



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

Manual de procedimientos operativos normalizados para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios



Joint FAO/IAEA Programme
Nuclear Techniques in Food and Agriculture

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
OPERATIVOS NORMALIZADOS
PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS
DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
OPERATIVOS NORMALIZADOS
PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS
DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

DERECHOS DE AUTOR

Todas las publicaciones científicas y técnicas del OIEA están protegidas en virtud de la Convención Universal sobre Derecho de Autor aprobada en 1952 (Berna) y revisada en 1972 (París). Desde entonces, la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (Ginebra) ha ampliado la cobertura de los derechos de autor que ahora incluyen la propiedad intelectual de obras electrónicas y virtuales. Para la utilización de textos completos, o parte de ellos, que figuren en publicaciones del OIEA, impresas o en formato electrónico, deberá obtenerse la correspondiente autorización, y por lo general dicha utilización estará sujeta a un acuerdo de pago de regalías. Se aceptan propuestas relativas a reproducción y traducción sin fines comerciales, que se examinarán individualmente. Las solicitudes de información deben dirigirse a la Sección Editorial del OIEA:

Dependencia de Mercadotecnia y Venta
Sección Editorial
Organismo Internacional de Energía Atómica
Vienna International Centre
PO Box 100
1400 Viena (Austria)
fax: +43 1 2600 29302
tel.: +43 1 2600 22417
correo electrónico: sales.publications@iaea.org
<http://www.iaea.org/books>

Para obtener más información sobre esta publicación, sírvase dirigirse a:

Sección de Protección de los Alimentos y del Medio Ambiente
Organismo Internacional de Energía Atómica
Vienna International Centre
PO Box 100
1400 Viena (Austria)
Correo electrónico: Official.Mail@iaea.org

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS NORMALIZADOS
PARA EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE
MEDICAMENTOS VETERINARIOS

OIEA, VIENA, 2017

IAEA-TCS-63

ISSN 2520-2081

© OIEA, 2017

Impreso por el OIEA en Austria

Febrero de 2017

PREFACIO

Los laboratorios son esenciales para los programas nacionales de vigilancia de residuos de medicamentos veterinarios. Sin embargo, uno de los principales problemas con que se encuentran es acceder a métodos de análisis adecuados. Por ello, la División Mixta FAO/OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura, además de ofrecer capacitación y asesoramiento técnico y facilitar la transferencia de tecnología, ha decidido elaborar manuales claros y prácticos con el fin de prestar apoyo a los laboratorios de los Estados Miembros.

En el marco del proyecto coordinado de investigación sobre desarrollo de métodos radiométricos y métodos analíticos conexos para reforzar los programas nacionales de control de residuos de medicamentos veterinarios antibióticos y antihelmínticos se ha elaborado un conjunto de métodos analíticos en forma de procedimientos operativos normalizados, que ahora se recopilan. Esta publicación contiene procedimientos operativos normalizados de técnicas de cromatografía y espectrometría, así como de radioinmunoensayo y de cribado conexas, para la realización de diversos tipos de análisis de residuos de medicamentos veterinarios antimicrobianos y antihelmínticos. También se incluyen algunos protocolos de validación de los métodos analíticos.

Esta publicación se dirige principalmente a los laboratorios de seguridad alimentaria y ambiental que realizan ensayos de residuos de medicamentos veterinarios, en particular en el marco de programas nacionales organizados de vigilancia de residuos. Se espera que permita mejorar la capacidad y la competencia de los laboratorios mediante el uso de herramientas y técnicas radiométricas y técnicas complementarias. La publicación también es de interés para la investigación aplicada sobre residuos de medicamentos veterinarios en muestras de alimentos y ambientales.

En la elaboración de los procedimientos operativos normalizados que figuran en esta publicación han intervenido 17 organizaciones de investigación colaboradoras de 15 Estados Miembros del OIEA y de la FAO que participaron en el proyecto coordinado de investigación. El oficial del OIEA responsable de esta publicación fue J. J. Sasanya, de la División Mixta FAO/OIEA de Técnicas Nucleares en la Alimentación y la Agricultura.

NOTA EDITORIAL

Esta publicación se ha preparado a partir del material original aportado por los colaboradores y no ha sido editada por el personal de los servicios editoriales del OIEA. Las opiniones expresadas son las de los colaboradores y no reflejan necesariamente las del OIEA o las de los Gobiernos de sus Estados Miembros.

Ni el OIEA ni sus Estados Miembros asumen responsabilidad alguna por las consecuencias que puedan derivarse del uso de esta publicación. Esta publicación no aborda cuestiones de responsabilidad, jurídica o de otra índole, por actos u omisiones por parte de persona alguna.

El uso de determinadas denominaciones de países o territorios no implica juicio alguno por parte de la entidad editora, el OIEA, sobre la situación jurídica de esos países o territorios, sus autoridades e instituciones o la delimitación de sus fronteras.

La mención de nombres de empresas o productos específicos (se indiquen o no como registrados) no implica ninguna intención de violar derechos de propiedad ni debe interpretarse como una aprobación o recomendación por parte del OIEA.

El OIEA no es responsable de la continuidad o exactitud de las URL de los sitios web externos o de terceros en Internet a que se hace referencia en esta publicación y no garantiza que el contenido de dichos sitios web sea o siga siendo preciso o adecuado.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	ANTECEDENTES	1
1.2.	OBJETIVO	1
1.3.	ALCANCE	1
1.4.	ESTRUCTURA	1
2.	DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENZIMIDAZOL Y AVERMECTINA EN LECHE BOVINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM.....	2
2.1.	PRINCIPIO.....	2
2.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	2
2.3.	MATERIALES	2
2.3.1.	Patrones y soluciones madre.....	2
2.3.2.	Equipo.....	3
2.4.	PROCEDIMIENTO.....	3
2.4.1.	Extracción de la muestra.....	3
2.4.2.	Calibración de patrones ajustados por matrices.....	4
2.4.3.	Condiciones cromatográficas.....	4
a)	Idoneidad del sistema.....	4
b)	Condiciones instrumentales	4
2.4.4.	Espectrometría de masas.....	5
3.	DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENZIMIDAZOLES Y DE AVERMECTINAS EN LECHE BOVINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA	6
3.1.	PRINCIPIO.....	6
3.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	6
3.3.	MATERIALES	6
3.3.1.	Patrones y soluciones.....	6
a)	Soluciones patrón madre (2000 µg/ml).....	6
b)	Soluciones patrón mezcladas (50 µg/ml).....	6
c)	Soluciones patrón mezcladas (250 ng/ml).....	6
d)	Soluciones patrón de trabajo.....	6
e)	Muestras enriquecidas.....	7
3.3.2.	Equipo	7
3.4.	PROCEDIMIENTO.....	7
3.4.1.	Extracción de la muestra.....	7
3.4.2.	Derivatización.....	7
3.4.3.	Condiciones cromatográficas.....	8
a)	Idoneidad del sistema y condiciones de los instrumentos	8
4.	DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL EN MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	9
4.1.	PRINCIPIO.....	9
4.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	9
4.3.	MATERIALES	9
4.3.1.	Patrones y soluciones.....	9
4.3.2.	Equipo.....	10

4.4.	PROCEDIMIENTO.....	10
4.5.	CONTROL CRÍTICO	11
4.6.	CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD	11
4.7.	INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN.....	11
4.8.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	12
4.9.	CC ALFA Y CC BETA.....	12
4.10.	RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	12
5.	DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL Y FLORFENICOL AMINA EN EL MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO Y CONFIRMACIÓN POR CL-EM/EM	13
5.1.	PRINCIPIO.....	13
5.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	13
5.3.	MATERIALES	13
5.3.1.	Patrones.....	13
5.3.2.	Reactivos.....	13
5.3.3.	Soluciones patrón.....	13
a)	Solución patrón madre de FFC (SNI) $100.10^3 \mu\text{g/l}$	13
b)	Solución patrón de trabajo de $2,103 \mu\text{g/l}$	14
c)	Tampón PBS $0,1 \text{ mol/l}$; $\text{pH} = 7,4$	14
d)	Tampón PBS + Gelatina $0,01 \text{ mol/l}$; $\text{pH} = 7,4$	14
e)	Cóctel de centelleo	14
f)	Suspensión de carbón.....	14
5.3.4.	Equipo	14
5.4.	PROCEDIMIENTO.....	14
5.5.	CÁLCULOS	16
5.6.	PUNTOS DE CONTROL CRÍTICOS	16
5.7.	INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN.....	16
5.8.	LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN, CC ALFA Y CC BETA.....	16
5.9.	PRUEBA DE CONFIRMACIÓN	16
6.	MÉTODO DE CONFIRMACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE AMINOGLUCÓSIDOS EN MÚSCULO, HÍGADO Y RIÑÓN MEDIANTE CL-ESI-EM/EM.....	18
6.1.	PRINCIPIO.....	18
6.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	18
6.3.	MATERIALES	19
6.3.1.	Muestra de control negativo	19
6.3.2.	Patrón de matriz adicionada previamente a la extracción (matriz pre)	19
6.3.3.	Patrón de matriz adicionada después de la extracción (matriz post)	19
6.3.4.	Blanco de reactivo (o “blanco de procedimiento”).....	19
6.3.5.	Materiales de referencia.....	20
6.3.6.	Solventes.....	20
a)	Solución acuosa de TCA al 5 % (p/v).....	20
b)	HFBA de $0,2 \text{ mol/l}$	20
c)	HFBA de $0,02 \text{ mol/l}$	20
d)	MeCN: $0,15\text{M}$ HFBA (4:1, v/v)	20
e)	Solución acuosa de NaOH de 100 g/l	20

f)	Solución de HCl de 0,2 mol/l.....	20
g)	Solución de NaOH (pH 8,5)	20
h)	Fases móviles	21
6.3.7.	Patrón y soluciones patrón	21
6.3.8.	Equipo	23
6.4.	CONTROL AMBIENTAL	25
6.5.	PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	25
6.6.	CUALIFICACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO	27
6.7.	CÁLCULO DE LOS RESULTADOS	27
7.	MÉTODO DE CL-EM/EM PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENCIMIDAZOL EN PRODUCTOS ANIMALES	31
7.1.	PRINCIPIO	31
7.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	31
7.3.	MATERIALES	31
7.3.1.	Soluciones patrón	31
7.4.	PROCEDIMIENTO	31
7.4.1.	Extracción y limpieza de los tejidos musculares y hepáticos	31
7.4.2.	Extracción y limpieza de muestras de leche	32
7.4.3.	Condiciones de la HPLC	32
7.4.4.	Parámetros de la EM	33
7.4.5.	Evaluación de los resultados	33
A)	DETERMINACIÓN CUALITATIVA	33
B)	DETERMINACIÓN CUANTITATIVA	33
C)	CÁLCULO	33
7.4.6.	Criterios de aceptabilidad	34
8.	DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ALBENDAZOL EN LA CARNE	35
8.1.	PRINCIPIO	35
8.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	35
8.3.	MATERIALES	35
8.3.1.	Equipo	35
8.4.	PROCEDIMIENTO	35
8.4.1.	Preparación/extracción y análisis de la muestra	35
8.4.2.	Evaluación de los resultados	37
9.	MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR SULFONAMIDAS Y TETRACICLINAS EN MUESTRAS AMBIENTALES SÓLIDAS/SEMISÓLIDAS Y ACUOSAS MEDIANTE CL-EM/EM	38
9.1.	PRINCIPIO	38
9.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	38
9.3.	MATERIALES	38
9.3.1.	Patrones/soluciones patrón	38
9.3.2.	Equipo	39
9.4.	PROCEDIMIENTO	39
9.4.1.	Preparación de las muestras	39
9.4.2.	Extracción y concentración	40
9.4.3.	Resumen de la preparación de muestras	40
9.4.4.	Medición	41

9.4.5.	Evaluación de los resultados.....	41
9.4.6.	Criterios de aceptabilidad	42
10.	DETECCIÓN DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL EN CARNE, TRIPA Y HIERBA MEDIANTE ELISA	43
10.1.	PRINCIPIO.....	43
10.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	43
10.3.	MATERIALES	43
10.3.1.	Sustancias químicas/reactivos.....	43
10.3.2.	Equipo	43
10.4.	PROCEDIMIENTO.....	43
10.4.1.	Especificidad y sensibilidad.....	43
10.4.2.	Tratamiento de la muestra.....	44
a)	Muestras de tejido (carne/tripa)	44
b)	Muestra de hierba.....	44
10.4.3.	Preparación de los reactivos del kit de ELISA	44
10.4.4.	Protocolo de ensayo	45
11.	DETECCIÓN DE SULFONAMIDAS EN EL MÚSCULO DE POLLO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA	48
11.1.	PRINCIPIO.....	48
11.2.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	48
11.3.	MATERIALES	48
11.3.1.	Sustancias químicas/reactivos.....	48
11.3.2.	Equipo/material de vidrio	48
11.3.3.	Soluciones	48
11.4.	PROCEDIMIENTO.....	49
11.4.1.	Preparación de la muestra de control	49
11.4.2.	Extracción	49
11.5.	MEDICIÓN	50
11.5.1.	Aplicación de las muestras	50
11.5.2.	Revelado	50
11.5.3.	Derivatización.....	50
11.5.4.	Detección	50
11.5.5.	Cálculos/evaluación.....	50
11.5.6.	Criterios de aceptación.....	51
12.	VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS	52
12.1.	INTRODUCCIÓN.....	52
12.1.1.	Especificidad del método.....	52
12.1.2.	Límite de detección del ensayo.....	52
12.1.3.	Repetibilidad.....	53
12.1.4.	Veracidad y recuperación	54
12.1.5.	Estabilidad del analito.....	54
12.1.6.	Robustez.....	55
12.1.7.	Criterios de aceptabilidad	55

13.	VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS	56
13.1.	ÁMBITO DE APLICACIÓN	56
13.2.	EL PLAN DE VALIDACIÓN	56
13.3.	VALIDACIÓN POR MATRIZ Y ESPECIE	56
	13.3.1. Especificidad/selectividad	57
	13.3.2. CC α de sustancias prohibidas	57
	13.3.3. CC α de sustancias sujetas a un límite máximo permitido	58
	13.3.4. CC β eta de sustancias prohibidas.....	58
	13.3.5. CC β eta de sustancias sujetas a un límite máximo permitido.....	58
	13.3.6. Estabilidad del analito en la solución	58
	13.3.7. Estabilidad del analito en la matriz.....	59
	13.3.8. Estabilidad del analito en el extracto	59
13.4.	CURVA DE CALIBRACIÓN.....	59
13.5.	REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO	59
13.6.	VARIACIÓN ENTRE ENSAYOS E INTRAENSAYOS	60
13.7.	RECUPERACIÓN.....	60
13.8.	ROBUSTEZ.....	60
	REFERENCIAS	61
	ABREVIATURAS Y SIGLAS	63
	COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

Este manual es producto del proyecto coordinado de investigación de la División Mixta FAO/OIEA, titulado “Desarrollo de métodos radiométricos y métodos analíticos conexos para reforzar los programas nacionales de control de residuos de medicamentos veterinarios antibióticos y antihelmínticos”, realizado entre 2009 y 2014 para apoyar la vigilancia de determinados residuos de medicamentos veterinarios antibióticos y antihelmínticos presentes en muestras de alimentos y ambientales con el objetivo de salvaguardar la seguridad de los consumidores.

Durante la investigación, se desarrollaron y validaron principalmente métodos de análisis de residuos múltiples, que posteriormente se aplicaron a los programas nacionales de residuos de algunos países. Dado que en la investigación participaron solamente 15 países, se presume que los laboratorios de otros Estados Miembros podrían beneficiarse de los resultados del proyecto mediante la difusión de técnicas transferibles en forma de procedimientos operativos normalizados reunidos en un manual. Si bien en el manual se incluyen diversas técnicas de cribado y confirmatorias, y habida cuenta de la amplitud y diversidad de las necesidades de análisis de todo el mundo, el manual tiene un alcance limitado, basado en las necesidades definidas por los participantes en el proyecto coordinado. No obstante, esas necesidades son comunes a muchos Estados Miembros, y se confía en que el manual resulte de utilidad para muchos laboratorios de ensayo.

1.2. OBJETIVO

El propósito de este manual es ayudar a los laboratorios de ensayo de alimentos y ambientales principalmente en la vigilancia y el control de rutina de los residuos de algunos medicamentos veterinarios en productos de origen animal, pero también en determinadas muestras ambientales. El manual también puede servir de apoyo a actividades de investigación pertinentes.

1.3. ALCANCE

Este manual consiste en un conjunto de métodos analíticos, en forma de procedimientos operativos normalizados, para el análisis de determinados residuos de medicamentos veterinarios en algunas muestras de productos animales y ambientales. Engloba diversas técnicas de cromatografía/espectrometría y técnicas basadas en anticuerpos, radioinmunoensayo, radioisótopos y la técnica de recuento de centelleo líquido. Estos métodos se elaboraron basándose en algunas de las necesidades y preguntas de investigación planteadas por las 17 instituciones que participaron en el proyecto coordinado de investigación mencionado anteriormente y, por tanto, no abarcan un repertorio muy amplio. La información del manual también se presenta en cierto sentido como guía informativa.

1.4. ESTRUCTURA

La parte preliminar (y más extensa) del manual consiste en procedimientos operativos normalizados de cromatografía y espectrometría para el análisis de residuos de antihelmínticos, como los benzimidazoles y las avermectinas, residuos antimicrobianos, como el cloranfenicol y el florfenicol, las tetraciclinas, los aminoglucósidos, las sulfonamidas y las quinolonas. En la primera parte también se incluye un procedimiento operativo normalizado de una técnica de radioinmunoensayo para residuos de florfenicol y florfenicol amina. El manual concluye con dos protocolos de validación.

2. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENZIMIDAZOL Y AVERMECTINA EN LECHE BOVINA MEDIANTE CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

2.1. PRINCIPIO

Este método se basa en el principio del método rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro (QuEChERS) [1]. Consiste en la extracción de una porción representativa de la muestra con acetonitrilo (MeCN), seguida de desplazamiento salino y extracción por dispersión en fase sólida con una mezcla de sulfato de magnesio (MgSO_4) y material C18. Después de la limpieza, se analiza una alícuota del sobrenadante mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (CL-EM/EM).

2.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método analítico permite determinar los residuos de siete bencimidazoles, a saber, albendazol (ABZ), tiabendazol (TBZ), sulfóxido de albendazol (ABZ-SO), albendazol sulfona (ABZ-SO₂), triclabendazol (TCB), sulfóxido de triclabendazol (TCB-SO) y triclabendazol sulfona (TCB-SO₂), así como de tres avermectinas: abamectina (ABA), emamectina (EMA) e ivermectina (IVE), en la leche bovina a niveles de concentración de 5 ng/g a 500 ng/g.

2.3. MATERIALES

Se precisan los reactivos y sustancias químicas siguientes:

MeCN; metanol (MeOH) de calidad HPLC (cromatografía de líquidos de alto rendimiento); metanol de calidad; adsorbente octadecilsilano C18; cloruro de sodio (NaCl), grado analítico; acetato de amonio, grado analítico; ácido fórmico, grado analítico; adsorbente amina primaria secundaria (PSA); sulfato de magnesio anhidro.

2.3.1. Patrones y soluciones madre

Los patrones analíticos son los siguientes: ABZ, 99,6 % e IVE, 91,0 %, de Farmacopea de los Estados Unidos (USP); TBZ 98,3 %, ABA, 94,4 %, EMA, 96,5 %; ciprodinil, 99,5 %, todos ellos de Chem Service; ABZ-SO, ABZ-SO₂, TCB-SO y TCB-SO₂, todo ello de Witega; TCB, 99,0 % (Dr. Ehrenstorfer); y trifenil fosfato 99,9 % (Supelco/Sigma Aldrich).

Las soluciones (y su forma de preparación) son las siguientes:

a) Soluciones patrón madre (2000 µg/ml)

Se pesan 20 mg de cada patrón analítico, se añaden a un matraz aforado de 10 ml y se completa el volumen con MeOH (para EMA, IVE y ABA), MeCN (para TCB, TCB-SO y TCB-SO₂) o dimetilformamida (para ABZ, ABZ-SO y ABZ-SO₂). Todos los patrones de soluciones madre deben almacenarse a -18 °C.

b) Soluciones patrón intermedias (100 µg/l)

Se transfieren 500 µl de cada patrón de solución madre (2000 µg/l) a un matraz aforado de 10 ml, respectivamente, y se completa el volumen con MeCN.

