (2008) 84-89.

Bousova K, Senyuva H, Mittendorf K. Quantitative multi-residue method for determination antibiotics in chicken meat using turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1274 (2013) 19-27.

Boxall A B A, Johnson P, Smith E J, Sinclair C J, Stutt E, Levy L S. Uptake of veterinary medicines from soils into plants. *J Agric Food Chem* 54 (2006) 2288-2297.

Boyd B, Björk H, Billing J, Shimelis O, Axelsson S, Leonora M, Yilmaz E. Development of an improved method for trace analysis of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *J Chromatogr A* 1174 (2007) 63-71.

Bu X, Skrdla P J, Dormer P G, Bereznitski Y. Separation of triphenyl atropisomers of a pharmaceutical compound on a novel mixed mode stationary phase: A case study involving dynamic chromatography, dynamic NMR and molecular modeling. *J Chromatogr A* 1217 (2010) 7255-7261.

Calvarese S, Forti A F, Scortichini G, Diletti G. Chloramphenicol in royal jelly: analytical aspects and occurrence in Italian imports. *Apidologie* 37 (2006) 673-678.

Cerkvenik-Flajs V. Performance characteristics of an analytical procedure for determining chloramphenicol residues in muscle tissue by gas chromatography–electron capture detection. *Biomed Chromatogr* 20 (2006) 985-992.

CFR 21 Code of Federal Regulations 522.380, Revised as of april 1st, 2013, 254-255.

CFR 40 Code of Federal Regulations 180.245, Revised as of july, 1st, 2011, 481-482.

CFR 40 Code of Federal Regulations 180.614, Revised as of july, 1st, 2013, 636.

Chan C, Axe F U, Bolgar M, Attygalle A B. Reactivity of gaseous sodiated ions derived from benzene dicarboxylate salts toward residual water in the collision gas. *J Mass Spectrom* 45 (2010) 1130-1138.

Chander C P, Raju G, Mathai G, Srinivas R, Gaikwad H K, Bantu R, Nagarapu L. Electrospray ionization tandem mass spectrometry of 3-phenyl-N-(3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide derivatives: unusual fragmentation involving loss of 11 u. *Rapid Commun Mass Spectrom* 26 (2012) 207-214.

Chen H, Ying J, Chen H, Huang J, Liao L. LC determination of chloramphenicol in honey using dispersive liquid-liquid microextraction. *Chromatographia* 68 (2008) 629-634.

Chen H, Chen H, Ying J, Huang J, Liao L. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey. *Anal Chim Acta* 632 (2009) 80-85.

Chen Y, Hu X, Xiao X. Sample preparation for determination of neomycin in swine tissues by liquid chromatography-fluorescence detection. *Anal Letters* 43 (2010) 2496-2504.

Chen L, Li B. Magnetic molecularly imprinted polymer extraction of chloramphenicol from honey. *Food Chem* 141 (2013) 23-28.

Chen Y, Schwack W. High-performance thin-layer chromatography screening of multi class antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1356 (2014) 249-257.

Cherlet M, De Baere S, De Backer P. Determination of gentamicin in swine and calf tissues by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35 (2000) 1342-1350.

Cherlet M, De Baere S, De Backer P. Quantitative determination of dihydrostreptomycin in bovine tissues and milk by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 42 (2007) 647-656.

Chiaochan C, Koesukwiwat U, Yudthavorasit S, Leepipatpiboon N. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. *Anal Chim Acta* 682 (2010) 117-129.

Cody R B, Laramée J A, Durst H D. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal Chem* 77 (2005) 2297-2302.

Commission Decision 2004/129/EC of 30 January 2004 concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances. *Off J Eur Commun* L37, 27-31.

Commission Decision 2005/303/EC of 31 March 2005 concerning the non-inclusion of cresylic acid, dichlorophen, imazamethabenz, kasugamycin and polyoxin in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing these substances. *Off J Eur Commun* L97, 38-41.

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

Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin. *Off J Eur Commun* L71, 17-18.

Commission Regulation (EC) No 1430/94 of 22 June 1994 amending Annexes I, II, III and IV of Council Regulation (EEC) No 2377/90 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* L156, 6-8.

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.

Cooks R G, Ouyang Z, Takats Z, Wiseman J M. Ambient Mass Spectrometry. *Science* 311 (2006) 1566-1570.

Cooper A D, Tarbin J A, Farrington W H H, Shearer G. Aspects of extraction, spiking and distribution in the determination of incurred residues of chloramphenicol in animal tissues. *Food Addit Contam* 15 (1998) 637-644.

Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists. *Off J Eur Commun* L125, 3-9.

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.

Cronly M, Behan P, Foley B, Malone E, Martin S, Doyle M, Regan L. Rapid multi-class multi-residue method for the confirmation of chloramphenicol and eleven nitroimidazoles in milk and honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). *Food Addit Contam* 27 (2010) 1233-1246.

De Dominicis E, Comissati I, Suman M. Targeted screening of pesticides, veterinary drugs and mycotoxins in bakery ingredients and food commodities by liquid chromatography-high-resolution single-stage Orbitrap mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 47 (2012) 1232-1241.

Determination of aminoglycoside and macrolide antibiotics in meat by pressurized liquid extraction and LC-ESI-MS. *J Sep Sci* 33 (2010) 522-529.

Dollery C. *Therapeutic Drugs*. Churchill Livingstone (1999) 168-172.

Dowling P M. Chloramphenicol, Thiamphenicol and Florfenicol. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. John Wiley & Sons (2013a) 269-277.