- c) Soluciones patrón de trabajo (0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml)

Se transfieren respectivamente 10 µl, 100 µl, 200 µl, 500 µl y 1000 µl de las soluciones mezcladas de los patrones (100 µg/ml) a cinco matraces aforados de 10 ml y se completa el volumen con MeCN para obtener soluciones de trabajo mezcladas de los patrones de 0,1 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 5 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente.

- d) Patrón interno: fosfato de trifenilo (TPP) (0,1 µg/ml)

Se utiliza TPP como patrón interno para el modo de iones positivos de la CL-EM/EM. Se prepara pesando 10 mg de TPP, que se añaden a un matraz aforado de 10 ml, y se completa el volumen con MeCN (1000 µg/ml). Se transfieren 10 µl de esta solución a un matraz aforado de 10 ml y se completa el volumen con MeCN.

- e) Patrón interno de ciprodinil (10 µg/ml)

Se utiliza ciprodinil como patrón de control de calidad para supervisar el rendimiento del sistema de CL-EM/EM. Se prepara pesando 10 mg de ciprodinil, que se añaden a un matraz aforado de 10 ml, y se completa el volumen con MeCN (1000 µg/ml). Se transfieren 100 µl de esta solución a un matraz aforado de 10 ml y se completa el volumen con MeCN.

2.3.2. Equipo

Se precisa el equipo siguiente:

Centrífuga refrigerada (Sigma, modelo 4K 15C); mezclador de vórtice, Barnstead Thermolyne (modelo 37600 Mixer); balanza, con una sensibilidad de 0,1 mg; agitador Multi Reax (Heidolph); matraces aforados de clase A (10 ml, 25 ml, de vidrio transparente); tubos de centrífuga de polipropileno (50 ml); sistema de CL-EM/EM (Waters Alliance 2695 acoplado a Quattro Premier XE, Waters Corporation, EE.UU.).

2.4. PROCEDIMIENTO

2.4.1. Extracción de la muestra

Durante la extracción se siguen los pasos siguientes:

- Se pesan 10 g de muestras de leche homogeneizada y se añaden a tubos de centrífuga de etileno propileno fluorado de 50 ml; para el blanco de reactivo se utilizan 10 ml de agua destilada (H₂O).
- Se pesan 20 g de muestras de leche en blanco para la calibración de patrones ajustados por matrices.
- Se pesan 10 g para los picos de control de calidad. Se añaden 100 µl de solución mezclada del patrón (10 µg/ml de los siete benzimidazoles y las tres avermectinas) para obtener 100 ngg⁻¹ de control de calidad; y se deja reposar durante 15 minutos.
- Se añaden 100 µl de solución del patrón interno de TPP (0,1 µg/ml) por cada 10 g (esto da lugar a una concentración equivalente de 1 ng/g) a todos los tubos que contienen la muestra, la mezcla para picos de control de calidad, la matriz en blanco y el blanco de reactivo.
- Se añaden 10 ml de MeCN a cada tubo.

- f) Se añaden 5 g de $\text{MgSO}_4\cdot\text{NaCl}$ [4:1, peso por peso (p/p)] e inmediatamente se agitan los tubos durante 1 minuto y se centrifugan [durante 5 minutos a 3500 revoluciones por minuto (rpm)].
- g) Se transfieren 2 ml del sobrenadante a un tubo de 5 ml que contenga MgSO_4 (300 mg) y 100 mg de C18. Se agita en el vórtice durante 1 minuto y se centrifuga a 3000 rpm durante 2 minutos.
- h) Se transfiere una alícuota del sobrenadante (1 ml) a un vial de cargador de muestras automático que contenga 10 μl de solución de ciprodinil.
- i) Se inyectan 10 μl de la solución final en el sistema de CL-EM/EM.

2.4.2. Calibración de patrones ajustados por matrices

Para preparar la curva patrón ajustada por matrices, se transfiere 1 ml del extracto de la muestra a cada uno de los 5 viales del cargador de muestras automático. Se añaden a cada uno de ellos 25 μl de las soluciones de trabajo del patrón de 0,1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 2 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$ y 10 $\mu\text{g/ml}$, que corresponden a las concentraciones de 5 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$, 250 $\mu\text{g/kg}$ y 500 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente. Se añaden 10 μl de ciprodinil (100 $\mu\text{g/kg}$) a los 5 viales.

2.4.3. Condiciones cromatográficas

a) Idoneidad del sistema

Para evaluar la idoneidad del sistema, se inyectan al menos cinco muestras idénticas de un patrón intermedio utilizado para la curva de calibración. La desviación estándar relativa del pico de respuesta y el tiempo de retención no debe ser superior al 5 %.

b) Condiciones instrumentales

Como se detalla en el cuadro 1, se realiza una separación de fase reversa de los analitos mediante una columna XTerra MS C18 (150 mm x 2,1 mm de diámetro interno, partículas de 5 μm) mantenida a 20 °C.

Las condiciones de la fase móvil final son: A) ácido fórmico acuoso al 0,1 % y B) MeCN como elución en gradiente (0,3 ml/min) con una condición de partida de 98:2 [A:B, volumen por volumen (v/v)], y aumentando la concentración orgánica hasta el 100 % a lo largo de 5 minutos; hay que esperar 10,5 minutos antes de volver a la condición de partida inicial.

Debe equilibrarse el sistema de cromatografía de líquidos durante al menos 30 minutos en las condiciones de fase móvil A:fase móvil B (2 %:98 %, v/v) que figura en el cuadro 2, antes de introducir las muestras.

CUADRO 1. RESUMEN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Columna cromatográfica	Fase reversa C18, 150 mm x 2,1 mm, 3,5 μm
Fase móvil	Fase móvil A: Fase móvil B (2:98, v/v)
Condición del flujo	Gradiente
Velocidad de flujo	0,2 ml/min
Volumen de inyección	10 μl
Temperatura	25 °C

CUADRO 2. GRADIENTE DE LA FASE MÓVIL

Tiempo (min)	A	B	Caudal (ml/min)	Curva
0	2	98	0,30	1
5	100	0	0,30	6
10,00	0,0	100,0	0,30	1
15,00	98	2	0,30	1

2.4.4. Espectrometría de masas

Aquí, los análisis de espectrometría de masas se realizan mediante ionización por electrospray a presión atmosférica en modo positivo (ESI+) a una velocidad de flujo de 0,3 ml/min. Se emplea gas nitrógeno para la desolvatación a 350 °C y argón para la colisión.

La temperatura de la fuente y el voltaje del aerosol de iones deben ajustarse a 120 °C y 650 V, respectivamente. Se utiliza espectrometría en tándem en la monitorización de reacciones múltiples (MRM) con un tiempo de permanencia de 100 a 200 milisegundos (ms) para detectar los analitos. El ajuste de los gases del cono y de desolvatación se establece en 50 l/h y 800 l/h, respectivamente.

La adquisición del espectro de masas se divide en dos periodos de tiempo (de 0 a 7,5 min, y de 6,5 a 14 min). Las condiciones de la espectrometría se optimizan mediante la regulación de los parámetros específicos del analito, la energía de colisión y el potencial de salida de la celda de colisión para cada analito. Para optimizar, se infunde 1 µg/ml de la solución patrón de cada analito y se monitorizan los dos fragmentos de iones más abundantes producidos a partir del ion molecular (cuadro 3).

CUADRO 3. IONES DETECTADOS Y PARÁMETROS OPTIMIZADOS DE LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA CADA ANALITO

Nº	Analito	Transición EM/EM Pico base (1) Segundo pico (2)		Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (eV)	Tiempo de permanencia (s)	Función
1	TBZ	202,1>175,1 (1) 202,1>131,1 (2)		50 50	30 28	0,20	I
2	ABZ	266,2>234,2 (1) 266,2>191,1		40 40	15 30	0,20	I
3	ABZ-SO ₂	298,1>265,9 (2) 298,1>159,1		40 40	28 15	0,20	I
4	ABZ-SO	282,1>239,9 (1) 282,1>208		40 40	28 15	0,20	I
5	TCB	359>274,1 (2) 359>344,1		50 50	25 28	0,20	II
6	TCB-SO ₂	391>242,3 (1)		50	40	0,10	II
7	TCB-SO ₂	375>242,2 (2)		30	45	0,10	II
8	EMA	886,5>158,1 (1) 886,5>126		50 50	30 15	0,10 0,10	I
9	ABA	891>305,1 (2) 891>567,2		50 50	30 12	0,10 0,10	II
10	IVE	892,5>569,2 (1) 892,5>307,1		50 50	30 12	0,10 0,10	II
11	Fosfato de trifenilo	327>77 (2)		25	20	0,20	II
12	Ciprodinil	226>108 (1)		40	25	0,20	II

3. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENZIMIDAZOLES Y DE AVERMECTINAS EN LECHE BOVINA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECTOR DE FLUORESCENCIA

3.1. PRINCIPIO

Este método consiste en la extracción de la muestra con disolventes orgánicos, la limpieza mediante extracción en fase sólida (SPE) y la derivatización antes del análisis mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC).

3.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método analítico permite determinar los residuos de cinco avermectinas [emamectina (EMA), ivermectina (IVE), eprinomectina (EPRI), doramectina (DORA) y abamectina (ABA)] en leche bovina a niveles de concentración de 0,5 ng/g a 100 ng/g.

3.3. MATERIALES

Se requieren los reactivos y sustancias químicas siguientes: MeCN, MeOH y H₂O de calidad HPLC; cartuchos C18 (Sep-Pak®Vac 6 cc, 500 mg); trietilamina $\geq 99\%$; 1-metilimidazol $\geq 99\%$; anhídrido trifluoroacético reactivo plus $\geq 99\%$; ABA, 95 % y EMA, 96 % (Chem Service); IVE, 91,0 % y EPRI, 91 %, USP; DORA, 96 % (Dr. Ehrenstorfer).

3.3.1. Patrones y soluciones

a) Soluciones patrón madre (2000 µg/ml)

- Se pesan 20 mg de cada patrón analítico, se añaden a un matraz aforado de 10 ml y se completa el volumen con MeOH (EMA, IVE, EPRI y DORA) o MeCN (ABA).
- Todos los patrones de soluciones madre deben almacenarse a -20 °C.

b) Soluciones patrón mezcladas (50 µg/ml)

Se transfieren 250 µl de cada patrón de solución madre (2000 µg/ml) a un matraz aforado de 10 ml, respectivamente, y se completa el volumen con MeCN.

c) Soluciones patrón mezcladas (250 ng/ml)

Se transfieren 50 µl de las soluciones mezcladas de los patrones (50 µg/ml) a un matraz aforado de 10 ml, respectivamente, y se completa el volumen con MeCN.

d) Soluciones patrón de trabajo

- Se transfieren respectivamente 5 µl, 10 µl, 50 µl, 100 µl, 300 µl y 600 µl de las soluciones mezcladas de los patrones (250 ng/ml) a seis matraces aforados de 10 ml y se completa el volumen con MeCN para obtener las soluciones de trabajo mezcladas de los patrones de 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 30 ng/ml y 60 ng/ml, respectivamente.
- En el cuadro 4 que figura a continuación se resume el proceso de preparación de las soluciones de los patrones.

CUADRO 4. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES ANALÍTICOS

Nivel	Vol.(μ l) solución mezclada del patrón (250 ng/ml)	Volumen final	Concentración del patrón (ng/ μ l)	Medio de dilución
1	5	2,5	0,5	MeCN
2	10	2,5	1	MeCN
3	50	2,5	5	MeCN
4	100	2,5	10	MeCN
5	300	2,5	30	MeCN
6	600	2,5	60	MeCN

e) Muestras enriquecidas

Se añaden respectivamente 10 μ l, 20 μ l y 500 μ l de las soluciones mezcladas de los patrones a 2,5 g de muestra en un tubo de ensayo y se deja reposar mientras se continúa con el procedimiento de extracción de la muestra.

3.3.2. Equipo

Se necesita el equipo siguiente para el ensayo: centrífuga refrigerada (Sigma, modelo 4K 15C); mezclador de vórtice, Barnstead Thermolyne (modelo 37600 Mixer.); balanza, con una sensibilidad de 0,1 mg; agitador Multi Reax (Heidolph); matraces aforados de clase A de 10 ml y 25 ml, de vidrio transparente; tubos de centrífuga de polipropileno (50 ml). También se requiere un sistema de CL-DF: Waters Alliance 2695 acoplado a un detector de fluorescencia (DF, Waters Corporation, EE.UU.).

3.4. PROCEDIMIENTO

3.4.1. Extracción de la muestra

- Se pesan 2,5 g de la muestra de leche y se añaden a un tubo de centrífuga de 50 ml.
- Se añaden 10 ml de MeCN para la primera extracción, se agitan en el vórtice durante 30 segundos y se centrifugan a 2500 rpm durante 3 minutos. Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de centrífuga de 50 ml.
- Se extraen con otros 5 ml de MeCN. Se combina el extracto y se mezcla con 20 ml de H₂O y 40 μ l de trietilamina.
- Se limpia el extracto con el cartucho SPE C18, acondicionado con 5 ml de MeCN, seguido de 5 ml de MeCN:H₂O (40:60, v/v) con un contenido del 0,1 % de trietilamina; se pone al vacío durante 5 minutos.
- Se lava el cartucho con 3 ml de hexano y se pone al vacío durante 5 minutos. Se eluye el residuo con 10 ml de MeCN en un vial de color ámbar de 12,5 ml. Se evapora el eluido a sequedad con nitrógeno a 600 °C.

3.4.2. Derivatización

- Se disuelve el residuo en 1 ml de MeCN y se coloca en un baño ultrasónico durante 20 minutos y se añaden 100 μ l de N-metilimidazol y 100 μ l de anhídrido trifluoroacético.
- Se deja reposar la muestra protegida de la luz durante 35 minutos antes de transferir una alícuota a un vial de cargador de muestras automático e inyectarlo en el sistema de HPLC-FLD.

3.4.3. Condiciones cromatográficas

a) Idoneidad del sistema y condiciones de los instrumentos

Para evaluar la idoneidad del sistema, se inyectan al menos cinco muestras idénticas de un patrón intermedio utilizado para la curva de calibración. La desviación estándar relativa del pico de respuesta y el tiempo de retención no debe ser superior al 5 %. El sistema de HPLC se utiliza en las condiciones que se resumen en el cuadro 5 que figura a continuación.

CUADRO 5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS USADAS

Columna cromatográfica:	Fase reversa C18, 4,6 x 150 mm, 3,5 µm
Fase móvil:	MeOH:H ₂ O (97:3, v/v).
Tipo de flujo de la fase móvil:	Isocrático
Velocidad de flujo:	1 ml/min
Volumen de inyección:	50 µl
Temperatura (muestra):	25 °C
Temperatura (columna):	30 °C
Tiempo de lectura:	9 min
Detector:	FLD 2475
Longitud de onda de excitación:	365 nm
Longitud de onda de emisión:	465 nm

4. DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL EN MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

4.1. PRINCIPIO

El florfenicol (FFC) es un antimicrobiano de amplio espectro utilizado para tratar enfermedades bacterianas en los peces; el límite máximo correspondiente de residuos (LMR) en el músculo de pescado es de 1000 µg/kg [2]. Las muestras se extraen en acetato de etilo, se limpian mediante extracción en fase sólida y se analizan mediante HPLC con un detector ultravioleta (UV).

4.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es adecuado para el análisis de florfenicol en músculo de pescado a un límite de cuantificación de 500 µg/kg.

4.3. MATERIALES

Se requiere el material fungible siguiente:

Patrón analítico FFC; acetonitrilo (MeCN)^(*), metanol (MeOH)^(*), hexano^(*), agua ultrapura (H₂O); acetato de etilo, todo ello de calidad HPLC.

(*) Los solventes utilizados durante el proceso de limpieza deben ser de calidad analítica o cromatográfica (HPLC) con un alto grado de pureza. Si un solvente no cumple estas especificaciones, debe filtrarse utilizando filtros de membrana de (al menos) 0,45 µm. Solución patrón primaria, solución FFC (SNI), 100.10³ µg/l; solución patrón secundaria, solución FFC (SNII).

4.3.1. Patrones y soluciones

a) Solución patrón madre de FFC (SNI), 100.10³ µg/l.

- Se pesan con exactitud 10,0 mg (\pm 0,1 mg) de FFC, se añaden a un matraz aforado de 100 ml y se disuelven en ~80 ml de MeCN de calidad HPLC.
- Se agita y después de disolverse completamente, se completa hasta la marca de 100 ml con MeCN.
- La estabilidad de esta solución es de 3 meses en congelador.

b) Solución patrón de trabajo de 10.10³ µg/l

- Se transfieren con pipeta 5 ml de la solución FFC SNI a un matraz de 50 ml, se completa con MeCN hasta la marca y se mezcla completamente.
- La estabilidad de esta solución es de 7 días en refrigerador.
- Debe mantenerse en la oscuridad.

c) MeOH:H₂O (10:90, v/v)

Se mezclan 9 ml de H₂O con un 1 ml de MeOH en un tubo de 10 ml.

4.3.2. Equipo

Se necesita lo siguiente:

Mezclador de vórtice; pipeta Pasteur; sistema de evaporación; tubos de plástico cónicos de 15 ml; matraz; baño de agua; cartuchos de extracción en fase sólida (C-18; 500 mg/3 ml de material de limpieza); colector de vacío; HPLC-UV; micropipeta; dispensador; jeringas desechables de 3 ml; viales con insertos; balanza analítica (precisión de 0,0001 g); vasos de precipitados; filtro de 0,45 μm .

4.4. PROCEDIMIENTO

- a) Se pesan 5,0 g ($\pm 0,009$) de la muestra triturada y se añaden a tubos cónicos de plástico de 50 ml.
- b) Se pesan 6 porciones de 5,0 g ($\pm 0,009$) de tejido de blanco triturado y se añaden a tubos cónicos de plástico de 50 ml antes de enviarlas a un laboratorio para su análisis.
- c) Se prepara la curva de calibración de la matriz:
 - i) Se enriquecen los blancos con 10 $\mu\text{g/l}$ de SNII, de acuerdo con las concentraciones que se describen en el cuadro 6.
 - ii) El blanco de muestra restante se utiliza como control. Con un dispensador, se añaden 10 ml de acetato de etilo a las muestras pesadas en tubos de ensayo.
- d) Se agitan en el vórtice durante 1 minuto.
- e) Se centrifugan a 2000 rpm durante 5 minutos.
- f) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de plástico de 15 ml.
- g) Se evapora el sobrenadante utilizando nitrógeno, en un baño de agua a una temperatura de entre 50 °C y 55 °C hasta que quede un residuo aceitoso.
- h) Se añaden 2 ml de hexano al tubo que contiene el extracto para eliminar la grasa.
- i) Se agita en el vórtice durante 15 segundos.
- j) Se añaden 5 ml de agua al tubo y se agita durante 30 segundos.
- k) Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos; se elimina la capa superior (hexano) y, si es necesario, se repite este paso para desengrasar.
- l) Se evapora cualquier hexano restante en atmósfera de nitrógeno en un baño de agua a una temperatura de entre 50 °C y 55 °C durante 2 minutos.
- m) Se inicia la extracción en fase sólida del modo siguiente:
 - i) Se prepara el colector de vacío con la cantidad necesaria de cartuchos de extracción en fase sólida (C18; 500 mg/3 ml).
 - ii) Se acondicionan los cartuchos con 5,0 ml de acetato de etilo, 10 ml de MeOH y 10 ml de H₂O.
 - iii) Se cargan las muestras en el cartucho de extracción; se transfieren las muestras de los tubos al cartucho, se lavan los tubos con 3 ml de H₂O y se vacían en el depósito; se eluye la muestra y se deja secar el cartucho.
 - iv) Lavado de la muestra: se añaden 10 ml de MeOH:H₂O (1:9, v/v); a continuación, se añaden 10 ml de H₂O.
 - v) Elución de la muestra: se coloca el cartucho en tubos de plástico cónico de 15 ml para recoger la muestra eluida. Se eluyen las muestras; se añaden al cartucho 5,0 ml de acetato de etilo y se seca el cartucho.
- n) Se retiran los cartuchos C-18 y se evapora la solución en el tubo (paso m)) hasta sequedad con nitrógeno en baño de agua a una temperatura de entre 50 °C y 55 °C.
- o) Se añade 1 ml de MeCN:H₂O (40:60, v/v) al residuo y se mezcla bien.

- p) Se pasa el contenido (paso o)) a través de un filtro de 0,45 μm a un vial de HPLC.
- q) Se inyecta la muestra en el HPLC para su análisis, utilizando las condiciones cromatográficas que se describen en el cuadro 7.

CUADRO 6. PROCEDIMIENTO DE ENRIQUECIMIENTO DE LA MUESTRA

Concentración del patrón $\mu\text{g/kg}$	Vol. (μL) de concentración de SNII 1000 $\mu\text{g/kg}$	Masa (μg) añadida a 5,0 g de muestra
250	125	$125 \cdot 10^3$
500	250	$250 \cdot 10^3$
1000	500	$500 \cdot 10^3$
1500	750	$750 \cdot 10^3$
2000	1000	$1000 \cdot 10^3$

CUADRO 7. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Parámetros cromatográficos	
Detector:	UV
Columna:	C-18 250 \times 4,6 mm, 5 μm
Método:	FFC-UV
Temperatura de la columna:	50 $^{\circ}\text{C}$
Longitud de onda (λ):	230 nm
Fase móvil:	H ₂ O: MeCN (60:40, v/v)
Tiempo de ejecución:	6 min
Volumen inyectado:	20 μl
Velocidad de flujo:	1 ml/min
Tiempo de retención:	FFC 4,5 min

4.5. CONTROL CRÍTICO

Hay que asegurarse de que:

- la columna analítica esté acondicionada como máximo 90 minutos antes de la inyección y análisis de la muestra;
- después de cada ejecución se lava la columna con MeOH a un caudal bajo ($\sim 0,1$ - $0,2$ ml/min) durante al menos 4 horas.

4.6. CRITERIOS DE ACEPTABILIDAD

Para evaluar la idoneidad del método, se recomiendan los rangos que figuran en el cuadro 8.

CUADRO 8. NIVELES DE ENRIQUECIMIENTO Y RANGOS ACEPTABLES DE RECUPERACIÓN

Concentración enriquecida ($\mu\text{g/kg}$)	Intervalo de recuperación
Menos de 1	50 % a 120 %
De 1 a 10	70 % a 110 %
Más de 10	80 % a 110 %

4.7. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

La incertidumbre expandida estimada de la medición debe ser del 5,4 %.

4.8. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación del método para el análisis de florfenicol en el pescado es de 500 µg/kg.

4.9. CC ALFA Y CC BETA

- El límite de decisión ($CC\alpha$) de florfenicol en el pescado es de 840 µg/kg.
- La capacidad de detección ($CC\beta$) es de 879 µg/kg.

4.10. RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- a) Se pesan 5,0 g de muestra y se añaden a un tubo de ensayo de 50 ml.
- b) Se prepara la curva ajustada a la matriz utilizando concentraciones patrón de 250 µg/kg, 500 µg/kg, 1000 µg/kg, 1500 µg/kg y 2000 µg/kg.
- c) Se añaden 10 ml de acetato de etilo y se agita en el vórtice durante 1 minuto.
- d) Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos.
- e) Se transfiere el sobrenadante a un tubo de ensayo limpio de 15 ml.
- f) Se evapora el sobrenadante utilizando nitrógeno, en un baño de agua a una temperatura de entre 50 °C y 55 °C.
- g) Se añaden 2 ml de hexano al tubo que contiene el extracto y se agita durante 15 segundos.
- h) Se añaden 5 ml de H₂O desionizada y se agita durante 30 segundos.
- i) Se centrifuga a 2000 rpm durante 5 minutos.
- j) Se elimina la capa superior (hexano).
- k) Se evapora el hexano residual utilizando una corriente de nitrógeno en baño de agua a una temperatura de entre 50 °C y 55 °C durante 2 minutos.
- l) Se acondiciona la columna de extracción en fase sólida con 5 ml de acetato de etilo, 10 ml de MeOH y 10 ml de H₂O desionizada.
- m) Se transfiere el contenido del tubo de 15 ml (paso e)) a un depósito en la cámara de limpieza de la extracción en fase sólida.
- n) Se enjuaga el tubo de muestra con 3 ml de H₂O y se transfiere el contenido al depósito.
- o) Se eluye la muestra a una velocidad de flujo de 2 a 3 gotas por segundo.
- p) Se añaden 10 ml de MeOH:H₂O (1:9, v/v) al depósito y se eluye la columna de extracción en fase sólida.
- q) Se lava la columna con 10 ml de H₂O.
- r) Se seca la columna de la extracción en fase sólida durante 1 minuto.
- s) Se utilizan tubos limpios de 15 ml para recoger la muestra eluida.
- t) Se eluye la muestra con 5 ml de acetato de etilo a un flujo de 1 a 2 gotas por segundo.
- u) Se retira la columna de la extracción en fase sólida y se secan las muestras con nitrógeno en un baño de agua a una temperatura de entre 50 °C y 55 °C.
- v) Se reconstituye el residuo con 1,0 ml de MeCN:H₂O (40:60, v/v) y se agita en el vórtice durante 1 minuto.
- w) Se filtra el residuo reconstituido a través de una membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), de 0,45 µm en un vial antes de inyectarlo en el equipo de HPLC-UV.

5. DETERMINACIÓN DE FLORFENICOL Y FLORFENICOL AMINA EN EL MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO Y CONFIRMACIÓN POR CL-EM/EM

5.1. PRINCIPIO

El florfenicol (FFC) se utiliza habitualmente para tratar enfermedades bacterianas en los peces, pero sus residuos no deben superar el límite máximo de 1000 µg/kg en el músculo de pescado [2]. Las muestras se extraen en acetato de etilo, se limpian mediante extracción en fase sólida y se analizan mediante HPLC-UV para establecer un procedimiento de cribado de residuos de FFC en el músculo de pescado por radioinmunoensayo (RIA), con la confirmación de los resultados dudosos mediante CL-EM/EM.

5.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El método es adecuado para detectar FFC en el pescado a fin de cumplir el límite máximo de residuos permitido o aceptable de 1000 µg/kg.

5.3. MATERIALES

Se requiere el material fungible siguiente:

5.3.1. Patrones

Solución patrón primaria (SNI): FFC y florfenicolamina (FFA), $100.10^3 \mu\text{g l}^{-1}$; solución patrón secundaria (SNII): FFC y FFA, $2,103 \mu\text{g l}^{-1}$.

5.3.2. Reactivos

KH₂PO₄; Na₂HPO₄PO; NaCl; gelatina fisiológica; 2,5-difeniloxazol (PPO); 1,4-bis(5-fenil-2-oxazolilo benceno) (POPOP); carbón activado; dextrano T-70; tolueno; tritón X-100; azida de sodio NaN₃; tampón fosfato salino (PBS). Además: acetona^(*); diclorometano^(*); hexano^(*); H₂O desionizada; MeOH^(*); tolueno; tritón X-100.

- (*) Los solventes utilizados durante el proceso de limpieza deben ser de calidad analítica o cromatográfica (HPLC). Todos los solventes utilizados con el equipo (HPLC) deben ser de calidad cromatográfica o superior.
- Si un solvente no cumple las especificaciones, debe filtrarse utilizando filtros de membrana de ~0,45 µm.

5.3.3. Soluciones patrón

a) Solución patrón madre de FFC (SNI) $100.10^3 \mu\text{g/l}$.

- Se pesan con exactitud 10,0 mg ($\pm 0,1$ mg) de FFC, se añaden a un matraz aforado de 100 ml con la masa real corregida con arreglo a la pureza del patrón.
- Se disuelve el material en ~80 ml de MeOH de calidad HPLC, se agita y después de disolverse completamente, se completa la solución hasta la marca de 100 ml.
- El período de caducidad es de 1 año si se almacena en congelador.

- b) Solución patrón de trabajo de 2,103 µg/l
- Se transfieren con pipeta 2 ml de la solución SNI a un matraz aforado de 100 ml y se completa con MeOH hasta la marca.
 - Se mezcla bien.
 - El período de caducidad es de 1 año si se almacena en congelador.
- c) Tampón PBS 0,1 mol/l; pH = 7,4.
- Se pesan 13,609 g de KH_2PO_4 , 14,196 g de Na_2HPO_4 , 5,844 g de NaCl y 6,501 g de azida de sodio NaN_3 , y se disuelven en 800 ml de H_2O antes de ajustar el pH.
 - Se transfiere a un matraz aforado de 1000 ml y se completa hasta la marca con H_2O desionizada.
 - Esta solución dura 12 meses si se almacena en refrigerador.
- d) Tampón PBS + Gelatina 0,01 mol/l; pH = 7,4
- Se pesa 1,0 g de gelatina fisiológica y se disuelve en 800 ml de H_2O .
 - Se transfiere a un matraz aforado de 1000 ml y se añaden ~ 100 ml de (PBS) de 0,1 mol/l ajustado a un pH de 7,4.
 - Se ajusta el volumen con H_2O desionizada.
 - Esta solución dura 12 meses si se almacena en refrigerador.
- e) Cóctel de centelleo
- Se pesan 4,9 g de PPO y 0,1 g de POPOP.
 - Se disuelven con 666 ml de tolueno.
 - Después de disolverse completamente, se añaden 333 ml de tritón y se mezcla.
- f) Suspensión de carbón
- Se pesan 0,5 g de carbón activado y 0,05 g de dextrano T-70 y se disuelven en 100 ml de tampón PBS + Gelatina 0,01 mol/l a un pH de 7,4.
 - Debe prepararse diariamente.

5.3.4. Equipo

Se requiere lo siguiente: agitador (vórtice); micropipeta; pipeta Pasteur; dispensador; sistema de evaporación; jeringas desechables de 3 ml; tubos de plástico cónicos de 15 ml y 50 ml; viales de centelleo e insertos; matraz; balanza analítica (precisión de 0,0001 g); baño de agua; vasos de precipitado; contador de centelleo líquido, tubos de radioinmunoensayo; tubos de ensayo.

5.4. PROCEDIMIENTO

- a) Se pesan 5,0 g ($\pm 0,001$ g) de la muestra triturada y se añaden a tubos cónicos de plástico de 50 ml.
- b) Se pesan 6 porciones de 5,0 g ($\pm 0,001$ g) de tejido de blanco (muestras sin el analito en cuestión) y se añaden a tubos cónicos de plástico de 50 ml. Se enriquecen las muestras con arreglo al cuadro 9, lo que representa 2, 1 y 0,5 veces el límite máximo de residuo, utilizando soluciones SNI.

- c) Se prepara la curva de calibración utilizando los intervalos de concentración indicados en el cuadro 10.
- d) Se enriquecen las muestras con alícuotas del patrón de trabajo en esta etapa; se añaden al tubo 2 ml de H₂O desionizada.
- e) Se añaden 8 ml de acetona y se homogeneizan los contenidos.
- f) Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 minutos. Se ajusta el volumen final de sobrenadante combinado, se añaden 20 ml de acetona y se decanta el sobrenadante en un tubo.
- g) Se mezcla bien el sobrenadante, se transfieren 8 ml a un tubo con tapa de rosca y se añaden 6 ml de diclorometano.
- h) Se tapa el tubo y se mezcla el contenido (5 s) con un mezclador de vórtice.
- i) Se centrifuga durante 5 minutos a 1000 rpm para separar las capas.
- j) Se aspira y se desecha la capa acuosa superior, y se evapora hasta sequedad la capa inferior de diclorometano, utilizando nitrógeno (temperatura máxima, 45 °C). Cualquier grasa presente debe eliminarse con diclorometano.
- k) Se disuelve el residuo en 1,0 ml de solución de ácido acético al 0,001 %, y se extrae con 2 ml de hexano.
- l) Se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos para separar las capas; se aspira y se desecha la capa superior de hexano.
- m) Se miden 250 µl de la solución y se aumenta a 500 µl con tampón fisiológico.
- n) Se realiza la prueba de inmunoensayo.
- o) Se preparan los puntos de calibración con un intervalo de concentración final de 250 µg/kg a 2000 µg/kg utilizando el tampón fisiológico (pH = 7,4).
- p) Se añaden de 5000 a 8000 cuentas por minuto (cpm) de FFC marcado con tritio.
- q) Se añaden a cada tubo 100 µl de antisuero a una dilución de 1:2500.
- r) Se incuba durante 15 minutos a 37 °C y luego durante la noche a 4 °C.
- s) Se añade 1 ml de carbón activado (0,5 %) y dextrano (0,05 %).
- t) Se deja reposar la mezcla durante 10 minutos a 4 °C.
- u) Se centrifuga a 10 000 rpm.
- v) Se elimina la capa acuosa.
- w) Se añaden 5 ml de cóctel de centelleo.
- x) Las muestras deben leerse durante 4 minutos utilizando un contador de centelleo.

CUADRO 9. CONCENTRACIÓN ADICIONADA Y VOLUMEN

Concentración final (µg/kg)	Vol. (µL) del SNI
500	25
1000	50
2000	100

CUADRO 10. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Concentración de la muestra (µg/kg)	Vol. (µl) del SNII	Vol. del tampón fosfato salino
250	1000	1000
375	1000	1000
500	1000	1000
750	1000	1000
1000	1000	1000
1500	1500	500
2000	2000	-

5.5. CÁLCULOS

Dado que el volumen final del procedimiento analítico es de 250 µl, que representan 1 g de tejido, no se requieren cálculos adicionales.

5.6. PUNTOS DE CONTROL CRÍTICOS

Es importante tener en cuenta los puntos críticos siguientes:

- La temperatura de evaporación debe ser de $45\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.
- La preincubación del paso del RIA debe hacerse a $37\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.
- El pH del tampón fisiológico debe ser de $7,4 \pm 0,1$.
- La temperatura de almacenamiento de los patrones, así como de las soluciones, debe estar entre 4 °C y 9 °C .
- El extracto de la muestra será estable durante unos 2 días en congelador.

5.7. INCERTIDUMBRE DE LA MEDICIÓN

Los niveles de incertidumbre expandida para el FFC y el FFA son del 5,9 % y 10,2 %, respectivamente.

5.8. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN, CC ALFA Y CC BETA

El límite de cuantificación de FFC y FFA en pescado es 250 µg/kg, mientras que los valores CC α y CC β para ambos analitos son de 100 µg/kg y 250 µg/kg, respectivamente.

5.9. PRUEBA DE CONFIRMACIÓN

Las muestras con resultados positivos dudosos del ensayo RIA pueden confirmarse mediante la técnica de CL-EM/EM después de la limpieza.

Se requieren las condiciones siguientes de CL-EM/EM para el análisis de FFA:

a. Componente de CL

- HypersilTM C18–BD, 5 µm, 15 cm × 2,0 mm id, columna de fase reversa.
- La fase móvil consiste en una solución de H₂O desionizada + solución de ácido acético al 0,1 % (solvente A); MeCN + solución de ácido acético al 0,1 % (solvente B)
- Debe equilibrarse el sistema de CL durante 30 minutos a temperatura de la columna/horno de 40 °C con un 100 % de solvente A, a un caudal de 0,3 ml/min.
- El gradiente lineal se construye del modo siguiente: 2 % de solvente B durante 2 minutos; a 40 % de solvente B en 11 min; se mantiene durante 2 min; a 100 % de solvente B en 2 min, mientras se aumenta el flujo a 0,4 ml/min; a 2 % de solvente B en 2 min, mientras se disminuye el flujo a 0,3 ml/min; se equilibra durante 11 minutos.

b. Los parámetros de la EM son los siguientes:

Fuente de iones: ionización química a presión atmosférica (APCI) en modo positivo; corona = 2 μ A; cono = 25 V; extractor = 5 V; lente RF = 0,2V; temperatura de la fuente = 130 °C; Temperatura de la sonda APCI = 500 °C; caudal del gas de desolvatación = 300 l/h; caudal del gas del cono = 100 l/h. Transiciones (masa a carga, m/z) para la FFA: m/z 248 a 230; m/z 248 a 197; m/z 248 a 151; m/z 248 a 130.

Retardo entre canales, 0,3 s; tramo (Dalton, Da), 0,1; modo de iones de la FFA, ES+, masa 248,2, tiempo de permanencia de 0,3; modo de iones del FFC, ES-, masa 356,1; fuente ES+: capilaridad de 0,3, a 3,5 kV; cono, 25,0 V; extractor, 1,0 V; lente RF, 0,0 V; temperatura de la fuente, 100 °C; fuente ES-: capilaridad, 2,5 kV; cono, 20,0 V; extractor, 5,0 V; lente RF, 0,5 V; temperatura de la fuente, 100 °C. Otras condiciones de la EM son las siguientes: temperatura de desolvatación, 400 °C; caudal de gas del cono, 60 l/h; caudal del gas de desolvatación, 400 l/h; tiempo de ejecución, 30 minutos.

Las condiciones de la CL-EM/EM para el FFC que figuran a continuación son las mismas de las que se informó en otro lugar [3], a saber:

- a. HPLC: Zorbax 5 mm, C18 (150 x 2,1 mm); fase móvil (modo isocrático), consistente en MeCN:H₂O:formiato de amonio a una velocidad de flujo de 0,2 ml/min; temperatura del horno, 50 °C; volumen de inyección, 10 ml.
- b. EM: ionización, ESI+; gas de secado, Ar (520 l/h, 250 °C); V-cap 3000 V; gas de colisión, N₂, 25 l/h; tiempo de permanencia, 0,2 segundos; voltaje del cono (V) de 45 para m/z 355>336,0 (ion cualificador) y 355,8>185,0 iones de transición, cuyas energías de colisión son de 39 V y 50 V, respectivamente.

6. MÉTODO DE CONFIRMACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE AMINOGLUCÓSIDOS EN MÚSCULO, HÍGADO Y RIÑÓN MEDIANTE CL-ESI-EM/EM

6.1. PRINCIPIO

Los residuos de aminoglucósidos (AGS), antibióticos de amplio espectro de uso común, se extraen de las muestras utilizando una solución acuosa de ácido tricloroacético (TCA). Los extractos se pasan a través de cartuchos de extracción en fase sólida con balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y se analizan mediante CL-ESI-EM/EM.

6.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método es adecuado para confirmar y cuantificar los analitos que figuran en el cuadro 11.

CUADRO 11. RESIDUOS DE FÁRMACOS DETECTABLES MEDIANTE ESTE MÉTODO

Fármaco	Residuos marcadores	Matriz	Especie	CC α (μ g/kg)	CC β (μ g/kg)	LMR/Nivel indicativo – sustancias no sujetas a un LMR (μ g/kg)
Aminoglucósidos	Apramicina	músculo	cerdo	63,2	65,8	60
	Kanamicina			44,7	49,0	40
	Gentamicina C1			54,0	59,2	50
	Gentamicina C2			54,9	59,7	50
	Gentamicina C1a			55,2	59,9	50
	Amikacina			105,1	109,9	/100
	Neomicina			555,0	612,3	500
	Espectinomina			113,6	125,6	100
	Estreptomicina			561,7	626,0	500
	Dihidroestreptomicina			564,7	627,7	500
	Tobramicina			51,9	53,9	/50
	Paromomicina			551,4	599,9	500
	Netilmicina			56,4	62,6	/50
	Sisomicina			54,8	60,0	/50
	Micronomicina			55,2	60,3	/50
	Higromicina			549,5	595,8	/500
Aminoglucósidos	Apramicina	hígado	cerdo	65,7	72,5	60
	Kanamicina			45,9	50,9	40
	Gentamicina C1			112,0	125	100
	Gentamicina C2			109,0	121,0	100
	Gentamicina C1a			112	125,0	100
	Amikacina			108,0	117	/100
	Neomicina			555	618,7	500
	Espectinomina			109,3	118	100
	Estreptomicina			550	609,0	500
	Dihidroestreptomicina			553	611	500
	Tobramicina			51,6	54,6	/50
	Paromomicina			1631	1759	1500
	Netilmicina			57,7	66,2	/50
	Sisomicina			54,8	59,6	/50
	Micronomicina			57,8	66,5	/50
	Higromicina B			542	581,0	/500

Fármaco	Residuos marcadores	Matriz	Especie	CC α (μ g/kg)	CC β (μ g/kg)	LMR/Nivel indicativo – sustancias no sujetas a un LMR (μ g/kg)
Aminoglucósidos	Apramicina	riñón	cerdo	111,0	124	100
	Kanamicina			45,2	50,3	40
	Gentamicina C1			226	253	200
	Gentamicina C2			218	237	200
	Gentamicina C1a			228	257	200
	Amikacina			109	117	/100
	Neomicina			5359	5797	5000
	Espectinomicina			570	631	500
	Estreptomicina			1104	1206	1000
	Dihidroestreptomicina			1105	1222	1000
	Tobramicina			56,9	63,3	/50
	Paromomicina			1641	1789	1500
	Netilmicina			55,5	62,1	/50
	Sisomicina			54,1	59,4	/50
	Micronomicina			57,3	65,1	/50
	Higromicina B			560	610	/500

6.3. MATERIALES

Se requieren los siguientes reactivos/materiales: H₂O ultrapura (18,2 mega-ohmios); ácido acético, MeOH, MeCN y n-hexano de calidad HPLC; ácido heptafluorobutírico (HFBA)>99,5 %; TCA, A.R.; NaOH; HCl, A.R.; unidad de filtro desechable (0,45 μ m); cartucho Oasis HLB (3 cc/60 mg); kit de prueba de pH (pH entre 4~10).