Dowling P M. Aminoglycosides. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. John Wiley & Sons (2013b) 233-255.

Drusano G L, Ambrose P G, Bhavnani S M, Bertino J S, Nafziger A N, Louie A. Back to the future: using aminoglycosides again and how to dose them optimally. *Clin Infect Dis* 45 (2007) 753-760.

Ehrlich J, Bartz Q R, Smith R M, Joslyn D A. Chloromycetin, a new antibiotic from a soil actinomycete. *Science* 106 (1947) 417-419.

EMCDDA (2014) European drug report 2014. European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, Lisbon

EMA, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for veterinary use (1996) Chloramphenicol.

EMA, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for veterinary use (1999a) Florfenicol. EMA/MRL/591/99-FINAL.

EMA, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for veterinary use (1999b) Apramycin. EMA/MRL/526/98-FINAL.

EMA, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for veterinary use (2006) Thiamphenicol. EMA/CVMP/162614/2006-Final.

EMA, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for veterinary use (2007) Dihydrostreptomycin. EMA/CVMP/463923/2006-Final.

European Union Reference Laboratory for Antimicrobial and Dye Residues in Food (Fougères, França). CRL Technical Guidance Paper (EU) of 7 December 2007. http://crl.fougères.anses.fr/publicdoc/2013/EURL_Guidance_Concentrations_Minimales_Recommand%C3%A9es_Methodes_Analytiques.pdf, *accredit gener* 2015.

Evaggelopoulou E N, Samanidou V F. Development and validation of an HPLC method for the determination of six penicillin and three amphenicol antibiotics in gilthead seabream (*Sparus aurata*) tissue according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food Chem* 136 (2013) 1322-1329.

Fekete S, Fekete J, Ganzler K. Shell and small particles; evaluation of new column technology. *J Pharm Biomed Anal* 49 (2009) 64-71.

Fekete S, Guillarme D. Kinetic evaluation of new generation of column packed with 1.3 μm core-shell particles. *J Chromatogr A* 1308 (2013) 104-113.

Fernández-Torres R, Bello López M A, Olías Consentino M, Callejón Mochón M, Pérez-Bernal J L. Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples. *Anal Chim Acta* 675 (2010) 156-164.

Fernández-Torres R, Bello López M A, Olías Consentino M, Callejón Mochón M, Ramos Payán M. Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples. *J Pharm Biomed Anal* 54 (2011) 1146-1156.

Festing M F, Diamanti P, Turton J A. Strain differences in haematological response to chloramphenicol succinate in mice: implications for toxicological research. *Food Chem Toxicol* 39 (2001) 375-383.

Flurer C L. The analysis of aminoglycoside antibiotics by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 13 (1995) 809-816.

Food and Drug Regulations (C.R.C., c. 870) B.01.048. Government of Canada.

Forti A F, Campana G, Simonella A, Multari M, Schortichini G. Determination of chloramphenicol in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 529 (2005) 257-263.

Fujita K, Ito H, Nakamura M, Watai M, Taniguchi M. Determination of chloramphenicol residues in bee pollen by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J AOAC Int* 91 (2008) 1103-1109.

Fujita Y, Tokunaga T, Kataoka H. Saline and buffers minimize the action of interfering factors in the bacterial endotoxins test. *Anal Biochem* 409 (2011) 46-53.

Gaggelli E, Gaggelli N, Molteni E, Valensin G, Balenci D, Wronska M, Szczepanik W, Nagaj J, Skala J, Jezowska-Bojczuk M. Coordination pattern, solution structure and DNA damage studies of the copper(II) complex with the unusual aminoglycoside antibiotic hygromycin B. *Dalton Trans* 39 (2010) 9830-9837.

Gallo P, Nasi A, Vinci F, Guadagnuolo G, Brambilla G, Fiori M, Serpe L. Development of a liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramphenicol residues in milk after alfa-1-acid glycoprotein affinity chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 574-579.

Gantverg A, Shishani I, Hoffman M. Determination of chloramphenicol in animal tissues and urine. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry versus gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 483 (2003) 125-135.

Gaugain-Juhel M, Delépine B, Gautier S, Fourmond M P, Gaudin V, Hurtaud-Pessel D, Verdon E, Sanders P. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Addit Contam* 26 (2009) 1459-1471.

Gbylik M, Posyniak A, Mitrowska K, Bladek T, Zmudzki J. Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 30 (2013) 940-948.

Gentili A, Perret D, Marchese S. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products. *Trends Anal Chem* 24 (2005) 704-733.

Gikas E, Kormali P, Tsiipi D, Tsarbopoulos A. Development of a rapid and sensitive SPE-LC-ESI MS/MS method for the determination of chloramphenicol in seafood. *J Agric Food Chem* 52 (2004) 1025-1030.

Gómez-Perez M L, Plaza-Bolaños P, Romero-González R, Martínez-Vidal J L, Garrido-Frenich A. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1248 (2012) 130-138.

Goolsby B J, Brodbelt J S. Analysis of protonated and alkali metal cationized aminoglycoside antibiotics by collision-activated dissociation and infrared multi-photon dissociation in the quadrupole ion trap. *J Mass Spectrom* 35 (2000) 1011-1024.

Grabowski T, Jaroszewski J J, Piotrowski W. Correlations between no observed effect level and selected parameters of the chemical structure for veterinary drugs. *Toxicol In Vitro* 24 (2010) 953-959.