6.3.1. Muestra de control negativo

Se considera control negativo a una muestra de material en blanco (“blanco”) previamente analizada sin que se hayan detectado aminoglucósidos. Debe obtenerse de animales de los que se conozca su historial veterinario/de tratamiento (si está disponible) o, de lo contrario crearse a partir de varias muestras en blanco de la misma matriz y especie que la muestra que se desea confirmar.

6.3.2. Patrón de matriz adicionada previamente a la extracción (matriz pre)

En este procedimiento, las muestras de control negativo se adicionan al principio del procedimiento analítico con los analitos que vayan a determinarse, lo cual resulta útil para la calibración y cuantificación de los analitos de interés en las muestras.

6.3.3. Patrón de matriz adicionada después de la extracción (matriz post)

Se trata de muestras de control negativo que pasan a través de todo el procedimiento de extracción y luego se adicionan con los analitos de interés antes de la detección (patrones ajustados a la matriz). Pueden utilizarse para determinar la recuperación del analito.

6.3.4. Blanco de reactivo (o “blanco de procedimiento”)

En este caso, se sigue todo el protocolo de análisis, pero sin la inclusión de ningún material de muestra o analitos. El blanco se utiliza para comprobar la posible contaminación derivada de los reactivos, los instrumentos o el entorno de laboratorio.

6.3.5. Materiales de referencia

Para este ensayo no es necesario ningún material de referencia certificado, sino que deben incluirse más bien controles negativos y patrones de matriz adicionados antes y después de la extracción para asegurar la validez.

6.3.6. Solventes

a) Solución acuosa de TCA al 5 % (p/v)

- Se pesan 50,0 g de TCA, se añaden a un vaso de precipitados y se disuelven en ~900 ml de H₂O ultrapura.
- Se transfiere el contenido a un matraz aforado de 1 litro y se rellena hasta la marca con H₂O ultrapura.
- Debe prepararse una solución nueva para cada ensayo.

b) HFBA de 0,2 mol/l

- Se disuelven 13 ml de HFBA en H₂O ultrapura para obtener un volumen final de 500 ml.
- Esta solución se mantiene estable hasta 6 meses a 4 °C.

c) HFBA de 0,02 mol/l

- Se disuelven 1,3 ml de HFBA en H₂O ultrapura para obtener un volumen final de 500 ml.
- Esta solución se mantiene estable hasta 6 meses a 4 °C.

d) MeCN:0,15M HFBA (4:1, v/v)

- Se añaden 400 ml de MeCN y 75 ml de HFBA de 0,2 mol/l a 25 ml de H₂O ultrapura y se mezcla bien.
- Debe prepararse una solución nueva para cada ensayo.

e) Solución acuosa de NaOH de 100 g/l

- Se disuelven 100 g de NaOH en H₂O ultrapura, y se completa hasta un volumen final de 1000 ml.
- Debe prepararse una solución nueva para cada ensayo.

f) Solución de HCl de 0,2 mol/l

- Se disuelven 5 ml de HCl en H₂O ultrapura, y se completa hasta un volumen final de 300 ml.
- Debe prepararse una solución nueva para cada ensayo.

g) Solución de NaOH (pH 8,5)

- Se disuelve NaOH de 100 g/l para obtener una concentración de 10 g/l, y luego se ajusta el pH a 8,5 mediante la adición de HCl de 0,2 mol/l.
- Debe prepararse una solución nueva para cada ensayo.

h) Fases móviles

- MeCN que contenga 20 mM de HFBA; se prepara mediante la adición de 1,3 ml de HFBA a 500 ml de MeCN y mezclándolo bien.
- MeCN:H₂O (5:95, v/v) que contenga 20 mM de HFBA; se prepara mediante la adición de 2,6 ml de HFBA a 50 ml de MeCN y 950 ml de H₂O y mezclándolo bien.
- MeCN:H₂O (50:50, v/v) que contenga 20 mM de HFBA; se prepara mediante la adición de 2,6 ml de HFBA a 500 ml de MeCN y 500 ml de agua y mezclándolo bien.
- Debe prepararse una solución nueva de todas ellas para cada ensayo.

6.3.7. Patrón y soluciones patrón

Se requieren patrones analíticos de gran pureza (cuadro 12).

CUADRO 12. LISTA DE MEDICAMENTOS ESTUDIADOS, SU PUREZA Y POSIBLE FUENTE

Compuesto	Pureza	Productor/Fuente
Sulfato de apramicina	98,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Sulfato de kanamicina	94,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Gentamicina-2,5-sulfato hidrato (mezcla de Gentamicina C1, C2 y C1a, en proporciones del 29,1 %, 21,3 % y 49,6 %)	96,5 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Amikacina hidrato	99,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Sulfato de neomicina	90,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Sulfato de espectinomicina hidrato	96,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Sulfato de estreptomicina	98,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Dihidroestreptomicina sesquisulfato hidrato	99,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Tobramicina	93,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Sulfato de paromomicina	90,0 %	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemania
Sulfato de netilmicina	93,0 %	European Pharmacopoeia, Francia
Sisomicina	98,0 %	Toronto Research Chemicals Inc., Canadá
Sulfato de micronomicina	60,7 %	International Laboratory, EE.UU.
Higromicina B	60,0 %	Sigma-Aldrich, EE.UU.

a) Solución madre

Téngase en cuenta lo siguiente:

- Para los patrones que se suministran como sales e hidratos, hay que ajustar la masa pesada, de manera que solo se tenga en cuenta la masa de la base libre.
- La solución de dilución se prepara mezclando MeCN:H₂O:ácido acético (20:78:2, v/v/v). Se preparan soluciones madre individuales de los 16 AG (100 µg/ml, excepto para la gentamicina, que es de 80 µg/ml) en solución de dilución de MeCN:H₂O:ácido acético (20:78:2, v/v/v).
- Las soluciones patrón madre se transfieren a tubos de plástico y se almacenan entre 2 °C y 4 °C, hasta un máximo de 6 meses.
- Se prepara la solución de ajuste de cada analito (10 µg/l) mediante la dilución de soluciones madre individuales con una mezcla de MeCN:H₂O:ácido acético (20:78:2, v/v/v).

b) Solución patrón adicionada

- Se prepara una mezcla adicionada del patrón (para enriquecer tres matrices/muestras) diluyendo cada solución madre individual de los 16 AG con MeCN:H₂O:ácido acético (20:78:2, v/v/v) en las concentraciones adecuadas para obtener un volumen final de 50 ml.
- Cuando se necesite una mezcla menos enriquecida, se preparará una dilución adicional de los AG.
- Las soluciones se guardan en tubos de plástico a entre 2 °C y 4 °C; son estables durante 1 mes.

c) Mezcla adicionada del patrón de los AG de interés para el músculo porcino

La solución patrón utilizada para adicionar al músculo porcino se indica en el cuadro 13.

CUADRO 13. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ENRIQUECIMIENTO PARA EL MÚSCULO PORCINO

Compuesto	LMR/Nivel indicativo – sustancias no sujetas a un LMR (µg/kg)	Concentración de la solución individual (mg/l)	Alícuota tomada (ml)	Concentración de cada compuesto en la mezcla resultante (mg/l)
Estreptomicina	500	100	6,25	12,5
Dihidrostreptomicina	500	100	6,25	12,5
Neomicina	500	100	6,25	12,5
Paromomicina	500	100	6,25	12,5
Kanamicina	40	100	0,50	1,0
Amikacina	/ (100)	100	1,25	2,5
Tobramicina	/ (50)	100	0,625	1,25
Espectinomicina	100	100	1,25	2,5
Apramicina	60	100	0,75	1,5
Gentamicina C1	50	80 (total GENT)	2,50	1,16
Gentamicina C2	50			1,98
Gentamicina C1a	50			0,85
Higromicina B	/ (500)	100	6,25	12,5
Netilmicina	/ (50)	100	0,625	1,25
Sisomicina	/ (50)	100	0,625	1,25
Micronomicina	/ (50)	100	0,625	1,25

d) Mezcla adicionada del patrón de los AG de interés para el hígado porcino

La solución patrón utilizada para adicionar al hígado porcino se prepara como se indica en el cuadro 14.

CUADRO 14. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ENRIQUECIMIENTO PARA EL HÍGADO PORCINO

Compuesto	LMR/Nivel indicativo – sustancias no sujetas a un LMR (µg/kg)	Concentración de la solución individual (mg/l)	Alicuota tomada (ml)	Concentración de cada compuesto en la mezcla resultante (mg/l)
Estreptomicina	500	100	5	10
Dihidrostreptomicina	500	100	5	10
Neomicina	500	100	5	10
Paromomicina	1500	100	15	30
Kanamicina	40	100	0,4	0,8
Amikacina	/ (100)	100	1	2
Tobramicina	/ (50)	100	0,5	1
Espectinomicina	100	100	1	2
Apramicina	100	100	0,6	1,2
Gentamicina C1	100	80 (total GENT)	4	1,86
Gentamicina C2	100			3,17
Gentamicina C1a	100			1,36
Higromicina B	/ (500)	100	5	10
Netilmicina	/ (50)	100	0,5	1
Sisomicina	/ (50)	100	0,5	1
Micronomicina	/ (50)	100	0,5	1

e) Mezcla adicionada del patrón de los AG de interés para el riñón porcino

La solución patrón utilizada para adicionar al riñón porcino se prepara como se indica en el cuadro 15.

CUADRO 15. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE ENRIQUECIMIENTO PARA EL RIÑÓN PORCINO

Compuesto	LMR/Nivel indicativo – sustancias no sujetas a un LMR (µg/kg)	Concentración de la solución individual (mg/l)	Alicuota tomada (ml)	Concentración de cada compuesto en la mezcla resultante (mg/l)
Estreptomicina	1000	100	2,5	5
Dihidrostreptomicina	1000	100	2,5	5
Neomicina	5000	100	12,5	25
Paromomicina	1500	100	3,75	7,5
Kanamicina	40	100	0,1	0,2
Amikacina	/ (100)	100	0,25	0,5
Tobramicina	/ (50)	100	0,125	0,25
Espectinomicina	500	100	1,25	2,5
Apramicina	100	100	0,25	0,5
Gentamicina C1	200	80 (total GENT)	2	0,93
Gentamicina C2	200			1,59
Gentamicina C1a	200			0,68
Higromicina B	/ (500)	100	1,25	2,5
Netilmicina	/ (50)	100	0,125	0,25
Sisomicina	/ (50)	100	0,125	0,25
Micronomicina	/ (50)	100	0,125	0,25

6.3.8. Equipo

Tubos de polipropileno con tapón de rosca (15 ml y 50 ml); balanza analítica (0,1 mg y 0,01 g); mezclador de alta velocidad (IKA® T25 digital ultra-turrax®); dispersante (IKA S25N-25F); pipetas calibradas de microlitro (10 µl–1000 µl); mezclador de vórtice; agitador orbital (IKA-KS260); ultrasonificador; medidor de pH (sensION+DO6); centrífuga refrigerada de alta velocidad (Beckman Coulter Allegra™ X-22R); evaporador de nitrógeno (N-EVAP™ 112);

colector de vacío para extracción en fase sólida con control de flujo de PTFE; bomba de vacío (GM-0,33A); sistema de producción de H₂O ultrapura (Milli-Q Plus pure system); matraces aforados (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml y 1000 ml); papel de aluminio; viales color ámbar para muestreador automático y tapones con membrana de PTFE; sistema de CL-ESI-EM/EM.

En los cuadros 16 y 17 se resumen las condiciones óptimas de CL y EM del método, así como las características fisicoquímicas de los analitos.

CUADRO 16. CONDICIONES ÓPTIMAS DE CL Y EM UTILIZADAS

Sistema	Sistema Agilent serie 1100 equipado con desgasificador automático, bomba cuaternaria y cargador automático de muestras; API 3000 LC-MS/MS		
Columna	Waters Atlantis® dC18 (2,1×150 mm, 5 µm)		
Volumen de inyección	30 µl		
Temperatura columna	30 °C		
Caudal	0,4 ml/min		
Modo EM	ESI ⁺		
Fase móvil	A: MeCN con 20 mM de HFBA C: MeCN:H ₂ O (5:95, v/v) con 20 mM de HFBA D: MeCN:H ₂ O (50:50, v/v) con 20 mM de HFBA		
Tiempo (min)	C (%)	D (%)	A (%)
0,00	90	10	0
1,00	90	10	0
5,00	50	50	0
8,00	50	50	0
11,00	35	65	0
11,10	0	5	95
13,90	0	5	95
14,00	90	10	0
18,00	90	10	0

CUADRO 17. PESOS MOLECULARES (PM), TRANSICIONES DE IONES Y VOLTAJES DE LA EM ASOCIADOS DE LOS AGS

Compuesto	PM	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)	CE (V)
Apramicina	539,6	540,4	*378,3	105	4,2	23	25
			217,2			13	40
Amikacina	585,6	586,3	*425,2	90	4,2	27	29
			264,1			17	38
Espectinomicina	332,3	351,3	*333,2	60	10,0	23	26
			98,2			6	44
Neomicina	614,6	615,4	*161,2	155	4,3	10	44
			293,0			17	36
Tobramicina	467,5	468,3	*163,2	65	10,0	10	36
			324,1			19	23
Gentamicina C1a	449,5	450,3	*160,1	85	5,0	9	34
			322,1			20	20
Gentamicina C2	463,6	464,3	*322,1	85	5,0	20	20
			160,1			9	34
Gentamicina C1	477,6	478,3	*157,2	100	4,5	10	30
			322,2			20	21
Kanamicina	484,5	485,3	*163,2	80	4,3	9	39
			324,1			19	25
Higromicina B	527,5	528,2	*177,2	95	10,0	10	44
			352,2			20	35
Dihidrostreptomina	583,6	584,2	*263,1	145	9,5	14	46
			246,2			14	56
Paromomicina	615,6	616,3	*163,2	135	9,0	11	52
			293,0			17	35
Streptomina	581,6	600,3	*582,2	125	4,5	34	26
			263,1			16	52

Compuesto	PM	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z)	DP (V)	EP (V)	CXP (V)	CE (V)
Netilmicina	475,6	476,4	*299,5 191,4	65	7,2	21 11	31 36
Sisomicina	447,5	448,5	*322,4 271,5	50	7,0	20 19	20 27
Micronomicina	463,6	464,6	*322,4 160,3	90	7,6	22 15	21 33
*Seleccionado como ion cuantitativo							
Tratamiento de datos		Analyst 1.4.1 o superior					

Otras condiciones adicionales son las siguientes: tiempo de permanencia de 40 ms; potencial de enfoque de 350 V; gas nebulizador de 12 psi; cortina de gas = 8 psi; gas de colisión = 6 l/min; voltaje de pulverización iónica = 3500 V; temperatura de la fuente de iones = 500 °C.

6.4. CONTROL AMBIENTAL

- La extracción y limpieza deben llevarse a cabo en condiciones de iluminación sin UV (luz amarilla).
- Cuando se saquen de la zona de luz amarilla, los extractos deben protegerse de la luz UV (por ejemplo, utilizando vidrio de color ámbar o envolviéndolos en papel de aluminio).

6.5. PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Debe adoptarse el procedimiento de preparación y análisis de muestras que se describe a continuación, utilizando las concentraciones que figuran en el cuadro 18.

- a) Se homogeneizan muestras de tejido porcino (músculo, hígado y riñón) hasta formar una pasta con un mezclador de alta velocidad. Se almacenan las muestras a $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ en recipientes de plástico y se analizan antes de que pasen 3 meses. La muestra debe devolverse inmediatamente al almacenamiento en frío después de realizarse un submuestreo. El análisis debe realizarse tan pronto como sea posible después del submuestreo, o bien las muestras deberán volver a almacenar a $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$.
- b) Se pesan $5\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$ de muestra preparada por duplicado y se transfieren a sendos tubos de polipropileno de 50 ml.
- c) En el caso de los controles negativos y los patrones de matrices adicionadas previamente a la extracción, se pesan como en el paso b) y se adicionan con los volúmenes correspondientes del patrón de enriquecimiento. Debe utilizarse un mínimo de cuatro niveles de calibración (más blanco), junto con un patrón de matriz adicionado previamente a la extracción idéntico en cada nivel. Los niveles de concentración deben espaciarse de modo equidistante y elegirse de manera que la concentración prevista de la muestra se sitúe en medio de la curva de calibración.
- d) Para cada extracto de patrón de matriz adicionado previamente a la extracción, debe prepararse un control negativo adicional que haya pasado por el procedimiento de extracción (patrón de matriz adicionada después de la extracción) y etiquetarse como matriz post.
- e) Se añaden 10 ml de TCA al 5 % (p/v) a la muestra y se homogeneiza completamente a 10 000 rpm durante 1 minuto, y se centrifuga a 8000 rpm durante 5 minutos. Se transfiere el extracto a otro tubo de polipropileno de 50 ml.

- f) Se repite el procedimiento de extracción usando 10 ml de TCA al 5 %, y se combinan los sobrenadantes del TCA en el tubo de polipropileno de 50 ml.
- g) Se añaden 5 ml de cada HFBA de 0,2M y n-hexano a los sobrenadantes del TCA; se cubren los tubos con papel de aluminio, se colocan en un agitador orbital y se mezclan durante 30 minutos a ≥ 360 rpm.
- h) Se centrifugan los tubos a 8000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se retira la fase superior de n-hexano y se utiliza para la limpieza.
- i) Se coloca un cartucho HLB de extracción en fase sólida en el colector de vacío, se acondiciona con 3 ml de MeOH, 3 ml de H₂O y 3 ml de HFBA de 0,2M y se deja que fluyan los solventes por gravedad. Se desecha el eluido.
- j) Se cargan 5 ml de la capa superior del extracto del paso h) en el cartucho acondicionado y se deja que fluya a 1 ml/min. Se recoge el extracto en un tubo de polipropileno de 15 ml y se ajusta el pH a $8,5 \pm 0,2$ con 100 g/l de NaOH (unas 9 gotas) y HCl de 0,2 mol/l.
- k) Se coloca otro cartucho HLB de extracción en fase sólida en el colector de vacío, se acondiciona con 3 ml de MeOH, 3 ml de H₂O, 3 ml de HFBA de 0,2M y 3 ml de solución de NaOH de pH 8,5 y se deja que fluya la elución por gravedad. Se desecha el eluido.
- l) Se carga el extracto de pH $8,5 \pm 0,2$ del paso k) en el cartucho acondicionado y se deja que fluya a 1 ml/min. Se desecha el eluido.
- m) Se unen los dos cartuchos de HLB con juntas de vacío y se enjuagan con 5 ml de H₂O ultrapura. Se secan los dos cartuchos a menos de 15 mmHg durante 10 minutos.
- n) Se eluyen los residuos de AG de los dos cartuchos con 6 ml de MeCN:HFBA de 0,15M (8:2, v/v) a 1 ml/min, y se recoge el eluido en un nuevo tubo de polipropileno de 15 ml.
- o) Se reduce el eluido recogido a aproximadamente 0,3 ml usando el evaporador de nitrógeno a una temperatura de 40 °C.
- p) Para preparar los patrones de matrices adicionadas después de la extracción, se toman las muestras residuales de 0,3 ml del paso d) etiquetadas como matrices post y se añade el patrón de adición para que coincida con las matrices pre preparadas en el paso c), como se detalla en cuadro 18.
- q) Se reconstituye el residuo (del paso o)) a 1 ml mediante la adición de HFBA de 20 mM y se agita durante 30 segundos. Se transfiere la muestra a un vial con tapa de rosca de muestreador automático.
- r) Se procesan las muestras y los controles en el equipo de CL-ESI-EM/EM en la secuencia siguiente:
 - i) Se inyectan las matrices post en orden creciente de concentración.
 - ii) Se inyectan las matrices pre también en orden creciente de concentración.
 - iii) Se lava la columna inyectando un blanco.
 - iv) Se inyectan las muestras.
 - v) Después de la 10^a muestra, se inyecta una matriz pre seguida de otro lavado (inyección de blanco).
 - vi) Se inyecta otra serie de matrices post (en orden creciente de concentración).
 - vii) Se inyecta otra serie de matrices pre también en orden creciente de concentración.
 - viii) Se inyecta un lavado final.