Grahek R, Zupančič-Kralj, L. Identification of gentamicin impurities by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 50 (2009) 1037-1043.

Granja R H M M, Montes Niño A M, Zucchetti R A M, Montes Niño R E, Patel R, Salerno A G. Determination of streptomycin residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 637 (2009) 64-67.

Gremiligianni A M, Megoulas N C, Koupparis M A. Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of *streptomycin* and *dihydrostreptomycin* residues in milk based on mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 1217 (2010) 6646-6651.

Gritti F, Guiochon G. Mass transfer mechanism in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1302 (2013) 55-64.

Guiochon G, Gritti F. Shell particles, trials, tribulations and triumphs. *J Chromatogr A* 1218 (2011) 1915-1938.

Hammel Y A, Mohamed R, Gremaud E, LeBreton M, Guy P A. Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1177 (2008) 58-76.

Han J, Wang Y, Yu C, Li C, Yan Y, Liu Y, Wang L. Separation, concentration and determination of chloramphenicol in environment and food using an ionic liquid/salt aqueous two-phase flotation system coupled with high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 685 (2011a) 138-145.

Han J, Wang Y, Yu C, Yan Y, Xie X. Extraction and determination of chloramphenicol in feed water, milk, and honey samples using an ionic liquid/sodium citrate aqueous two-phase system coupled with high-performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 399 (2011b) 1295-1304.

Harris G A, Galhena A S, Fernández F M. Ambient Sampling/Ionization Mass Spectrometry: applications and current trends. *Anal Chem* 83 (2011) 4508-4538.

Hemström P, Irgum K. Hydrophilic interaction chromatography. *J Sep Sci* 29 (2006) 1784-1821.

Hernández F, Sancho J V, Ibáñez M, Abad E, Portolés T, Mattioli L. Current use of high-resolution mass spectrometry in the environmental sciences. *Anal Bioanal Chem* 403 (2012) 1251-1264.

Horie M, Saito H, Natori T, Nagata J, Nakazawa H. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in honey by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J Liq Chromatogr & Rel Technol* 27 (2005) 863-874.

Hornish R E, Wiest J R. Quantitation of spectinomycin residues in bovine tissues by ion-exchange high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and confirmation by reversed-phase high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 812 (1998) 123-133.

Hu P, Chess E K, Brynjelsen S, Jakubowski G, Melchert J, Hammond R B, Wilson T D. Collisionally activated dissociations of aminocyclitol-aminoglycoside antibiotics and their application in the identification of a new compound in tobramycin samples. *J Am Soc Mass Spectrom* 11 (2000) 200-209.

Huang J F, Zhang H J, Feng Y Q. Chloramphenicol extraction from honey, milk and eggs using polymer monolith microextraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry detection. *J Agric Food Chem* 54 (2006) 9279-9286.

Huang Z Y, Yang Q P, Zhang Q, Peng A H. Sample digestion for determining chloramphenicol residues in carp serum and muscle. *Aquacult Int* 17 (2009) 69-76.

Hurtaud-Pessel D, Jagadeshwar-Reddy T, Verdon E. Development of a new screening method for the detection of antibiotic residues in muscle tissues using liquid chromatography and high resolution mass spectrometry with a LC-LTQ-Orbitrap instrument. *Food Addit Contam* 28 (2011) 1340-1351.

IARC, International Agency for Research on Cancer. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* 50 (1990) 169-193.

Ignatova S, Sumner N, Colclough N, Sutherland I. Gradient elution in counter-current chromatography: a new layout for an old path. *J Chromatogr A* 1218 (2011) 6053-6060.

Impens S, Reybroeck W, Vercammen J, Courtheyn D, Ooghe S, De Wasch K, Smedts W, De Brabander H. Screening and confirmation of chloramphenicol in shrimp tissue using ELISA in combination with GC-MS² and LC-MS². *Anal Chim Acta* 483 (2003) 153-163.

Ishii R, Horie M, Chan W, MacNeil J. Multi-residue quantitation of aminoglycoside antibiotics in kidney and meat by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 25 (2008) 1509-1519.

Ji S, Zhang F, Luo X, Yang B, Jin G, Yan J, Liang X. Synthesis of molecularly imprinted polymer sorbents and application for the determination of aminoglycoside antibiotics in honey. *J Chromatogr A* 1313 (2013) 113-118.

Kaale E, Leonard S, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J. Capillary Electrophoresis analysis of gentamicin sulphate with UV detection after pre-capillary derivatization with 1,2-phthalic dicarboxaldehyde and mercaptoacetic acid. *J Chromatogr A* 895 (2000) 67-79.

Kaale E, Van Schepdael A, Roets E, Hoogmartens J. Development and validation of capillary electrophoresis method for tobramycin with precapillary derivatization and UV detection. *Electrophoresis* 23 (2002) 1695-1701.

Kane R S, Glink P T, Chapman R G, McDonald J C, Jensen P K, Gao H, Pasa-Tolic L, Smith R D, Whitesides G M. Basicity of the amino groups of the aminoglycoside amikacin using capillary electrophoresis and coupled CE-MS-MS techniques. *Anal Chem* 73 (2001) 4028-4036.

Kaufmann A, Butcher P. Quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of chloramphenicol residues in food using sub-2 μm particulate high-performance liquid chromatography columns for sensitivity and speed. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 3694-3700.

Kaufmann A, Butcher P, Maden K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Anal Chim Acta* 711 (2011) 46-53.

Kaufmann A, Butcher P, Maden K. Determination of aminoglycoside residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry in a variety of matrices. *Anal Chim Acta* 711 (2012) 46-53.