CUADRO 18. PREPARACIÓN DE LOS PATRONES DE CONTROL Y LOS NIVELES DE REFERENCIA

Identificación del control	Nivel de enriquecimiento de la matriz pre (µg/kg)
Blanco de reactivo	0
Matriz pre 0	0
Matriz pre 1	0,5 LMR/Nivel indicativo
Matriz pre 2	1,0 LMR/ Nivel indicativo
Matriz pre 3	1,5 LMR/ Nivel indicativo
Matriz pre 4	2,0 LMR/ Nivel indicativo

6.6. CUALIFICACIÓN DEL FUNCIONAMIENTO

Antes de iniciar la secuencia de CL-ESI-EM/EM, debe comprobarse que se cumple lo siguiente:

- Ancho aproximado de la línea de base de la matriz pre 1 para cada analito: <1.
- Relación señal/ruido aproximada de la matriz pre 1 para cada analito: >5:1.
- Resolución de la gentamicina C2/micronomicina: >50 %.
- Deriva del tiempo de retención (matriz pre 1 de principio a fin de carrera) <5 %.
- Deriva del área de pico (matriz pre 1 de principio a fin de carrera): <30 %.
- Coefficiente de regresión de la matriz pre (r^2) para cada analito: >0,97.

6.7. CÁLCULO DE LOS RESULTADOS

Obsérvese lo siguiente:

- Las curvas de calibración de las matrices pre se preparan a partir del área de pico con relación a la concentración de cada analito/transición y se calcula el valor r^2 .
- Las curvas de respuesta de las matrices post se preparan a partir del área de pico con relación a la concentración de cada analito/transición.
- Las recuperaciones se calculan mediante la comparación de las pendientes de las curvas de las matrices pre y post.
- Las comprobaciones de la idoneidad del sistema se realizan utilizando estreptomycin como marcador.
- Si la muestra contiene un pico en el tiempo de retención (RT) típico para cualquiera de los analitos, se calcula la concentración de los analitos a partir de las curvas de calibración de las matrices pre mediante la fórmula siguiente:

$$Y = mx + c \dots \dots \dots (1)$$

Donde:

Y es el área del pico; m la pendiente y x la concentración; c el intercepto.

Se utiliza el cálculo siguiente:

$$\text{Concentración } (\mu\text{g/kg} - 1) = \frac{\text{área del pico de la muestra} - c}{m} \dots \dots (2)$$

- Se compara la diferencia entre el resultado de muestras idénticas con la repetibilidad indicada en el documento de validación.

- g) Se compara la relación de las concentraciones calculadas de cada gráfica con las tolerancias que figuran en la Decisión de la Comisión 2002/657/CE del Consejo [4]. Si las relaciones están dentro de las tolerancias especificadas para el número requerido de puntos de identificación, entonces se confirma la identidad del analito.

En el cuadro 19 figura información detallada sobre la validación del método.

CUADRO 19. EXPERIMENTO Y DATOS DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO

	ESPEC- TINO- MICINA	HIGRO- MICI- NA	ESTREP- TOMICI- NA	DIHI- DROS- TREP- TOMICI- CINA	AMI- KA- CI- NA	KA- NA- MI- CI- NA	APRA- MICI- NA	PA- RO- MO- MI- CINA	TO- BRA- MICI- NA	SI- SO- MI- CINA	GEN- TAMI- CINA C1a	GEN- TAMI- CINA C2	MI- CRO- NO- MICI- NA	NE- TIL- MI- CI- NA	GEN- TA- MI- CI- CINA C1	NEO- MI- CI- NA
Músculo																
DSR intradía (%) n=21	3,9-9,5	4,1-8,7	4,8-10,6	5,2-8,0	3,5- 9,6	4,1- 9,4	4,3-12,2	3,0- 11,2	3,5-8,6	4,1- 11,1	3,7-10,1	3,3-9,7	4,4-12,1	4,7- 12,6	4,2- 11,7	5,2- 10,3
DSR entre días (%) n=63	5,0-10,4	7,4-10,1	8,2-11,1	5,3-8,2	5,5-8,4	6,4- 7,8	5,7-10,5	5,6-8,9	6,4-8,2	5,9-9,5	5,4-8,8	7,0-10,3	4,8-9,3	9,1- 12,2	5,6- 9,6	5,5-9,2
Recuperación (%)	60-85	51-78	64-98	74-107	60-90	66-88	66-101	78-107	76-108	76-107	76-106	76-111	76-110	74- 112	76- 111	75-102
LMR/Nivel indi- cativo (µg/kg)	100	/500	500	500	/100	40	60	500	/50	/50	50	50	/50	/50	50	500
CCa (µg/kg)	113,6	549,5	561,7	564,7	105,1	44,7	63,2	551,4	51,9	54,8	55,2	54,9	55,2	56,4	54,0	555,0
CCB (µg/kg)	125,6	595,8	626,0	627,7	109,9	49,0	65,8	599,9	53,9	60,0	59,9	59,7	60,3	62,6	59,2	612,3
Límite de detección (LD, µg/kg)	6,0	15	9,0	8,0	6,0	3,0	3,0	9,0	4,0	4,5	3,0	3,0	4,5	3,0	3,0	9,0
Límite de cuantificación (LQ, µg/kg)	20	50	30	25	20	10	10	30	13	15	10	10	15	10	10	30
Hígado																
DSR intradía (%) n=21	3,3-9,1	4,0-7,2	5,4-9,8	4,6-8,5	4,1- 7,8	3,2- 10,0	4,2-9,8	4,5- 9,5	3,4-7,1	3,4- 13,3	3,4-10,2	4,6-10,7	3,6-11,3	2,8- 11,0	4,2- 9,5	4,9- 10,3
DSR entre días (%) n=63	5,4-9,4	6,2-6,8	8,4-9,7	8,8- 10,6	8,8- 10,0	7,1- 8,6	4,9- 10,4	5,5- 8,6	5,6-10,7	6,6- 10,6	5,5-8,8	7,2-10,4	7,5-11,5	6,7- 10,5	7,4- 8,9	7,1- 10,7
Recuperación (%)	59-85	56-72	61-92	69-102	60-87	59-84	66-95	75- 100	63-101	69-100	73-110	69-106	70-105	73- 109	77- 109	71-100
LMR/Nivel indi- cativo (µg/kg)	100	/500	500	500	/100	40	60	1500	/50	/50	100	100	/50	/50	100	500
CCa (µg/kg)	109,3	541,5	549,8	552,5	108,0	45,9	65,7	1630,8	51,6	54,8	111,6	109,4	57,8	57,7	112,0	555,2
CCB (µg/kg)	117,6	581,0	609,0	610,9	116,6	50,9	72,5	1758,9	54,6	59,6	125,4	121,3	66,5	66,2	124,9	618,7
Límite de detección (LD, µg/kg)	8,0	18	9,0	9,0	6,0	3,0	3,0	12	3,0	4,5	2,5	4,0	5,5	6,0	3,0	6,0

	ESPEC- TINO- MICINA	HIGRO- MICI- NA	ESTREP- TOMICI- NA	DIHI- DROS- TREP- TOMICI- CINA	AMI- KA- CI- NA	KA- NA- MI- CI- NA	APRA- MICI- NA	PA- RO- MO- MI- CINA	TO- BRA- MICI- NA	SI- SO- MI- CINA	GEN- TAMI- CINA C1a	GEN- TAMI- CINA C2	MI- CRO- NO- MICI- NA	NE- TIL- MI- CI- NA	GEN- TA- MI- CINA C1	NEO- MI- CI- NA
Límite de cuantificación (LQ, µg/kg)	25	60	30	30	20	10	10	40	10	15	8,0	12	18	20	10	20
Riñón																
DSR intradía (%) n=21	4,7-8,4	4,2-6,9	3,3-9,6	3,5-8,0	2,9-8,3	3,8-8,8	4,4-10,1	3,8-8,9	5,0-9,5	3,5-9,5	4,2-10,2	3,5-8,1	3,8-13,8	2,8-9,3	4,2-8,2	4,7-10,2
DSR entre días (%) n=63	5,6-10,4	7,0-7,9	8,3-8,6	8,3-10,8	6,1-7,6	9,0-9,7	5,5-8,1	5,6-8,0	6,0-8,7	9,6-10,1	6,6-10,3	5,8-7,3	5,0-9,8	6,6-9,6	7,0-8,6	10,1-11,4
Recuperación (%)	60-91	54-77	68-100	70-106	74-100	61-88	76-101	76-103	74-103	68-101	68-103	76-102	69-105	69-98	75-107	67-99
LMR/Nivel indicativo (µg/kg)	500	/500	1000	1000	/100	40	100	1500	/50	/50	200	200	/50	/50	200	5000
CCα (µg/kg)	570,3	559,9	1104,2	1104,9	108,9	45,2	111,0	1640,5	56,9	54,1	227,8	217,5	57,3	55,5	226,3	5357,5
CCβ (µg/kg)	630,7	609,6	1206,2	1221,9	117,3	50,3	123,7	1788,8	63,3	59,4	257,3	237,3	65,1	62,1	252,7	5795,3
Límite de detección (LD, µg/kg)	6,0	15	7,5	6,0	8,0	2,5	3,0	9,0	4,5	3,0	3,0	4,0	4,5	4,5	3,6	8,0
Límite de cuantificación (LQ, µg/kg)	20	50	25	20	25	8,0	10	30	15	10	10	12	15	15	12	25

Nota: Los niveles de adición son 0,5, 1,0 y 1,5 veces el LMR/niveles indicativos.

7. MÉTODO DE CL-EM/EM PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE BENCIMIDAZOL EN PRODUCTOS ANIMALES

7.1. PRINCIPIO

Las muestras se extraen con carbonato de potasio y acetato de etilo y se desgrasan utilizando hexano. La medición cualitativa y cuantitativa de los residuos se realiza mediante CL-ESI-EM/EM con o sin patrón interno ($^{13}\text{C}_6$ -tiabendazol).

7.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método de CL-ESI-EM/EM es adecuado para la determinación de bencimidazol (BZ), probenzimidazoles y sus metabolitos en productos de origen animal, entre ellos carne de cerdo, carne de cordero, hígado, leche y pescado. Los bencimidazoles, probencimidazoles y sus metabolitos son los siguientes: 5-hidroxi-tiabendazol (TBZ-5-OH), tiabendazol (TBZ), albendazol-2-aminosulfona ($\text{ABZ-NH}_2\text{-SO}_2$), sulfóxido de albendazol (ABZ-SO), oxibendazol (OXI), oxfendazol (OXF), albendazol sulfona (ABZ-SO_2), albendazol (ABZ), febantel, tiofanato etilo, fenbendazol sulfona (FBZ-SO_2) y fenbendazol (FBZ). El límite de detección y el límite de cuantificación son de 0,75 $\mu\text{g/kg}$ y 2,5 $\mu\text{g/kg}$, respectivamente.

7.3. MATERIALES

Se requiere lo siguiente: H_2O , grado analítico; MeCN, calidad HPLC, n-hexano, acetato de etilo, MeOH y acetona; ácido fórmico, ácido acético, GR; MgSO_4 anhidro, acetato de sodio anhidro, AR; adsorbente para extracción en fase sólida (PSA); patrones analíticos: ABZ, 99,0 %, ABZ-SO, 98,5 %, ABZ-SO₂, 99,0 %, ABZ-NH₂-SO₂, >99 %, TBZ, 98,5 %, TBZ-5-OH, 99,5 %, OXI, 98,5 %, OXF, 99,0 %, FBZ, 99,0 %, FBZ-SO₂, >99 %, febantel, 99,0 % y tiofanato etilo, 99,0 %. Otros materiales: filtro de membrana, 0,22 μm ; HPLC-ESI-EM/EM; homogeneizador; mezclador de vórtice; supercentrífuga; ultrasonificador; evaporador de nitrógeno/rotativo; y balanza analítica.

7.3.1. Soluciones patrón

- Se preparan 100 mg/l de solución madre mixta en MeOH y se diluye hasta soluciones patrón de trabajo (~ 10 mg/l) inmediatamente antes de su uso.
- Las soluciones patrón se almacenan en refrigerador a 4 °C.
- También hay que preparar patrones de trabajo ajustados por matrices usando muestras de hígado en blanco.

7.4. PROCEDIMIENTO

7.4.1. Extracción y limpieza de los tejidos musculares y hepáticos

- a) Se añaden 50 $\mu\text{g/l}$ de patrón interno, 3 g de sulfato de sodio, 3 ml de carbonato de potasio de 2 M y 15 ml de acetato de etilo a 5 g de tejido muscular o hepático homogeneizado en un tubo de centrífuga de 50 ml.
- b) Se agita en un mezclador de vórtice durante 2 minutos y se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm.
- c) Se decanta el sobrenadante en un matraz de decantación de 100 ml.
- d) Se repite el procedimiento de extracción una vez usando 15 ml de acetato de etilo.
- e) Se evaporan las fases orgánicas recogidas hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno (a 45 °C).

- f) Se añaden 3 ml de MeCN y 5 ml de n-hexano al residuo seco y se agita durante 2 minutos con un ultrasonicador antes de transferir el contenido a un tubo de centrifuga de 10 ml.
- g) Se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm y se desecha la capa superior.
- h) Se añaden 5 ml de n-hexano a la capa restante para desgrasar el extracto.
- i) Se evapora la capa de MeCN hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno (a 45 °C) y se vuelve a disolver el residuo en 1 ml de MeCN.
- j) Se añaden con la pipeta 100 µl de la solución del paso i) a 900 µl de MeCN:H₂O (30:70, v/v) y se pasa el material a través de un filtro de 0,22 µm.
- k) Se inyecta en el equipo de CL-EM/EM para su análisis.

7.4.2. Extracción y limpieza de muestras de leche

- a) Se pesan 5 ml de muestra de leche y se añaden a tubos de centrifuga de polipropileno de 50 ml.
- b) Se añaden 50 µg/l de solución patrón y 20 ml de MeCN que contenga ácido acético al 0,5 %.
- c) Se agita en un mezclador de vórtice durante 2 minutos.
- d) Se añade acetato de sodio anhidro (1,5 g) y sulfato de sodio anhidro (6,0 g) a cada tubo y se agita vigorosamente durante 2 minutos.
- e) Se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm.
- f) Se aspiran 4 ml del sobrenadante y se evapora hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno (a 45 °C).
- g) Se disuelve el residuo en 2 ml de MeOH y se añaden 50 mg de PSA.
- h) Se agita en el vórtice durante 2 minutos.
- i) Se centrifuga de nuevo durante 5 minutos a 5000 rpm.
- j) Se evapora una alícuota de 1 ml de sobrenadante hasta sequedad en atmósfera de nitrógeno (a 45 °C) y se reconstituyen los residuos en 1 ml de MeCN:H₂O (30:70, v/v).
- k) Se pasa el material a través de un filtro de 0,22 µm.
- l) Se inyecta el contenido en el equipo de CL-EM/EM para su análisis.

7.4.3. Condiciones de la HPLC

Las condiciones son las siguientes: columna de análisis cromatográfico Eclipse-x DB-C18 (50 mm x 4,6 mm 1,8 µm); caudal de 0,3 ml/min; volumen de inyección de 10 µl; temperatura de la columna: 26 °C; fase móvil: MeCN y solución de 0,005 M de ácido fórmico en modo de gradiente (cuadro 20).

CUADRO 20. FLUJO DEL GRADIENTE DE LA FASE MÓVIL DE LA HPLC

Tiempo (min)	A: MeCN (%)	B: ácido fórmico de 0,005 M (%)
0	85	15
5	20	80
8,5	20	80
8,6	85	15
14	85	15

7.4.4. Parámetros de la EM

- Se utiliza el modo de ionización con electrospray con escaneado MRM, con nitrógeno como gas de nebulización, de colisión, de cortina y calentador.
- Las condiciones optimizadas de funcionamiento del ESI (+) – de la EM/EM son las siguientes: potencial de enfoque: 400 V; potencial de entrada: 10 V; potencial de salida de la célula de colisión: 4 V; temperatura: 450 °C; voltaje electrospray: 4500 V; gas 1: 50 psi; gas 2: 60 psi; gas de cortina: 30 psi; gas de colisión: 10 psi; tiempo de permanencia: 50 ms.
- Los parámetros de tolerancia y de la EM/EM para los bencimidazoles se muestran en el cuadro 21 y el cuadro 22, respectivamente.

7.4.5. Evaluación de los resultados

a) Determinación cualitativa

- Se selecciona para cada compuesto un ion primario y dos subiones.
- Se mantiene el tiempo de retención (RT) al $\pm 2,5$ % de los respectivos iones patrón y los errores máximos permisibles de las abundancias relativas de iones como figura en el cuadro 21.

CUADRO 21. ABUNDANCIAS RELATIVAS DE IONES (%) Y ERRORES MÁXIMOS PERMISIBLES

Abundancias relativas de iones %	>50	20-50	10-20	≤10
Errores máximos permisibles %	±20	±25	±30	±50

b) DETERMINACIÓN CUANTITATIVA

- Se preparan las curvas patrón para cada analito mediante el análisis de muestras negativas adicionadas por duplicado con soluciones patrón de cada uno de los 12 analitos a los 7 niveles diferentes de concentración.
- Se cuantifica cada compuesto con referencia al pico del área de respuesta del patrón interno.

c) Cálculo

Las concentraciones del analito se expresan como X (mg/kg), calculadas con la fórmula siguiente:

$$X = \left[\frac{ml \times 1000}{m \times 1000} \right] \times n \dots \dots \dots (4)$$

Donde

ml es el peso del analito en la curva de calibración (μ g); m es el peso de la muestra (g); y n es el factor de dilución.

7.4.6. Criterios de aceptabilidad

- Se recomienda el uso de muestras en blanco y de referencia en el análisis de rutina.
- Solo se aceptarán resultados con recuperaciones de entre el 70 % y el 110 %; de lo contrario, debe detenerse el análisis y determinarse el origen de los problemas.

CUADRO 22. IONES CUALITATIVOS Y CUANTITATIVOS* Y PARÁMETROS ANALÍTICOS PERTINENTES

Compuesto	Transición (m/z)	Potencial desolvatación /v	Energía de colisión /v	TR /min
ABZ	226/234,1*	45	31	8,24
	222/191,1		48	
ABZ-SO	282,3/208,1*	33	37	6,26
	282,3/191,1		45	
ABZ-SO ₂	298,3/159,1*	44	53	7,19
	298,3/224,1		40	
TBZ	202,2/175,1*	50	37	3,61
	202,2/131,2		48	
TBZ-5-OH	218,1/191,1*	48	37	1,93
	218,1/147,2		50	
OXI	250,2/218,0*	41	30	7,07
	250,2/176,2		43	
OXF	316,3/159,1*	48	51	7,07
	316,3/191,2		32	
FBZ	300,3/268,1*	44	35	8,89
	300,3/159,1		52	
FBZ-SO ₂	332,2/159,1*	50	58	7,82
	332,2/300,2		36	
ABZ-NH ₂ -SO ₂	240,1/133,2*	45	44	2,72
	240,1/198,2		30	
Febantel	447,2/280,1*	37	48	10,2
	447,2/227,1		48	
Thiofanato etilo	371,3/151,0*	34	34	9,11
	371,3/104,0		48	

8. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE ALBENDAZOL EN LA CARNE

8.1. PRINCIPIO

El albendazol (ABZ), extraído y purificado a partir de muestras de carne, compete con ABZ conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) en una placa de ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA). Después del lavado, los residuos de HRP catalizan el sustrato, lo que da lugar a un cambio de color. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de ABZ en las muestras.

8.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método es adecuado para el cribado de ABZ y sus metabolitos en productos alimentarios de origen animal, como carne de cerdo, carne de cordero, hígado, leche y pescado. Los residuos de interés son sulfóxido de albendazol (ABZ-SO), albendazol sulfona (ABZ-SO₂) y ABZ.

8.3. MATERIALES

Los componentes del kit de análisis son los siguientes:

Placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con inmunoglobulina G de conejo (IgG) contra ABZ; soluciones patrón de ABZ; peroxidasa conjugada; tampón de lavado concentrado (x10); tampón de citrato; sustrato; solución diluyente concentrada (x20); solución de paro; sobre de plástico; contenedor de almacenamiento. Otros reactivos necesarios para el inmunoensayo son los siguientes: HCl de 0,01 M; NaOH de 5 M; HCl de 5 M; agua destilada; sulfóxido de dimetilo (DMSO); tampón fosfato salino (PBS).

8.3.1. Equipo

Se requiere lo siguiente: homogeneizador; supercentrífuga; micropipetas de precisión de 50 µl, 100 µl y 200 µl; micropipeta multicanal de 50 µl a 200 µl; lector de placas de microtitulación con filtro de 450 nm.

8.4. PROCEDIMIENTO

8.4.1. Preparación/extracción y análisis de la muestra

8.4.1.1. Hígado

- a) Se pesa 1 g de hígado y se añade a un tubo de centrifuga de 50 ml.
- b) Se añaden 10 ml de PBS que contenga un 10 % de DMSO.
- c) Se homogeneiza durante 30 minutos con un equipo Ultra-Turrax o similar.
- d) Se centrifuga el homogeneizado a 4500 rpm durante 5 minutos.
- e) Se transfiere el sobrenadante a un nuevo tubo de ensayo.
- f) Se repiten los pasos b) a e).
- g) Se combinan los sobrenadantes y se mezclan bien.
- h) Se centrifuga 1 ml del sobrenadante a 10 000 rpm durante 5 minutos.
- i) El sobrenadante limpio está listo para la detección.

8.4.1.2. Carne, incluida la de pescado

- a) Se pesan 2 g de muestra de carne y se añaden a un tubo de centrifuga de 50 ml.
- b) Se añaden 10 ml de PBS que contenga un 10 % de DMSO.
- c) Se homogeneiza durante 30 minutos con un equipo Ultra-Turrax o similar.
- d) Se centrifuga el homogeneizado a 4500 rpm durante 5 minutos.
- e) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de ensayo.
- f) Se repiten los pasos b) a e).
- g) Se combinan los sobrenadantes y se centrifuga (1 ml) a 10 000 rpm durante 5 minutos.
- h) El sobrenadante limpio está listo para la detección.

8.4.1.3. Leche

- a) Se mide 1 ml de muestra de leche y se añade a un tubo de 50 ml.
- b) Se añaden 10 ml de PBS que contenga un 10 % de DMSO.
- c) Se homogeneiza durante 30 minutos con un equipo Ultra-Turrax o similar.
- d) Se centrifuga el homogeneizado a 4500 rpm durante 5 minutos.
- e) Se transfiere el sobrenadante a otro tubo de ensayo.
- f) Se centrifuga 1 ml del sobrenadante a 10 000 rpm durante 5 minutos.
- g) El sobrenadante limpio está listo para el análisis/detección.

Para el análisis:

- h) Hay que dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Una vez iniciado el procedimiento, deben completarse todos los pasos sin interrupción.
- i) Se añaden 200 µl de agua destilada a los pocillos de blanco.
- j) Se añaden 50 µl de agua destilada a los pocillos de unión máxima.
- k) Se añaden 50 µl de cada patrón a los pocillos de patrón.
- l) Se añaden 50 µl de cada muestra a los pocillos de muestra.
- m) Se añaden 50 µl de conjugado enzimático a cada pocillo, excepto los pocillos de blanco.
- n) Se agita suavemente la placa.
- o) Se incuba la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (de 20 °C a 25 °C).
- p) Se vacían todos los pocillos después de la incubación.

8.4.1.4. Secuencia de lavado

- a) Se llenan completamente todos los pocillos con solución de lavado; se vacían los pocillos invirtiendo la placa, apretando la matriz de plástico en el centro para evitar que se salgan las tiras.
- b) Se repite el procedimiento de lavado 4 veces.
- c) Se eliminan las gotas residuales sacudiendo la placa vigorosamente contra una toalla de papel.

8.4.1.5. Revelado

- a) Se prepara la solución de revelado mediante la dilución de 1 parte de cromógeno con 9 partes de tampón de citrato.

- b) Con una micropipeta multicanal, se añaden 200 μ l de solución de revelado a cada pocillo, incluidos los pocillos de blanco.
- c) Se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- d) Se añaden 50 μ l de solución de parada a cada pocillo. El color debe pasar de azul a amarillo. Se mezcla bien.

8.4.1.6. *Lectura*

- Una vez bien mezclado, se mide la absorbancia con un lector de microplacas a 450 nm.
- Se toma la medida inmediatamente después de detener el proceso de revelado.

8.4.2. **Evaluación de los resultados**

Se utiliza una curva de calibración para determinar las concentraciones desconocidas de bencimidazol.

- a) Se calcula el valor de la absorbancia media del blanco y se resta del valor de absorbancia de todos los pocillos.
- b) Se calcula el valor de la absorbancia media de la unión máxima (B_o), los patrones y las muestras.
- c) Se divide el valor de absorbancia media de los patrones y las muestras (B) entre el valor de absorbancia media de la unión máxima (B_o) y se multiplica por 100.
- d) Por tanto, la unión máxima será igual al 100 %, y se citarán los valores de absorbancia en porcentajes.
- e) Se introducen los valores de B/B_o (%) calculados para cada patrón en un sistema semilogarítmico de coordenadas frente a la concentración patrón de bencimidazol; se traza la curva patrón.
- f) Se toma el valor de B/B_o (%) de cada muestra y se interpola la concentración correspondiente a partir de la curva de calibración.

9. MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR SULFONAMIDAS Y TETRACICLINAS EN MUESTRAS AMBIENTALES SÓLIDAS/SEMISÓLIDAS Y ACUOSAS MEDIANTE CL-EM/EM

9.1. PRINCIPIO

Las muestras se preparan mediante la extracción sólido-líquido con limpieza por extracción en fase sólida mediante cartucho de HLB y se concentran bajo una corriente de nitrógeno, antes de analizarse con CL-EM/EM usando monitorización de reacciones múltiples (MRM) o monitorización de reacciones seleccionadas (SRM), barrido de iones producto, barrido de iones precursores y barrido de pérdidas neutras constantes.

9.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este procedimiento operativo normalizado sirve para la determinación de residuos de sulfonamida y tetraciclina en múltiples muestras ambientales mediante CL-EM/EM.

Las matrices de prueba se dividen en sólidas/semisólidas y acuosas. Las matrices sólidas/semisólidas son principalmente suelo, estiércol y compost de estiércol y sedimentos; las acuosas son tierra fresca y aguas corrientes, así como agua salina de mar.

Los analitos de interés son antimicrobianos (como tetraciclinas y sulfonamidas) utilizados en las prácticas de ganadería y la acuicultura. La concentración de interés es la más baja que sea razonablemente posible.

9.3. MATERIALES

Se requieren las siguientes sustancias químicas, reactivos y material:

Muestras acuosas/(semi)sólidas: botella de muestras, recipiente de PTFE o de plástico equivalente resistente al disolvente orgánico con tapón de rosca; tapones de botellas (con membrana de fluoropolímero); reactivos de grado analítico.

9.3.1. Patrones/soluciones patrón

- a) Soluciones patrón
 - Se utilizan materiales de pureza y composición conocidas o se compran como soluciones/mezclas con certificación de pureza, concentración y autenticidad.
 - Para los patrones de pureza $\geq 98\%$, no es necesario corregir el peso en el cálculo de la concentración.
- b) Solución madre
 - Se disuelve una cantidad adecuada de material de referencia analizado o de patrón puro en un solvente apropiado (10 mg en un matraz aforado con tapón de vidrio esmerilado de 10 ml y se completa hasta la marca con MeOH).
 - Se almacenan las soluciones patrón en la oscuridad por debajo de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales con tapón de rosca con membrana de fluoropolímero o bajo un gas no reactivo (como nitrógeno).
 - Se hace una marca en el matraz en el nivel de la solución, de manera que pueda detectarse la pérdida de solvente por evaporación.
 - Si se evapora algo de solvente, deberá reemplazarse la solución.

- c) Solución adicionada
- Se prepara a un límite de cuantificación práctico o al límite reportable.
 - En este protocolo, se determina según la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{cantidad (ng)} \times \text{vol. dilución (ml)}}{\text{vol. inyección (\mu l)} \times \frac{1}{\text{muestra}}} \text{ tamaño (g)} \dots \dots \dots (5)$$

- d) Soluciones patrón marcadas con isótopo
- Se preparan las normas internas correspondientes de la misma manera que el patrón analítico que esté estudiándose.

9.3.2. Equipo

Se requiere lo siguiente: homogeneizador de tejidos, mezclador de vórtice; mezclador ultrasónico; horno; desecador; balanza analítica (precisión de pesada de 0,1 mg a 10 mg); medidor de pH; papel de pH (amplia gama); ultrasonificador; cartucho con balance HLB de extracción en fase sólida/modo mixto; intercambio catiónico (MCX) de 60 mg, Waters Oasis, 20 cc/1 g de LP, 60 μm, o equivalente; equipo de filtración de solventes; equipo de filtración al vacío con colector; filtro de fibra de vidrio, filtro de microfibra de vidrio Whatman de grado C (GF/C) con tamaño de poro de 0,45 μm; centrífuga; pipetas/micropipetas; evaporador orbital; equipo de evaporación de nitrógeno.

9.4.PROCEDIMIENTO

9.4.1. Preparación de las muestras

- Para el análisis se utilizan muestras, especialmente suelo con tamaño de partículas inferior a 2 mm (de lo contrario se homogeneizan/mezclan muestras para reducir el tamaño).
- En el caso del estiércol sólido/compost de estiércol, debe ser estiércol sólido sin antimicrobianos y compost de estiércol de granjas de producción orgánica.
- El estiércol líquido puede prepararse a partir de estiércol sólido con agua destilada. Se mezcla el estiércol sólido con agua destilada en proporción 1:1 (p/p) y se agita durante 5 horas; se recoge el filtrado.
- El suelo no debe tener antimicrobianos (donde no se hayan utilizado medicamentos veterinarios y estiércol).
- El suelo, los sedimentos y el estiércol/compost de estiércol para análisis no deben contener residuos. Debe eliminarse la mayor cantidad de agua posible mediante centrifugado o filtrado al vacío. La muestra debe secarse durante ≥12 horas a 110 °C.
- Las muestras acuosas se filtran para el análisis con un filtro GF/C con poro de 0,45 μm en vacío.

9.4.2. Extracción y concentración

- a) Para extraer los analitos de interés de las muestras acuosas se utiliza la extracción en fase sólida.
- b) Para extraer las muestras sólidas se utiliza la extracción ultrasónica con MeOH:tampón de EDTA McIlvaine, pH = 6 (90:10, v/v).
- c) Para eliminar coextractos/interferencias en los extractos sólidos, se utiliza el mismo procedimiento de extracción en fase sólida empleado para las muestras acuosas.
- d) Para evitar la quelación, especialmente de las tetraciclinas, se utiliza un tampón de EDTA McIlvaine (pH 6) como solvente de extracción.
- e) Las muestras de suelo se filtran con un filtro de diatomeas Celite 545 (menos de 1 g).
- f) Durante la preparación y manipulación de las muestras se utilizarán recipientes de plástico para evitar la adsorción, que podría contribuir a una baja recuperación.
- g) Para la limpieza de las muestras se utiliza material C18.

9.4.3. Resumen de la preparación de muestras

- a) Se pesan de 3 mg a 5 mg de muestra sólida (estiércol sólido).
- b) Se añade MeOH:tampón de EDTA McIlvaine de pH = 6 (90:10, v/v); 3 x 30 ml, y se ultrasonica durante 20 minutos.
- c) Se filtra al vacío con GF/C y material Celite 545.
- d) Se carga una columna C18 de extracción en fase sólida de 1 g en un colector (se activa y se pretrata con 5 ml de MeOH y 5 ml de tampón de EDTA McIlvaine de pH = 4).
- e) Se filtra la muestra.
- f) Se eluye la muestra con 10 ml de H₂O; se desecha el eluido y se añaden 20 ml de ácido oxálico de 0,01 M en MeOH.
- g) Se seca la muestra en atmósfera de N₂ y se añade MeCN:H₂O (10:90, v/v).
- h) Se inyecta la muestra sólida en el equipo de CL-EM/EM.
- i) Se miden ≤ 100 ml de muestra acuosa (H₂O/estiércol líquido).
- j) Se filtra al vacío con GF/C y material Celite 545.
- k) Se carga una columna C18 de extracción en fase sólida de 1 g en un colector (se activa y se pretrata con 5 ml de MeOH, 5 ml de tampón de EDTA McIlvaine de pH = 4).
- l) Se filtra la muestra.
- m) Se eluye la muestra con 10 ml de H₂O; se desecha el eluido y se añaden 20 ml de ácido oxálico de 0,01 M en MeOH.
- n) Se seca la muestra en atmósfera de N₂ y se añade MeCN:H₂O (10:90, v/v).

- o) Se inyecta la muestra acuosa en el equipo de CL-EM/EM.

9.4.4. Medición

Las condiciones del instrumento son las siguientes:

- Cromatografía líquida de ultra rendimiento Acquity UPLC C18, columna híbrida con puentes de etileno (100 mm x 2,1 mm; diámetro de partículas de 1,7 μm); fase de 20 mM NH_4HCO_2 /20 % MeOH programable con 20 mM NH_4HCO_2 /95 % MeOH.
- Transiciones MRM (m/z): clortetraciclina (CTC) 479>444, 479>462, oxitetraciclina (OTC) 461>426, 461>443, sulfametazina (SMT) 279>124, 279>186, sulfametoxazol (SMTZ) 254>108, 254>156 (99), sulfatiazol (STZ) 256>108, 255>156 (92) y como patrón interno $\text{SMTZ-}^{13}\text{C}_6$ 260>162 y $\text{SMT-}^{13}\text{C}_6$ 285>124 (cuadro 23).
- Las curvas de calibración se preparan utilizando los patrones en el solvente/tampón, en el extracto de matriz de control y en la matriz procesada por el procedimiento de extracción.

CUADRO 23. PARÁMETROS EM/EM PARA LOS ANALITOS Y LOS PATRONES INTERNOS

Nombre genérico	Clase	Transición MRM (m/z) Ion precursor → Ion producto	Voltaje cono (V)	CE (eV)
CTC	Tetraciclinas	479>444, 479>462	36	18, 18
4-epi-clortetraciclina (ECTC)	Tetraciclinas	479>444, 479>462	36	18, 18
4-epi-anidroclortetraciclina (EACTC)	Tetraciclinas	461>154, 461>444	36	18, 18
OTC	Tetraciclinas	461>426, 461>443	34	18, 14
4-epi-oxitetraciclina (EOTC)	Tetraciclinas	461>426, 461>444	34	18, 14
SMT	Medic. sulfa	279>124, 279>186	40	26, 16
$\text{SMT-}^{13}\text{C}_6$	Medic. sulfa	285>124	36	26
SMTZ	Medic. sulfa	254>108, 254>156 (99)	36	24, 16
$\text{SMTZ-}^{13}\text{C}_6$	Medic. sulfa	260>162	30	16
STZ	Medic. sulfa	256>108, 255>156 (92)	34	20, 14

9.4.5. Evaluación de los resultados

- El coeficiente de recuperación (%) de las tetraciclinas y sulfonamidas en las muestras acuosas (agua y estiércol líquido) debe ser superior al 70 % (79,4 a 116 y 76,46 a 110 en las muestras sólidas/semi-sólidas) como se detalla en el cuadro 24.
- Los límites reportables de las tetraciclinas y sulfamidas en suelo deben ser $<0,05 \text{ ngg}^{-1}$, en el compost sólido $<0,1 \text{ ngg}^{-1}$ (excepto SMTZ) y en el estiércol líquido/agua $0,0025 \text{ ngg}^{-1}$ (cuadro 25).

CUADRO 24. RECUPERACIÓN MEDIA DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS EN MUESTRAS AMBIENTALES SÓLIDAS/SEMISÓLIDAS Y ACUOSAS

Nombre genérico	Suelo/compost		Agua/muestras líquidas	
	Media (%)	Coefficiente de variación (cv %)	Media (%)	CV (%)
CTC	110,0	7,5	108,0	4,3
ECTC	71,3	8,2	78,2	5,4
EACTC	72,3	9,3	76,6	5,7
OTC	92,5	7,3	79,4	7,2
EOTC	80,3	6,4	82,4	6,7
SMT	101,0	8,4	101,0	7,3
SMTZ	88,7	8,2	89,5	6,3
STZ	77,5	9,4	81,2	7,8

CUADRO 25. CC ALFA, CC BETA Y LÍMITE REPORTABLE DE RESIDUOS DE TETRACICLINAS Y SULFONAMIDAS

Nombre genérico	CC _α (µg/kg)	CC _β (µg/kg)	Límite reportable (µg/kg)	Observación (m/z)
CTC	14,9	25,3	<0,05 (suelo) <0,1 (compost sólido)	479>444
OTC	19,2	32,7	<0,05 (suelo) <0,1 (compost sólido)	461>426
SMT	0,4	0,7	<0,05 (suelo) <0,1 (compost sólido)	279>124
SMTc	0,5	0,9	<0,05 (suelo) N/A (compost sólido)	254>108
STZ	0,5	0,9	<0,05 (suelo) <0,1 (compost sólido)	256>108

- Los resultados de las muestras acuosas se indican en ng/l, y las de los sólidos (muestras acuosas que contengan partículas visibles, sólidos, suelos, sedimentos, torta de filtro, compost) en µg/kg a partir del peso seco de la muestra.

9.4.6. Criterios de aceptabilidad

Los criterios de aceptabilidad deben basarse en la Decisión de la Comisión Europea [4] relativa al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados.

10. DETECCIÓN DE RESIDUOS DE CLORANFENICOL EN CARNE, TRIPA Y HIERBA MEDIANTE ELISA

10.1. PRINCIPIO

Se trata de una modificación de un método normalizado [5], en el que se extraen la carne, la tripa y los vegetales con H₂O. Después de centrifugar, se limpia una alícuota del sobrenadante mediante columnas Extrelut® NT3. Después de la incubación, se extrae el cloranfenicol (CAP) con diclorometano y el eluido final se diluye en solución tampón de fosfato salino con Tween (PBST).

El principio de detección es el inmunoensayo enzimático basado en la reacción antígeno-anticuerpo. Se preparan anticuerpos policlonales de conejo (PCA) en competencia con CAP conjugado con albúmina de suero bovino (BSA). Los pocillos de la placa de microtitulación se recubren con anticuerpos de cabra anticonejo.

10.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método de detección permite detectar CAP en la carne y la tripa (a 0,3 µg/kg) y en vegetales a 0,5 µg/kg. El método también es adecuado para la detección de glucurónido de CAP.

10.3. MATERIALES

10.3.1. Sustancias químicas/reactivos

Se requieren las sustancias químicas siguientes: acetato de etilo; iso-octano; triclorometano; n-hexano; H₂O desionizada.

10.3.2. Equipo

También se requiere lo siguiente: botellas y tapas universales de plástico (25 ml y 50 ml); sellador reactivo (50 ml); tubos de vidrio (12 ml); vaso de precipitado; puntas de pipeta (10 µl-200 µl; 100 µl-1000 µl y 500 µl-5000 µl); balanza analítica; vórtice con varias velocidades; centrífuga refrigerada; homogeneizador; concentrador de muestra; baño de agua; lector de ELISA; agitador de microplacas; pipeta de un solo canal (10 µl-100 µl, 100 µl-1000 µl y 500 µl-5000 µl); pipeta multicanal (25 µl-300 µl).

10.4. PROCEDIMIENTO

10.4.1. Especificidad y sensibilidad

- Esta técnica de ELISA utiliza un anticuerpo específico generado en conejos contra el conjugado CAP-proteína y es importante tener en cuenta la reactividad cruzada.
- Se prepara una curva de calibración lineal en el rango de 0,025 ng/ml a 2 ng/ml.
- No es necesario hidrolizar la muestra debido a la reactividad cruzada entre el CAP y el glucurónido de CAP.