Kaul M, Barbieri C M, Srinivasan A R, Pilch D S. Molecular determinants of antibiotic recognition and resistance by aminoglycoside phosphotransferase (3')-IIIa: a calorimetric and mutational analysis. *J Mol Biol* 369 (2007) 142-156.

Kind T, Fiehn O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 8 (2007) 105.

Kinsella B, O'Mahony J, Malone E, Moloney M, Cantwell H, Furey A, Danaher M. Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 7977-8015.

Kools S A, Boxall A B A, Moltmann J F, Bryning G, Koschorreck J, Knacker T. A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. *Int Environ Toxicol Chem* 4 (2008) 399-408.

Kotretsou S I. Determination of aminoglycosides and quinolones in food using tandem mass spectrometry: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 44 (2004) 173-184.

Kowalski P, Oledzku I, Okomewski P, Switala M, Lamparczyk H. Determination of streptomycin in eggs yolk by capillary electrophoresis. *Chromatographia* 50 (1999) 101-104.

Kowalski P. Capillary electrophoretic determination of thiamphenicol in turkeys serum and its pharmacokinetic application. *J Pharm Biomed An* 43 (2007) 222-227.

Kowalski P, Plenis A, Oledzka I. Optimization and validation of capillary electrophoretic method for the analysis of amphenicols in poultry tissues. *A Polon Pharm* 65 (2008) 45-50.

Krivohlavek A, Barusic L, Smit Z, Bosnir J, Puntaric D. HPLC-MS analysis of chloramphenicol residues in milk and powdered milk products. *Kem Ind* 56 (2007) 53-56.

Kumar P, Rúbies A, Companyó R, Centrich F. Hydrophilic interaction chromatography for the analysis of aminoglycosides. *J Sep Sci* 35 (2011) 498-504.

Kumar P, Rúbies A, Companyó R, Centrich F. Determination of aminoglycoside residues in kidney and honey samples by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 35 (2012) 2710-2717.

Lämmerhofer M, Richter M, Wu J, Nogueira R, Bicker W, Lindner W. Mixed-mode ion-exchangers and their comparative chromatographic characterization in reversed-phase and hydrophilic interaction chromatography elution modes. *J Sep Sci* 31 (2008) 2562-2588.

Lee S K, Kim H J, Jin C, Lee J. Formation of the unusual $[M+H-11 Da]^+$ ion peak in the collision induced dissociation mass spectrum of $[M+H]^+$ ion of hydrochlorothiazide. *J Mass Spectrom* 44 (2009) 1538-1541.

Lehotay S J, Mastovska K, Lightfield A R, Nunez A, Dutko T, Ng C, Bluhm L. Rapid analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine tissues using disposable pipette extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1313 (2013) 103-112.

León N, Roca M, Igualada C, Martins C P B, Pastor A, Yusá V. Wide-range screening of banned veterinary drugs in urine by ultra high liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1258 (2012) 55-65.

Levi R, McNiven S, Piletsky S A, Cheong S H, Yano K, Karube I. Optical detection of chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Anal Chemistry* 69 (1997) 2017-2021.

Li T L, Chung-Wang Y J, Shih Y C. Determination and confirmation of Chloramphenicol residues in swine muscle and liver. *J Food Sci* 67 (2002) 21-28.

Liao C, Wong J W, Zhang K, Yang P, Wittenberg J B, Trucksess M W, Hayward D G, Lee N S, Chang J S. Multi-mycotoxin Analysis of Finished Grain and Nut Products Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Positive Electrospray Ionization-Quadrupole Orbital Ion Trap High-Resolution Mass Spectrometry. *J Agr Food Chem* (in press) DOI: 10.1021/jf505049a

Lin Y, Wang Y, Chang S Y. Capillary electrophoresis of aminoglycosides with argon-ion laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1188 (2008) 331-333.

Liu W L, Lee R J, Lee M R. Supercritical fluid extraction *in situ* derivatization for simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol and thiamphenicol in shrimp. *Food Chem* 121 (2010) 797-802.

Lopez M I, Pettis J S, Smith I B, Chu P. Multiclass determination and confirmation of antibiotic residues in honey using LC-MS/MS. *J Agric Food Chem* 56 (2008) 1553-1559.

López-Novoa J M, Quirós Y, Vicente L, Morales A I, López-Hernández F J. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int* 79 (2011) 33-45.

Lu C, Feng C. On-line concentration of neomycin and screening aminoglycosides in milk by short capillary column and tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 29 (2006) 2143-2148.

Lu Y, Shen Q, Dai Z, Zhang H. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the ultra-fast determination of chloramphenicol in egg, honey, and milk by fused-core C18-based high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 398 (2010) 1819-1826.

Luo P, Chen X, Liang C, Kuang H, Lu L, Jiang Z, Wang Z, Li C, Zhang S, Shen J. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in swine muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with immunoaffinity chromatography clean-up. *J Chromatogr B* 878 (2010) 207-212.

Majors R E. QuEChERS - a new sample preparation technique for multiresidue analysis of pesticides in food and agricultural samples. *LCGC North America* 25 (2007) 436-446.

Makarov A. Electrostatic axially harmonic orbital trapping: a high-performance technique of mass analysis. *Anal Chem* 72 (2000) 1156-1162.

Mamani M C, Reyes F G, Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem* 117 (2009) 545-552.

Marchi I, Rudaz S, Veuthey J L. Atmospheric pressure photoionization for coupling liquid-chromatography to mass spectrometry: a review. *Talanta* 78 (2009) 1-18.