10.4.2. Tratamiento de la muestra

a) Muestras de tejido (carne/tripa)

- Se homogeneizan ~10 g de tejido.
- Se pesan 3 g de la muestra homogeneizada y se transfieren a un tubo de vidrio.
- Se añaden 6 ml de acetato de etilo y se mezcla durante 10 minutos.
- Después de centrifugar (10 min, 2000 g), se añaden con la pipeta 4 ml de acetato de etilo a un tubo de vidrio y se evapora el acetato de etilo a 50 °C bajo una corriente suave de nitrógeno.
- Se disuelve el residuo graso en 1 ml de iso-octano/triclorometano (2:3, v/v) y se añade 1,0 ml de tampón de dilución de la muestra. Se agita la mezcla durante 1 minuto y se centrifuga (10 min, 2000g).
- Si se forma una emulsión en la capa superior, se coloca el tubo de ensayo en un baño de agua (80 °C) durante 5 minutos y se centrifuga de nuevo. Se toman con la pipeta 50 µl de la capa superior y se añaden a un tubo de ensayo.
- En la preparación de la muestra puede utilizarse isooctano/triclorometano o n-hexano. Cuando se usa iso-octano/triclorometano, se toman con la pipeta 50 µl de la capa superior; cuando se utiliza n-hexano, se toman 50 µl de la capa de debajo. Puede obtenerse una mejor recuperación cuando se utiliza iso-octano/triclorometano en lugar de n-hexano.

b) Muestra de hierba

- Se trituran de 10 g a 100 g de hierba.
- Se homogeneizan 5 g de la hierba triturada en 20 ml de agua destilada.
- Se transfieren con la pipeta 5 ml de esta mezcla a un tubo de vidrio.
- Se añaden 10 ml de acetato de etilo y se mezcla durante 30 minutos.
- Se centrifuga durante 10 minutos a 2000 g.
- Se toman con la pipeta 5 ml de acetato de etilo (capa superior), se añaden a un tubo de vidrio y se evapora a 50 °C bajo una corriente suave de nitrógeno.
- Se disuelve el residuo graso en 0,5 ml de iso-octano/triclorometano (2:3, v/v) y se añaden 0,5 ml de tampón de dilución de la muestra.
- Se mezcla en el vórtice durante 1 minuto y se centrifuga (10 min, 2000 g).
- Se toma una alícuota de 50 µl de la capa superior para la prueba de ELISA.

10.4.3. Preparación de los reactivos del kit de ELISA

Es importante tener en cuenta lo siguiente:

- a) Los reactivos que contiene el kit de ensayo son suficientes para llevar a cabo al menos 96 análisis (incluido el análisis de patrones). Cada patrón y cada muestra deben analizarse por duplicado.
- b) Los patrones listos para su uso se preparan en tampón de dilución. Cuando se utiliza otra matriz de muestra, los patrones o muestras adicionales deben prepararse en la matriz de la muestra utilizando la solución patrón de 100 ng/ml incluida en el kit.
- c) Antes de iniciarse la prueba, todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

- d) Cualquier reactivo que no se utilice debe almacenarse inmediatamente a una temperatura de +2 °C a +8 °C. Las soluciones patrón deben mantenerse en la oscuridad y almacenarse a una temperatura de +2 °C a +8 °C.
- e) Tampón de aclarado: el tampón de aclarado viene concentrado 20 veces. Por tanto, las diluciones se prepararán justo antes de su uso. Se preparan 40 ml de tampón de aclarado diluido (2 ml de disolución tampón de aclarado concentrada + 38 ml de agua destilada).
- f) Solución de sustrato: la solución de sustrato lista para usar precipita a 40 °C. Hay que asegurarse de que el vial que contiene esta solución está a temperatura ambiente (en la oscuridad); se mezcla el contenido antes de transferirlo con la pipeta a los pocillos.
- g) Solución de conjugado: se reconstituye el conjugado de CAP liofilizado con 4 ml de tampón de reconstitución/patrón cero; se mezcla bien y se mantiene en la oscuridad hasta su uso.
- h) Solución de anticuerpos: se reconstituyen los anticuerpos liofilizados suministrados en un vial con 4 ml de tampón de reconstitución/patrón cero; se mezcla bien y se mantiene en la oscuridad hasta su uso.
- i) Tampón de dilución de la muestra (concentrado x4): antes de preparar la dilución (20 ml de tampón + 60 ml de agua destilada) el tampón concentrado debe ponerse a temperatura ambiente y mezclarse bien. Se mezcla bien antes de la dilución con agua destilada. El tampón x4 diluido puede conservarse en refrigerador (entre +2 °C y +8 °C) hasta que expire.
- j) Solución estándar (100 ngml⁻¹): para preparar patrones en la matriz adecuada o para preparar soluciones adicionadas, se utiliza la solución patrón que contiene 100 ng de CAP por ml. Se diluye la solución patrón en la matriz correspondiente para obtener un intervalo de dilución de 2 ng/ml, 0,5 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,05 ng/ml y 0,025 ng/ml. La concentración de 0,0125 ng/ml puede incluirse como opción. El patrón cero debe prepararse a partir de la misma matriz que esté estudiándose.

10.4.4. Protocolo de ensayo

- a) Se prepara la muestra, asegurándose de que la placa de microtitulación (cuadro 26) está lista para usarse.
- b) Se añaden con la pipeta 100 µl de tampón de reconstitución/patrón cero por duplicado (pocillos A1, A2). Se añaden con la pipeta 50 µl de tampón de reconstitución/patrón cero por duplicado (pocillos B1, B2).
- c) Se añaden con la pipeta 50 µl de cada dilución patrón por duplicado (pocillos C1, 2 a H1, 2, es decir 0,025 ng/ml, 0,05 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,2 ng/ml, 0,5 ng/ml y 2 ng/ml).
- d) Se añaden con la pipeta 50 µl de cada solución de muestra por duplicado a los pocillos restantes de la placa de microtitulación.
- e) Se añaden 25 µl de conjugado PAC a todos los pocillos, excepto los pocillos A1 y A2.
- f) Se añaden 25 µl de solución de anticuerpos a todos los pocillos, excepto los pocillos A1 y A2.
- g) Se sella la placa de microtitulación y se agita durante 1 minuto.
- h) Se incuba la placa durante 1 hora en la oscuridad a 40 °C (con un intervalo aceptable de 20 °C a 80 °C).
- i) Se desecha la solución de la placa de microtitulación y se lava tres veces con el tampón de aclarado.

- j) Se vacía el contenido de cada pocillo de la placa dándole la vuelta y a continuación se hace un movimiento vertical seco.
- k) Se rellenan los pocillos hasta el borde con solución de aclarado (300 µl).
- l) Se repite tres veces el aclarado.
- m) Se da la vuelta a la placa y se vacían los pocillos con un movimiento vertical seco.
- n) Se coloca la placa invertida sobre toallas de papel absorbente y se golpea firmemente para eliminar la solución de lavado que quede en los pocillos.
- o) Hay que asegurarse de que no se seque ninguno de los pocillos antes de añadir el siguiente reactivo.
- p) Se desecha la solución de la microplaca y se lava tres veces con el tampón de aclarado.
- q) Cuando se utilice un equipo de lavado automático de placas, debe comprobarse que puedan aspirarse por completo todos los pocillos y que la solución de lavado se reparte bien, alcanzando el borde de cada pocillo durante cada ciclo de enjuague. El equipo de lavado debe programarse para realizar tres ciclos de aclarado.
- r) Se añaden con la pipeta 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo. Se incuba la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente (+20 °C a +25 °C).
- s) Se añaden 100 µl de solución de parada a cada pocillo.
- t) Se leen inmediatamente los valores de absorbancia a 450 nm.

Al interpretar los resultados, hay que tener en cuenta lo siguiente:

- a) Deben comprobarse juntas todas las muestras de control, las muestras en blanco y las muestras adicionadas.
- b) Las muestras en blanco no deben tener ninguna respuesta al CAP.
- c) En caso de que haya alguna muestra dudosa (muestra que contenga CAP), es necesario confirmarlo mediante CL-EM/EM.
- d) En el caso de las muestras de carne y vegetales: cuando se realiza la extracción en acetato de etilo, seguida de limpieza, deben dividirse entre 2 los equivalentes de CAP calculados a partir de la curva de calibración, a fin de expresar la concentración (ng/g) en el tejido.
- e) En el caso de las muestras de hierba: los equivalentes de CAP deben leerse directamente de la curva de calibración. Las muestras se distribuyen en los pocillos del ELISA como figura en el cuadro 26.

CUADRO 26. ESQUEMA DE LA DISTRIBUCIÓN EN LA PLACA DE MICROTITULACIÓN DE 96
POCILLOS DE ELISA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanco	Blanco	Muestra 1	Muestra 1								
B	Patrón 1	Patrón 1	Muestra 2	Muestra 2								
C	Patrón 2	Patrón 2	Muestra 3	Muestra 3								
D	Patrón 3	Patrón 3	Muestra 4	Muestra 4								
E	Patrón 4	Patrón 4	Muestra 5	Muestra 5								
F	Patrón 5	Patrón 5	Muestra 6	Muestra 6								
G	Patrón 6	Patrón 6	Muestras 7	Muestra 7								
H	Patrón 7	Patrón 7	Muestra 8	Muestra 8								

11. DETECCIÓN DE SULFONAMIDAS EN EL MÚSCULO DE POLLO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

11.1. PRINCIPIO

Se extrae músculo de ave de corral homogeneizado con acetato de etilo. El extracto se evapora hasta sequedad y se disuelve el residuo en MeOH:H₂O. Las muestras se desgrasan con éter de petróleo, se distribuyen 25 µl de extracto de cada muestra en una placa Whatman AL SIL G/UV de cromatografía en capa fina (TLC) y se revela con cloroformo:n-butanol (9:1, v/v). Se seca la placa y se observa a 366 nm después de tratarla con fluorescamina, utilizando un visualizador CAMAG, seguido del barrido de los puntos de analito con un escáner CMAC (cuando sea necesario).

11.2. ÁMBITO DE APLICACIÓN

Este método es adecuado para el análisis de sulfonamidas en músculo de pollo a un LMR de 100 µg/kg para los residuos combinados de todas las sustancias del grupo. El procedimiento operativo normalizado puede utilizarse para cribar residuos de sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfadoxina (SD), sulfametazina (SMZ) y sulfaquinoxalina (SQ) en la carne de ave a su LMR.

11.3. MATERIALES

11.3.1. Sustancias químicas/reactivos

Ácido acético glacial, acetato de etilo, éter de petróleo, HCl de 0,1 M, MeOH de calidad HPLC (Sigma, calidad HPLC), cloroformo y n-butanol, acetona, fluorescamina, NaOH.

Otros materiales necesarios: gas nitrógeno, H₂O Milli Q; placas de cromatografía en capa fina (TLC) (Whatman AL SIL G/UV); patrones de sulfonamida: SDZ (Sigma), STZ (Sigma), SMZ (Sigma), SD (Sigma), SQ (Sigma).

11.3.2. Equipo/material de vidrio

Se requiere lo siguiente: homogeneizador Ultra-Turrax; centrífuga; balanza analítica (0,01 g); densitómetro CAMAG TLC Scanner con sistema de análisis de datos e impresora; cámara de visualización para TLC; recipientes estándar de vidrio de laboratorio; tubos de centrífuga (15 ml); botellas de vidrio de color ámbar (100 ml); pipetas Pasteur; cubeta de revelado de TLC; tubos capilares (25 µl).

11.3.3. Soluciones

- a) Solución fluorescente (0,1 M). Se disuelven 10 mg en 100 ml de acetona. Se prepara una solución nueva cada vez.
- b) Sistema de solvente para TLC: cloroformo/n-butanol (90:10, v/v). Se añaden 9 ml de cloroformo, 1 ml de n-butanol y 10 ml de H₂O desionizada a un embudo de separación. Se equilibra mediante agitación durante 30 segundos y se deja que se separen las fases. Se recoge la mezcla inferior del solvente. Se prepara un solvente nuevo cada vez.

- c) Patrones madre (1 mg/ml). Se disuelven $10 \pm 0,1$ mg de patrón de sulfonamida, excepto SDZ y SQ, en MeOH en un matraz aforado de 10 ml y se rellena hasta la marca. Se disuelven SDZ y SQ en NaOH de 0,1 M. Se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales de color ámbar. Se preparan cada 12 meses.
- d) Patrón de mezcla intermedia (100 $\mu\text{g/ml}$): se añaden con la pipeta alícuotas de 1 ml a las soluciones madre de sulfonamida en un matraz aforado de 10 ml y se completa hasta la marca con MeOH. Se almacena a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un vial de color ámbar. Se prepara cada 3 meses.
- e) Patrones de trabajo (500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2000 ng/ml, 3000 ng/ml). Se miden 100 $\mu\text{g/ml}$ de patrón mezclado (cuadro 27), se añaden a un matraz aforado de 5 ml y se completa hasta la marca con MeOH. Se prepara semanalmente. Se almacena en viales de color ámbar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en refrigerador.

CUADRO 27. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES PARA LA CURVA PATRÓN

Concentración del patrón (ng/ml)	Volumen del patrón de 100 $\mu\text{g/ml}$ (para un volumen final de 5 ml)	Concentración del patrón (ng/punto)	Patrón equivalente ($\mu\text{g/kg}$)
0	0	0	0
500	25 μl	12,5	25
1000	50 μl	25	50
2000	100 μl	50	100
3000	150 μl	75	150

11.4. PROCEDIMIENTO

Las muestras de estudio se almacenan a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el ensayo. Deben descongelarse adecuadamente a temperatura ambiente. Se pesan ~ 5 g de tejido y se añaden a un vial de homogeneización.

11.4.1. Preparación de la muestra de control

- a) Se pesan dos porciones ($3,00 \pm 0,01$ g) de tejido de blanco triturado (sin sulfonamidas) y se añaden a sendos tubos de centrífuga de 15 ml.
- b) Se añaden 30 μl de la mezcla intermedia del patrón (10 mg/ml) a una muestra. Esto equivale a 100 $\mu\text{g/kg}$ de tejido.
- c) La muestra no adicionada se procesa a través del procedimiento de preparación como blanco.
- d) Las muestras de tejido se dejan reposar 15 minutos antes de la extracción.

11.4.2. Extracción

- a) Se añaden 0,5 ml de HCl (0,1 M) a la muestra y se agita en el vórtice durante unos 20 segundos.
- b) Se añaden 3 ml de H_2O Milli-Q y se agita en el vórtice a baja velocidad durante 10 segundos.
- c) Se homogeneizan las muestras usando Ultra-Turrax durante 2 minutos.
- d) Se añaden 4,5 ml de acetato de etilo y se mezclan las muestras durante 10 minutos utilizando el rotador de muestras.
- e) Se centrifuga durante 10 minutos a 3000 rpm.

- f) Se transfiere el sobrenadante con una pipeta Pasteur a un tubo de ensayo.
- g) Se repiten los pasos d), e) y f).
- h) Se evapora el sobrenadante hasta sequedad bajo una corriente de nitrógeno a 55 °C.
- i) Se disuelve el residuo seco en 1 ml de MeOH:H₂O (72:25, v/v) y se agita vigorosamente en el vórtice.
- j) Se añade 1 ml de éter de petróleo y se mezcla suavemente.
- k) Se desecha la capa de petróleo.
- l) Se repiten los pasos j) y k).
- m) Se transfiere la fase acuosa restante a microviales.

11.5. MEDICIÓN

11.5.1. Aplicación de las muestras

- a) Se recorta la placa de TLC de acuerdo con los requisitos (10 cm x 10 cm).
- b) Se aplican 25 µl de los patrones y las muestras o las muestras de control sobre la placa de TLC bajo una corriente de N₂.
- c) Se seca la placa con un secador.

11.5.2. Revelado

- a) Se añade el sistema de disolvente de TLC a la cubeta de TLC.
- b) Se mantiene la cubeta de TLC a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- c) Se revela la placa de TLC en modo lineal ascendente unidimensional.
- d) Se mantiene la placa de TLC hasta que el nivel de disolvente alcance el margen de 9 cm de la placa.
- e) Se retira la placa y se seca con un secador.

11.5.3. Derivatización

- a) Se pulveriza la placa de TLC con 0,1 mg/ml de solución de fluorescamina.
- b) Se seca la placa de TLC con un secador.

11.5.4. Detección

- a) Se observan las placas de TLC reveladas en la cámara de visionado.
- b) Se realiza un barrido de la placa de TLC con un escáner de TLC.
- c) Se visualizan/escanean las placas a 366 nm.

11.5.5. Cálculos/evaluación

- a) Se identifica cada sulfonamida usando el valor del factor de retención (fR) mediante la comparación con la posición de los respectivos patrones de sulfonamidas en la placa.
- b) Se hace un barrido de los puntos y se compara el área del pico de la sulfonamida correspondiente con el área del pico del patrón de control establecido en el límite máximo de residuos (LMR).

11.5.6. Criterios de aceptación

Los resultados deben cumplir las condiciones siguientes:

- a) Los puntos de los patrones (equivalentes al nivel del LMR) deben ser claramente visibles. El valor del barrido debe encontrarse entre la media y ± 2 veces la desviación estándar (SD) de los valores de referencia.
- b) No debe haber respuestas en las muestras de control negativo que superen el 10 % de la respuesta equivalente al LMR.
- c) La respuesta en la muestra de control positiva (equivalente al nivel del LMR) debe ser superior al 50 % de la respuesta del patrón correspondiente (equivalente al LMR).
- d) Los valores del control positivo deben anotarse en el gráfico de control de calidad.

Las muestras cuya respuesta supere el LMR más dos veces la desviación estándar relativa (RSD de validación de la repetibilidad del experimento) se consideran positivas.

12. VALIDACIÓN DE INMUNOENSAYOS

Resumen

Se proporcionan orientaciones prácticas para estimar las características de funcionamiento de los métodos analíticos, a saber, la especificidad, la reactividad cruzada de la matriz, el límite de detección, la capacidad de detección (CCB), la repetibilidad, la veracidad y la recuperación, la estabilidad del analito, la robustez, y los criterios de aceptabilidad de las técnicas de inmunoensayo para residuos de medicamentos veterinarios. El protocolo puede adaptarse a las condiciones particulares de cada laboratorio y utilizarse como procedimiento operativo normalizado.

12.1. INTRODUCCIÓN

La validación es el medio por el que se obtiene la prueba de que un método analítico es adecuado para el propósito para el que se va a aplicar. El procedimiento de validación utilizado para un inmunoensayo reflejará que el inmunoensayo es una prueba de cribado y si la prueba se utiliza o no para generar resultados cuantitativos. Las pruebas de cribado están diseñadas para dar una baja incidencia de resultados falsos conformes (falsos negativos) en la concentración de interés. En cambio, puede tolerarse una proporción de resultados falsos no conformes (falsos positivos). El procedimiento de validación adoptado para un inmunoensayo debe reflejar esta importante distinción en los criterios de funcionamiento. Diversas autoridades en la materia han elaborado directrices para validar las pruebas analíticas utilizadas en el análisis de residuos, como la Decisión 2002/657/CE de la Comisión de la Unión Europea [4].

12.1.1. Especificidad del método

La especificidad se refiere aquí a la capacidad de distinguir entre el analito que se está midiendo y otras sustancias que pueden interferir. En el inmunoensayo, la especificidad del procedimiento es una característica del anticuerpo utilizado en la prueba. Deben hacerse pruebas de reactividad cruzada de los compuestos con estructuras químicas similares a las del analito o los analitos de interés con relación al anticuerpo.

12.1.1.1. Evaluación de la reactividad cruzada en la matriz

La presencia de la matriz en un ensayo afecta en gran medida a la interacción que se produce entre un anticuerpo y un analito y puede tener efectos importantes sobre la reactividad cruzada del anticuerpo.

Debe evaluarse la reactividad cruzada individual para cada matriz a la que se aplicará el ensayo.

12.1.2. Límite de detección del ensayo

- En este método, el límite de detección es un valor por encima del cual se puede concluir que el analito está presente en una muestra. Puede determinarse mediante el análisis de al menos 20 muestras en blanco por el procedimiento que se esté validando. Se toma como límite de detección la concentración media observada en la población de muestras en blanco más tres veces la desviación estándar de la media. Esto puede usarse en pruebas cuantitativas o cualitativas.

- Por ejemplo, se someten a ensayo 20 muestras de músculo de ave de corral para determinar la presencia de CAP mediante un método ELISA, y la concentración media detectada es de 0,05, con una desviación estándar de 0,04 µg/kg. El límite de detección sería entonces de 0,17 µg/kg.

12.1.2.1. $CC\beta$

- El $CC\beta$ es el contenido mínimo de una sustancia que puede detectarse en una muestra con una probabilidad de error β . De acuerdo con las directrices de la UE, en las pruebas de cribado se permite un porcentaje máximo de falsos conformes (probabilidad de error) de 5 % o menos [4].
- Por ejemplo, se añaden diferentes concentraciones de cloranfenicol (0,15 µg/kg, 0,20 µg/kg y 0,25 µg/kg) a 20 muestras en blanco. Si el límite de detección es de 0,17 µg/kg y 19 de las 20 muestras analizadas (el 95 %) son no conformes, se puede asignar al $CC\beta$ el valor aproximado de 0,20 µg/kg
- El valor de $CC\beta$ debe determinarse para cada matriz individual y diferencias de amplitud.