Marshall A G, Hendrickson C L. High-resolution mass spectrometers. *Annu Rev Anal Chem* 1 (2008) 579-599.

Martos P A, Jayasundara F, Dolbeer J, Jin W, Spilsbury L, Mitchell M, Varilla C, Shurmer B. Multiclass, multiresidue drug analysis, including aminoglycosides, in animal tissue using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 58 (2010) 5932-5944.

Mashat M, Chrystyn H, Clark B J, Assi K H. Development and validation of HPLC method for the determination of tobramycin in urine samples post-inhalation using pre-column derivatisation with fluorescein isothiocyanate. *J Chromatogr B* 869 (2008) 59-66.

Mayhew J W, Gorbach S L. Gas-liquid chromatographic method for the assay of aminoglycoside antibiotics in serum. *J Chromatogr* 151 (1978) 133-146.

McCalley D V. Study of the selectivity, retention mechanisms and performance of alternative silica-based stationary phases for separation of ionised solutes in hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* 1217 (2010) 3408-3417.

McGlinchey T A, Rafter P A, Regan F, McMahon G P. A review of analytical methods for the determination of aminoglycoside and macrolide residues in food matrices. *Anal Chim Acta* 624 (2008) 1-15.

Mohamed R, Richoz-Payot J, Gremaud E, Mottier P, Yllmaz E, Tabet J, Guy P A. Advantages of Molecularly Imprinted Polymers LC-ESI-MS/MS for the Selective Extraction and Quantification of Chloramphenicol in Milk-Based Matrixes. Comparison with a Classical Sample Preparation. *Anal Chem* 79 (2007) 9557-9565.

Monge M E, Harris G A, Dwivedi P, Fernández F M. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. *Chem Rev* 113 (2013) 2269-2308.

Mottier P, Parisod V, Gremaud E, Guy P A, Stadler R H. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 994 (2003) 75-84.

Nagata T, Oka H. Detection of Residual Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Yellowtail Fish Muscles by Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* 44 (1996) 1280-1284.

Neta P, Farahani M, Simón-Manso Y, Liang Y, Yang X, Stein S E. Unexpected peaks in tandem mass spectra due to reaction of product ions with residual water in mass spectrometer collision cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* 28 (2014) 2645-2660.

Nicolich R S, Werneck-Barroso E, Sípoli-Marques M A. Food safety evaluation: detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 565 (2006) 97-102.

Nikolaev E N, Boldin I A, Jertz R, Baykut G. Initial experimental characterization of a new ultra-high resolution FTICR cell with dynamic harmonization. *J Am Soc Mass Spectrom* 22 (2011) 1125-1133.

Odell J A. How an aspirin, a throat swab from a chicken, and four guinea pigs changed thoracic surgery. *Ann Thorac Surg* 93 (2012) 1753-1760.

Oertel R, Renner U, Kirch W. Determination of neomycin by LC-tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography. *J Pharm Biomed An* 35 (2004a) 633-638.

Oertel R, Neumeister V, Kirch W. Hydrophilic interaction chromatography combined with tandem-mass spectrometry to determine six aminoglycosides in serum. *J Chromatogr A* 1058 (2004b) 197-201.

Ortelli D, Edder P, Corvi C. Analysis of chloramphenicol residues in honey by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatographia* 59 (2004) 61-64.

Ozcan N, Aycan O. Determination of chloramphenicol in honey, milk, and egg by liquid chromatography/mass spectrometry: single-laboratory validation. *J AOAC Int* 96 (2013) 1158-1163.

Pagkalis S, Mantadakis E, Mavros M N, Ammari C, Falagas M E. Pharmacological considerations for the proper clinical use of aminoglycosides. *Drugs* 71 (2011) 2277-2294.

Pan C, Zhang H, Chen A, Xu Y, Jiang S. Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chromatography-mass spectrometry after use of QuEChERS clean-up. *Acta Chromatogr* 17 (2006) 320-327.

Park J W, Park S R, Han A R, Ban Y H, Yoo Y J, Kim E J, Yoon Y J. The nebramycin aminoglycoside profiles of *Streptomyces tenebrarius* and their characterization using an integrated liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometric analysis. *Anal Chim Acta* 661 (2010) 76-84.

Peters R J B, Bolck Y J C, Rutgers P, Stolker A A M, Nielen M W F. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 8206-8216.

Pfenning A P, Madson M R, Roybal J E, Turnipseed S B, Gonzales S A, Hurlbut J A, Salmon, G D. Simultaneous determination of chloramphenicol, florfenicol, and thiamphenicol residues in milk by gas chromatography with electron capture detection. *J AOAC Int* 81 (1998) 714-720.

Pfenning A P, Roybal J E, Rupp H S, Turnipseed S B, Gonzales S A, Hurlbut J A. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine, and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection. *J AOAC Int* 83 (2000) 26-30.

Piddock, L J V. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *J Antimicrob Chemother* 38 (1996) 1-3.

Plumb D C. *Veterinary Drug Handbook*. Iowa State Press (2002) 166-169.

Polzer J, Hackenberg R, Stachel C, Gowik P. Determination of chloramphenicol residues in crustaceans: preparation and evaluation of a proficiency test in Germany. *Food Addit Contam* 23 (2006) 1132-1140.

Preu M, Guyot D, Petz M. Development of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimization of the derivatisation reactions. *J Chromatogr A* 818 (1998) 95-108.

Pyun C, Abd El-Aty A M, Hashim M M M, Shim J, Lee S, Choi K, Park K, Shin H, Lee C. Monitoring of streptomycin and dihydrostreptomycin residual levels in porcine meat press juice and muscle via solid-phase fluorescence immunoassay and confirmatory analysis by liquid chromatography after post-column derivatization. *Biomed Chromatogr* 22 (2008) 254-259.

Quiang Z, Adams C. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics. *Water Res* 38 (2004) 2874-2890.

Ramos M, Muñoz P, Aranda A, Rodríguez I, Díaz R, Blanca J. Determination of chloramphenicol residues in shrimps by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 791 (2003) 31-38.

Rappeport J M, Bunn H P. Bone marrow failure: aplastic anaemia and other primary bone marrow disorders. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill (1994) 1754-1756.

RD 280/1994 of 18 february 1994 concerning maximum residue limits for plaguicides, Spanish Government, *Boletín Oficial del Estado* 58, 7723-7726.

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.

Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 february 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin. *Off J Eur Commun* L70, 1-47.

Regulation (EC) No 470/2009 of the European Parliament and of the Council of 6 May 2009 laying down Community procedures for the establishment of residue limits of pharmacologically active substances in foodstuffs of animal origin, repealing Council Regulation (EEC) No 2377/90 and amending Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council and Regulation (EC) No 726/2004 of the European Parliament and of the Council. *Off J Eur Commun* L152, 11-22.

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

Rejtharová M, Rejthar L. Determination of chloramphenicol in urine, feed water, milk and honey samples using molecular imprinted polymer clean-up. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 8246-8253.

Rezende D R, Fleury Filho N, Rocha G L. Simultaneous determination of chloramphenicol and florfenicol in liquid milk, milk powder and bovine muscle by LC-MS/MS. *Food Addit Contam* 29 (2012) 559-570.

Robb D B, Covey T R, Bruins A P. Atmospheric pressure photoionization: an ionization method for liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 2000 (72) 3653-3659.

Robb D B, Blades M W. State-of-the-art in atmospheric pressure photoionization for LC/MS. *Anal Chim Acta* 627 (2008) 34-49.

Robert C, Gillard N, Brasseur P Y, Pierret G, Ralet N, Dubois M, Delahaut P. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Addit Contam* 30 (2013) 443-457.

Rocha-Siqueira S R R, Donato J L, de Nucci G, Reyes F G. A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine and bovine using LC-ESI-MS/MS. *J Sep Sci* 32 (2009) 4012-4019.

Rodziewicz L, Zawadzka I. Rapid determination of chloramphenicol residues in milk powder by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta* 75 (2008) 846-850.

Róna K, Klausz G, Keller E, Szakay M, Laczay P, Shem-Tov M, Szélely-Körmöczy P. Determination of paromomycin residues in turkey tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877 (2009) 3792-3798.

Ronning H T, Einarsen K, Asp T N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. *J Chromatogr A* 1118 (2006) 226-233.

Sadeghi S, Jahani M. Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer sorbent for the analysis of florfenicol in food samples. *Food Chem* 141 (2013) 1242-1251.

Sanchez A C, Friedlander G, Fekete S, Anspach J, Guillarme D, Chitty M, Farkas T. Pushing the performance limits of reversed-phase ultra high performance liquid chromatography with 1.3 μm core-shell particles. *J Chromatogr A* 1311 (2013) 90-97.

Sánchez-Brunete C, Albero B, Miguel E, Tadeo J L. Rapid method for determination of chloramphenicol residues in honey using gas chromatography-mass spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 75 (2005) 459-465.

Santos L, Barbosa J, Castilho C, Ramos F, Ribeiro C A F, da Silveira M I N. Determination of chloramphenicol residues in rainbow trouts by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 529 (2005) 249-256.

Santos L, Ramos F. Analytical methodologies for chloramphenicol residues determination in food matrixes: a brief review. *Curr Pharm Anal* 2 (2006) 53-57.

Santos S M, Henriques M, Duarte A C, Esteves V I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta* 71 (2007) 731-737.

Schirmer C, Meisel H. Molecularly imprinted polymers for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol. *Anal Bioanal Chem* 392 (2008) 223-229.

Serra-Bonvehí J, Lacalle-Gutiérrez A. Residues of antibiotics and sulfonamides in honeys from Basque Country (NE Spain). *J Sci Food Agric* 89 (2009) 63-72

Serrano J M, Silva M. Trace analysis of aminoglycoside antibiotics in bovine milk by MEKC with LIF detection. *Electrophoresis* 27 (2006) 4703-4710.

Shen H Y, Jiang H L. Screening, determination and confirmation of chloramphenicol in seafood, meat and honey using ELISA, HPLC-UVD, GC-ECD, GC-MS-EI-SIM and GCMS-NCI-SIM methods. *Anal Chim Acta* 535 (2005) 33-41.

Shen J, Xia X, Jiang H, Li C, Li J, Li X, Ding S. Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol, and florfenicol amine in poultry and porcine muscle and liver by gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B* 877 (2009) 1523-1529.

Sheridan R, Policastro B, Thomas S, Rice D. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis. *J Agric Food Chem* 56 (2008) 3509-3516.

Shi X, Wu A, Zheng S, Li R, Zhang D. Molecularly imprinted polymer microspheres for solid-phase extraction of chloramphenicol residues in foods. *J Chromatogr B* 850 (2007) 24-30.

Shi X, Song S, Sun A, Liu J, Li D, Chen J. Characterisation and application of molecularly imprinted polymers for group-selective recognition of antibiotics in food samples. *Analyst* 137 (2012) 3381-3389.

Short L C, Syage J A. Electrospray photoionization (ESPI) liquid chromatography/mass spectrometry for the simultaneous analysis of cyclodextrin and pharmaceuticals and their binding interactions. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22 (2008) 541-548.

Sleno L. The use of mass defect in modern mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 47 (2012) 226-236.

Smith S, Giesecker C, Reimschuessel R, Decker C, Carson M C. Simultaneous screening and confirmation of multiple classes of drug residues in fish by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216 (2009) 8224-8232.

Sniegocki T, Posyniak A, Gbylik-Sikorska M, Zmudzki J. Determination of chloramphenicol in milk using a QuEChERS-based on liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal letters* 47 (2014) 568-578.

Somella E, Pepe G, Ventre G, Pagano F, Manfra M, Pierri G, Ismail O, Ciogli A, Campiglia P. Evaluation of two sub-2 μm stationary phases, core-shell and totally porous monodisperse, in the second dimension of on-line comprehensive two dimensional liquid chromatography, a case study: Separation of milk peptides after expiration date. *J Chromatogr A* 1375 (2015) 54-61.

Springer V H, Lista A G. Micellar nanotubes dispersed electrokinetic chromatography for the simultaneous determination of antibiotics in bovine milk. *Electrophoresis* 33 (2012) 2049-2055.

Stead D A. Current methodologies for the analysis of aminoglycosides. *J Chromatogr B* 747 (2000) 69-93.

Stolker A A M, Brinkman U A T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals - a review. *J Chromatogr A* 1067 (2005) 15-53.

Suhren G, Knappstein K. Detection of incurred dihydrostreptomycin residues in milk by liquid chromatography and preliminary confirmation methods. *Analyst* 123 (1998) 2797-2801.

Sutter V L, Finegold S M. Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 10 (1976) 736-752.

Syriopoulou V P, Harding A L, Goldmann D A, Smith A L. In vitro antibacterial activity of fluorinated analogs of chloramphenicol and thiamphenicol. *Antimicrob Agents Chemother* 19 (1981) 294-297.

Tajik H, Malekinejad H, Razavi-Rouhani S M, Pajouhi M R, Mahmoudi R, Haghazari A. Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food Chem Toxicol* 48 (2010) 2464-2468.

Taka T, Baras M C, Chaudhry Bet Z F. Validation of a rapid and sensitive routine method for determination of chloramphenicol in honey by LC-MS/MS. *Food Addit Contam* 29 (2012) 596-601.

Takáts Z, Wiseman J M, Gologan B, Cooks R G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. *Science* 306 (2004) 471-473.

Takino M, Daishima S, Nakahara T. Determination of chloramphenicol residues in fish meats by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1011 (2003) 67-75.

Tao Y, Chen D, Yu H, Huang L, Liu Z, Cao X, Yan C, Pan Y, Liu Z, Yuan Z. Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 135 (2012) 676-683.

Tao Y, Zhu F, Chen D, Wei H, Pan Y, Wang X, Liu Z, Huang L, Wang Y, Yuan Z. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-fenicol's determination in shrimp and fish by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chem* 150 (2014) 500-506.

Tian H. Determination of chloramphenicol, enrofloxacin and 29 pesticides residues in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 83 (2011) 349-355.

Tittlemier S A, Van de Riet J, Burns G, Potter R, Murphy C, Rourke W, Pearce H, Dufresne G. Analysis of veterinary drug residues in fish and shrimp composites collected during the Canadian Total Diet Study, 1993-2004. *Food Addit Contam* 24 (2007) 14-20.

Toribio F, Moyano E, Puignou L, Galceran M T. Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser. *J Mass Spectrom* 37 (2002) 812-828.

Torres-Ruiz N M, Granados O, Meza G. Aminoglycosides: therapeutics, ototoxicity and hypersensitivity of mitochondrial genetic origin. *Proc West Pharmacol Soc* 54 (2011) 48-50.

Turnipseed S B, Roybal J E, Pfenning A P, Kijak P J. Use of ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry to screen and confirm drug residues in aquacultured products. *Anal Chim Acta* 483 (2003) 373-386.

Turnipseed S B, Clark S B, Storey J M, Carr J R. Analysis of veterinary drug residues in frog legs and other aquacultured species using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 60 (2012) 4430-4439.

Turnipseed S B, Lohne J J, Storey J M, Andersen W C, Young S L, Carr J R, Madson M R. Challenges in implementing a screening method for veterinary drugs in milk using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 62 (2014) 3660-3674.

Tuytten R, Lemière F, Van Dongen W, Esmans E L, Witters E, Herrebout W, Van Der Veken B, Dudley E, Newton R P. Intriguing mass spectrometric behavior of guanosine under low energy collision-induced dissociation: H₂O adduct formation and gas-phase reactions in the collision cell. *J Am Soc Mass Spectrom* 16 (2005) 1291-1304.

Tyagi A, Vernekar P, Karunasagar I, Karunasagar I. Determination of chloramphenicol in shrimp by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS-MS). *Food Addit Contam* 25 (2008) 432-437.

Van Beers D, Schoutens E, Vanderlinden M P, Yourassowsky E. Comparative in vitro activity of chloramphenicol and thiamphenicol on common aerobic and anaerobic Gram-negative basilli (Salmonella and Shigella excluded). *Chemother* 21 (1975) 73-81.

Van Bruijnsvoort M, Ottink S J M, Jonker K M, de Boer E. Determination of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk and honey by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1058 (2004) 137-142.

Van de Riet J M, Potter R A, Christie-Fougere M, Burns B G. Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in farmed aquatic species by liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int* 86 (2003) 510-514.

Vera-Candiotti L, Olivieri A C, Goicoechea H C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta* 82 (2010) 213-221.

Verzegnassi L, Royer D, Mottier P, Stadler R H. Analysis of chloramphenicol in honeys of different geographical origin by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Addit Contam* 20 (2003) 335-342.

Vinci F, Guadagnuolo G, Danese V, Salini M, Serpe L, Gallo P. In-house validation of a liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method for confirmation of chloramphenicol residues in muscle according to Decision 2002/657/EC. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 3349-3355.

Vivekanandan K, Swamy M G, Prasad S, Mukherjee R. A simple method of isolation of chloramphenicol in honey and its estimation by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19 (2005) 3025-3030.

Wang L, Li Y Q. Simultaneous determination of ten antibiotic residues in milk by UPLC. *Chromatographia* 70 (2009) 253-258.

Wang L, Peng J. LC analysis of kanamycin in human plasma, by fluorescence detection of the 9-fluorenylmethyl chloroformate derivative. *Chromatographia* 69 (2009) 519-522.

Wang Z, Wu C, Wang G, Zhang Q, Zhang J. Novel strategy for the determination of illegal adulterants in health foods and herbal medicines using high-performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry. *J Sep Sci* 38 (2015) 925-935.

WHOCC, WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, Guidelines for ATCvet classification 2015. Oslo, 2015.

Winstanley T G, Hastings J G M. Penicillin-aminoglycoside synergy and post-antibiotic effect for enterococci. *J Antimicrob Chemother* 23 (1989) 189-199.

Wongtavatchai J, McLean J G, Ramos F, Arnold D. Chloramphenicol. *WHO Food Addit Ser* 53 (2005) 7-84.

Worthington P A. Antibiotics with antifungal and antibacterial activity against plant diseases. *Nat Products Reports* 5 (1988) 47-66.

Wu J, Chen L, Mao P, Lu Y, Wang H. Determination of chloramphenicol in aquatic products by graphene-based SPE coupled with HPLC-MS/MS. *J Sep Sci* 35 (2012) 3586-3592.

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.

Yamada R, Kozono M, Ohmori T, Morimatsu F, Kitayama M. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Biosci Biotechnol Biochem* 70 (2006) 54-65.

Yang X, Zhang S, Yu W, Liu Z, Lei L, Li N, Zhang H, Yu Y. Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography. *Talanta* 124 (2014) 1-6.

Yu C, He Y, Fu G, Xie H, Gan W. Determination of kanamycin A, amikacin and tobramycin residues in milk by capillary zone electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection. *J Chromatogr B* 877 (2009) 333-338.

Yunis A A, Manyan D R, Arimura G K. Comparative effect of chloramphenicol and thiamphenicol on DNA and mitochondrial protein synthesis in mammalian cells. *J Lab Clin Med* 81 (1973) 713-718.

Zhan J, Zhong Y Y, Yun X, Peng J, Chen S, Yin J, Zhang J, Zhu Y. Multi-class method for determination of veterinary drug residues and other contaminants in infant formula by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chem* 138 (2013a) 827-834.

Zhan J, Xu D, Wang S, Sun J, Xu Y, Ni M, Yin J, Chen J, Yu X, Huang Z. Comprehensive screening for multi-class veterinary drug residues and other contaminants in muscle using column-switching UPLC-MS/MS. *Food Addit Contam* 30 (2013b) 1888-1899.

Zhang Q, Peng T, Chen D, Xie J, Wang X, Wang G, Nie C. Determination of chloramphenicol residues in aquatic products using immunoaffinity column cleanup and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J AOAC Int* 96 (2013) 897-901.

Zhang S, Fengyun S, Jiancheng L, Cheng L, Shen J. Simultaneous determination of florfenicol and florfenicol amine in fish, shrimp, and swine muscle by gas chromatography with a microcell electron capture detector. *J AOAC Int* 89 (2006) 1437-1441.

Zhang W. Fluorocarbon stationary phases for liquid chromatography applications. *J Fluor Chem* 129 (2008) 910-919.

Zhang S, Liu Z, Guo X, Cheng L, Wang Z, Shen J. Simultaneous determination and confirmation of chloramphenicol, thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in chicken muscle by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 875 (2008) 399-404.

Zhou Y X, Yang W J, Zhang L Y, Wang Z Y. Determination of kanamycin A in animal feeds by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *J Liq Chromatogr & Rel Technol* 30 (2007) 1603-1615.

Zhou Y, Wang Y, Wang R, Guo F, Yan C. Two-dimensional liquid chromatography coupled with mass spectrometry for the analysis of *Lobelia chinensis* Lour. using an ESI/APCI multimode ion source. *J Sep Sci* 31 (2008) 2388-2394.

Zhu W, Yang J, Wei W, Liu Y, Zhang S. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps. *J Chromatogr A* 1207 (2008) 29-37.

Zhuang Y, Cai L, Cao G. Determination of chloramphenicol by voltammetric method. *J Electrochem Soc* 161 (2014) H129-H132.

Zou Y, Zhao J, Zhang J, Wang G, Tang B, Li X, Zhang L. Matrix effects in the simultaneous determination of phenicol antibiotics in swine muscle and casings by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Methods* 5 (2013) 5662-5668.