12.1.2.2. $CC\beta$, límites máximos de residuos y límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL)

- Antes de iniciar la validación del método, hay que determinar cuál debe ser la $CC\beta$ para las sustancias sujetas a un límite máximo permitido de residuos y a un límite mínimo de funcionamiento exigido.
- Para los compuestos sujetos a un límite máximo permitido de residuos, la $CC\beta$ debe ser aproximadamente el 50 % del límite.
- Para las sustancias sujetas a un límite mínimo de funcionamiento exigido, la $CC\beta$ debe ser lo más baja posible y sin duda menor que el límite mínimo exigido.

12.1.3. Repetibilidad

Los datos de repetibilidad solo se requieren para las pruebas cuantitativas y semicuantitativas.

- Normalmente, se mide añadiendo la misma concentración de analito a un número (≥ 10) de muestras.
- Se extraen las muestras y se mide la concentración de medicamento detectada en un único procedimiento de inmunoensayo (determinación de la variación intraensayo).
- Se repite el procedimiento durante al menos dos días más para calcular la variación entre ensayos.
- Los resultados se expresan porcentualmente como coeficientes de variación (CV), la relación porcentual entre la media y la desviación estándar.
- Para las sustancias sujetas a un límite máximo permitido de residuos, se enriquece cada combinación de especie y matriz a razón de 0,5, 1,0 y 1,5 veces el límite máximo permitido ($n > 5$).
- Los resultados del análisis se registran como media y coeficiente de variación para cada combinación de especie y matriz.

- Para las sustancias sujetas a un límite mínimo de funcionamiento exigido, se enriquece cada combinación de especie y matriz a razón de 1,0, 1,5 y 2 veces la CC β (n>5).
- Los resultados del análisis se registran como media y coeficiente de variación para cada combinación de especie y matriz.

12.1.4. Veracidad y recuperación

Puede prepararse una curva de calibración añadiendo los calibradores a muestras en blanco y extrayendo estas muestras por el mismo procedimiento utilizado para las muestras desconocidas.

- Para una verdadera recuperación, se preparan dos curvas de calibración. En una serie, se añaden los calibradores antes de la extracción de la muestra, y en la segunda, se añaden los calibradores después de la extracción de la muestra (es decir, el 100 % del valor).
- Las recuperaciones pueden calcularse para la primera serie de calibradores con relación a una curva de calibración construida a partir de la segunda serie.

12.1.5. Estabilidad del analito

Se elabora un protocolo para determinar la estabilidad de los patrones preparados, tanto en condiciones de luz como de oscuridad, y en un rango de temperaturas tan amplio como sea posible (por ejemplo, de -17 °C a 23 °C y de +4 a +8 °C).

Durante los experimentos:

- Siempre que sea posible, se utilizará la CL-EM/EM como método de referencia.
- Cuando se quiera utilizar el inmunoensayo para determinar la estabilidad de un analito, puede utilizarse una serie de curvas de calibración para comparar los resultados, por ejemplo, usando el mismo conjunto de patrones, con reactivos almacenados en la oscuridad durante 1, 2 y 4 semanas a +4 °C.
- La prueba de estabilidad del analito en la matriz se realizará utilizando preferentemente material real.
- A falta de material real, las mediciones pueden realizarse usando muestras adicionadas.
- Las muestras se adicionan a una concentración “significativa” (por ejemplo, al límite máximo permitido o al límite mínimo de funcionamiento exigido).
- Las muestras adicionadas se almacenan en congelador y se analizan a intervalos regulares a lo largo de un período de tiempo.
- En caso de que se produzcan demoras entre la preparación de los extractos de las muestras y su posterior análisis, deben generarse datos para demostrar que no se produce una pérdida significativa de analitos durante ese período de demora.
- Se adiciona con analitos una serie de muestras y se extraen (para determinar la pérdida). La mitad de los extractos deben ensayarse inmediatamente y la otra mitad se almacena a +4 °C y se ensaya a las 24 horas.

12.1.6. Robustez

- Se mide la sensibilidad del ensayo a otras variables, como el operador, el equipo, el entorno del laboratorio y los reactivos.
- Se repiten los ensayos al menos tres veces, utilizando en lo posible diferentes operadores, diferentes equipos y diferentes lotes de reactivos.

12.1.7. Criterios de aceptabilidad

En el procedimiento operativo normalizado deben incluirse criterios de aceptabilidad para la prueba de ELISA (una vez que se haya validado totalmente el ensayo y que se considere lo suficientemente sensible y específico para el uso rutinario).

Podrían incorporarse los posibles criterios siguientes:

- Absorbancia del patrón cero superior a 0,5 e inferior a 1,6 unidades de densidad óptica.
- Densidad óptica deseada de 1,0 con un tiempo de revelado de 8 a 16 minutos (objetivo: 12 minutos).
- Absorbancia del punto medio del calibrante en relación con el patrón cero calculado de la siguiente manera: porcentaje del punto medio = 100 veces la absorbancia del punto medio del calibrante, dividida por la absorbancia del patrón cero.
- Reducción de la densidad óptica superior al 60 % (una firme indicación de que la sensibilidad del método es suficiente para el análisis).
- Examinar muestras idénticas a cada muestra utilizando el % de coeficiente de variación. Este debe ser menor o igual a 20. Cuando el coeficiente de variación sea mayor de 20 y todas las muestras idénticas estén por encima o por debajo del nivel de acción, entonces debe aceptarse la media. Cuando el coeficiente de variación sea mayor de 20 y las concentraciones se sitúen en el nivel de acción, debe repetirse el análisis.
- Las muestras de control deben dar la interpretación correcta (un control negativo da un resultado negativo).

13. VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE CRIBADO PARA LA DETECCIÓN DE RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

13.1. ÁMBITO DE APLICACIÓN

El conjunto de métodos analíticos de cribado que se utilizan para detectar residuos de medicamentos veterinarios actualmente es variado y comprende, entre otros, las técnicas de inmunoensayo, inhibición microbiológica, bioensayo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC). Los métodos de cribado pueden ser procedimientos cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos. La información que sigue a continuación es una guía sobre el nivel mínimo de validación requerido para demostrar la adecuación para la finalidad de todos los métodos de cribado. Los elementos elegidos para la validación de los métodos cualitativos y semicuantitativos variarán en función de cada método. La Comisión Europea ha establecido criterios de funcionamiento de los métodos analíticos para la detección de residuos de determinadas sustancias [4].

13.2. EL PLAN DE VALIDACIÓN

- El plan de validación se aplica a todos los métodos existentes o en proceso de desarrollo.
- El método debe estar en un estado avanzado de desarrollo y el procedimiento debe documentarse en forma de procedimiento operativo normalizado.
- En el plan de validación debe determinarse el ámbito de aplicación del método y especificarse la validación. El ámbito de aplicación incluirá el intervalo de concentraciones sobre el que vaya a utilizarse el método y el tipo de tejido y las especies que vayan a analizarse.
- Podrán añadirse otros parámetros con el tiempo, y se modificará según sea necesario el plan de validación.
- Para los métodos que estén en uso, podrán utilizarse los datos existentes para apoyar la validación (siempre que se hayan cumplido las condiciones que se especifican en el procedimiento operativo normalizado y el plan de validación).
- En su caso, una vez que se haya completado la validación, el plan de validación y los datos se someterán a una persona designada para su auditoría.
- Tras la auditoría, deberá revisarse el procedimiento operativo normalizado (y en consecuencia los parámetros de calidad conexos).
- Si se realizan cambios, deberá documentarse su influencia y, si es necesario, llevarse a cabo una nueva validación.

13.3. VALIDACIÓN POR MATRIZ Y ESPECIE

- El método debe validarse en la matriz o matrices para las que se destina el ensayo.
- Si se utiliza para el análisis de una o más especies, y múltiples matrices, deben compararse para cada especie elementos fundamentales de la validación, como la curva patrón, la recuperación y la variación entre ensayos.
- Si no existen diferencias significativas, se aplicará el método a esas especies y se llevará a cabo la validación en la especie/matriz principal.
- En caso de que existan diferencias significativas, se llevará a cabo la validación completa para cada especie/matriz.

13.3.1. Especificidad/selectividad

13.3.1.1. *Inmunoensayos*

En los inmunoensayos:

- La validación ayuda a evaluar la capacidad de reacción cruzada del antisuero con cualquier compuesto que interfiera en el ensayo. Se deben realizar reacciones cruzadas del antisuero en la matriz o matrices de la muestra a las que se destina el método.
- La validación también permite evaluar la capacidad del método para detectar diversos medicamentos pertenecientes a una familia.
- Deben seleccionarse los medicamentos que vayan a investigarse, señalando los factores de interés (por ejemplo, la prevalencia probable del compuesto en la matriz, su disponibilidad para su uso en la producción animal y posibles análogos).

13.3.1.2. *TLC y HPLC*

- Se evalúa la especificidad de métodos químicos, como la HPLC y la TLC, mediante la determinación de factores como los tiempos de retención (RT), los valores del factor de retención (RF) y los espectros.
- Las determinaciones iniciales pueden llevarse a cabo con tampón, disolvente o fase móvil, según corresponda.
- A continuación, se realizan determinaciones adicionales en la matriz a la que se aplicará el método (se comparan los resultados con el perfil del patrón del ensayo).
- Se adicionan diversos medicamentos al tejido/matriz que corresponda y se lleva a cabo el análisis de forma normal.
- Los medicamentos se seleccionan teniendo en cuenta la prevalencia probable del compuesto en la matriz, su disponibilidad para su uso en la producción animal y posibles análogos.

13.3.1.3. *Ensayos de inhibición microbiana y bioensayos*

- Se determina la especificidad/selectividad con respecto a factores como enzimas ambientales, desinfectantes y naturales.
- El efecto se evalúa sometiendo a ensayo diversas muestras de las que se sepa que no contienen medicamentos de cada una de las matrices que vayan a analizarse.
- Para determinar la especificidad de los métodos de inhibición cuantitativos (por ejemplo, antimicrobianos en alimentos para animales), se calcula preferentemente el paralelismo del rango del patrón y los rangos de los patrones que contengan otros medicamentos que puedan darse como sustancias interferentes.

13.3.2. CC α de sustancias prohibidas

- Para las sustancias prohibidas el límite de decisión CC α puede considerarse la concentración más baja a la que un método puede discriminar con una certeza estadística de $1-\alpha$ que el analito identificado está presente.

- Se analizan 20 muestras negativas de cada matriz y se calcula el límite de detección usando la media más tres desviaciones estándar.
- Habrá que asegurarse de que las muestras negativas proceden de diferentes animales y, cuando sea posible, confirmar que son negativas por un método diferente.

13.3.3. CC α de sustancias sujetas a un límite máximo permitido

- En el caso de las sustancias para las que se haya establecido un límite máximo, se analizan al menos 20 muestras negativas por cada matriz enriquecida con el analito a la concentración correspondiente al límite.
- La concentración media en el límite permitido más 1,64 veces la desviación estándar correspondiente será igual al CC α ($\alpha = 5\%$).

13.3.4. CC β de sustancias prohibidas

- Se analizan 20 muestras en blanco representativas enriquecidas al nivel de interés en función del CC α del método.
- Si se declaran positivas todas las muestras enriquecidas, es decir, mayores que el CC α , entonces la CC β será inferior al nivel de enriquecimiento.
- Si se declaran positivas 19 de las muestras enriquecidas, entonces la CC β será igual al nivel de enriquecimiento.
- Si se declaran positivas 18 de las muestras enriquecidas o menos, entonces la CC β será superior al nivel de enriquecimiento.

13.3.5. CC β de sustancias sujetas a un límite máximo permitido

- Se analizan 20 muestras en blanco representativas enriquecidas al límite máximo permitido o por debajo de este (por ejemplo, la mitad del límite máximo cuando sea posible).
- Si se declaran positivas todas las muestras enriquecidas (por encima del CC α), entonces la CC β será inferior al nivel de enriquecimiento.
- Si se declaran positivas 19 de las muestras, entonces la CC β será igual al nivel de enriquecimiento.
- Si se declaran positivas 18 de las muestras enriquecidas o menos, entonces la CC β será superior al nivel de enriquecimiento.

13.3.6. Estabilidad del analito en la solución

- Se preparan nuevas soluciones madre del analito o los analitos y se diluyen para obtener las concentraciones patrón y de control, tal y como se especifique en el procedimiento operativo normalizado del método.
- Se analizan los patrones después de la preparación y luego se vierten volúmenes adecuados en recipientes apropiados, se etiquetan y se almacenan de la siguiente manera: diez alícuotas en la oscuridad y a la luz a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Se comprueban las alícuotas comparándolas con un patrón nuevo y una serie de control 1, 2, 3 y 4 semanas después de la preparación.

- Habrá que asegurarse de que la escala de tiempo del estudio refleja las condiciones de almacenamiento normales de los patrones y el tiempo de almacenamiento.

13.3.7. Estabilidad del analito en la matriz

- Se utiliza preferentemente material real, pero si no se dispone de ello puede utilizarse material adicionado.
- Se selecciona una concentración o rango adecuada, por ejemplo, la CC β o el límite máximo de residuo.
- Se distribuyen las muestras en 5 alícuotas para cada concentración y adición al nivel que se haya seleccionado.
- Se analiza una alícuota inmediatamente y el resto pasadas 1, 2, 4 y 20 semanas de almacenamiento a -20 °C.

13.3.8. Estabilidad del analito en el extracto

- Se evalúa la estabilidad en los métodos en que el analito se extraiga en una solución final.
- Se determina la estabilidad en la solución analítica y en cualquier otra fase en que se deje la muestra.
- Se extraen 3 conjuntos de controles (6 repeticiones de cada uno) por ensayo. Uno de ellos debe estar terminado antes de un día.
- Se guardan los otros conjuntos y se completan en otras fechas que reflejen el uso probable del método en condiciones normales de ensayo.
- Se comparan los resultados entre los diferentes períodos de tiempo y se determina cualquier diferencia significativa.

13.4. CURVA DE CALIBRACIÓN

- Se emplea la variación entre ensayos e intraensayo de la curva patrón (para establecer los valores de aceptabilidad de cada punto patrón).
- Se ensayan 3 curvas en el mismo análisis para determinar la variación intraensayo.
- Se determina la variación entre ensayos a medida que progresa la validación.
- En los datos de validación se describirá la fórmula matemática de la curva y la bondad de ajuste de los datos.

13.5. REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

- Se prepara un conjunto de muestras y se adiciona el analito (o los analitos) para obtener un intervalo adecuado de concentraciones [es decir, 1, 1,5 y 2 veces la CC β o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite máximo permitido].
- Se analizan seis muestras idénticas en cada nivel.
- Se repiten esos pasos al menos dos veces con operadores diferentes y distintas condiciones ambientales (por ejemplo, lotes de reactivos, patrones, instrumentos, etc.).
- Se calcula la media y el coeficiente de variación de las muestras adicionadas.

13.6. VARIACIÓN ENTRE ENSAYOS E INTRAENSAYOS

- Se prepara un conjunto de muestras y se adiciona el analito (o los analitos) para obtener concentraciones equivalentes a 1, 1,5 y 2 veces la CCβ o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite máximo permitido.
- Se analizan al menos seis muestras idénticas en cada nivel.
- Se repiten esos pasos al menos en otras dos ocasiones.
- Se calcula la media y el coeficiente de variación de las muestras adicionadas.
- La concentración del analito puede estimarse a partir de otros parámetros disponibles, como tamaño de la zona, la densidad óptica o el porcentaje de absorbancia.
- Deberán especificarse los analitos y su concentración para el estudio e incluirse en el plan de validación.

13.7. RECUPERACIÓN

Para las recuperaciones:

- Se emplea material de referencia certificado (si se dispone de ello) o bien se adicionan muestras en blanco.
- Se seleccionan 18 alícuotas de una matriz en blanco y se enriquecen cada 6 de ellas 1, 1,5 y 2 veces la CCβ o 0,5, 1 y 1,5 veces el límite máximo permitido.
- Se añade el analito a la matriz negativa antes de añadir cualquier solvente y se permite que interactúe con la muestra durante un período de tiempo especificado en el procedimiento operativo normalizado antes del ensayo.
- Se analizan las muestras y se calcula la concentración en cada muestra.
- Se calcula la recuperación media (porcentaje de la concentración medida respecto de la concentración enriquecida) y el coeficiente de variación de los seis resultados a cada nivel.

13.8. ROBUSTEZ

- Se estima el efecto de variaciones menores razonables en el método.
- Se seleccionan factores como cambios de analista, la procedencia y la edad de los reactivos, disolventes, patrones y extractos de la muestra, la velocidad de calentamiento, la temperatura, el pH, el equipo utilizado o cualquier otro factor que pueda afectar al método de algún modo.
- Se identifican posibles factores que pudieran influir en los resultados.
- Se varía ligeramente cada factor.
- Se puede hacer referencia a los datos de validación.
- Se llevarán a cabo más experimentos en caso de que un factor influya significativamente en el resultado de la medición.

REFERENCIAS

- [1] ANASTASSIADES, M., LEHOTAY, S.J., STAJNBAHER, D., SCHENCK, F.J., “Fast and Easy Multi-residue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce”. *J AOAC Int.*, **86** 2 (2003) 412-431.
- [2] COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS. *A summary report on Florfenicol in Fish*. The European Agency for The Evaluation of Medicinal Products, Veterinary Medicine Evaluation Unit. EMEA/MRL/251/97-Final, julio 1997.
- [3] GRANJA, R.H., de LIMA, A.C., PATEL, R.K., SALERNOA, A.G., WANSCHER, A.C., “Monitoring of Florfenicol residue in fish muscle by HPL-UV with confirmation of suspect results by LC-MS/MS”. *Drug Test Anal.*, **4** Suppl 1 (2012) 125-129.
- [4] DECISIÓN DE LA COMISIÓN 2002/657/CE de 12 agosto de 2002 por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. DOCE, L 221 **45** (2002) 8.
- [5] EURO-PROXIMA B.V., *A microtiter plate based competitive enzyme immuno assay for screening and quantitative analysis of Chloramphenicol in various matrices Chloramphenicol Fast Elisa 5091 CAPF*. Arnhem, The Netherlands.

ABREVIATURAS Y SIGLAS

%	por ciento
~	aproximadamente
°C	grados celsius
μA	microamperio
μg/kg	microgramo por kilogramo
μl	microlitro
μm	micrómetro (micras)
AG	aminoglucósido
APCI	ionización química a presión atmosférica
Ar	argón
B ₀	unión máxima
C18	carbono 18
CC _α	límite de decisión
CC _β	capacidad de detección
CL-ESI-EM/EM	cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tandem
CPM	cuentas por minuto
CV	coeficiente de variación
Da	dalton
DMSO	sulfóxido de dimetilo
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EFS	extracción en fase sólida
ELISA	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ESI	ionización por electrospray
eV	electronvoltio
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FFA	florfenicol amina
FFC	florfenicol
FLD	detector de fluorescencia
g	gramo
g/l	gramos por litro
h	hora
H ₂ O	agua
HCl	ácido clorhídrico
HFBA	ácido heptafluorobutírico
HLB	balance hidrofílico-lipofílico
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
HRP	peroxidasa de rábano picante
IgG	inmunoglobulina G
IS	patrón interno
kg	kilogramo
kV	kilovoltios
l/h	litros por hora
LMR	límite máximo de residuos recomendado
m/z	relación masa/carga
Matriz post	patrón de matriz adicionada después de la extracción
Matriz pre	patrón de matriz adicionada previamente a la extracción
MeOH	metanol
mg	miligramo
MgSO ₄	sulfato de magnesio

min	minutos
ml	mililitro
ml/min	mililitros por minuto
mm	milímetros
mM	milimol
mmHg	milímetros de mercurio
mol/l	mol por litro
MRM	monitorización de reacciones múltiples
ms	milisegundos
NaCl	cloruro de sodio
NaOH	hidróxido de sodio
ng/μl	nanogramo por microlitro
ng/g	nanogramo por gramo
ng/ml	nanogramo por mililitro
nm	nanómetro
OIEA	Organismo Internacional de Energía Atómica
MeCN	acetonitrilo
p/p	peso por peso
PBS	tampón fosfato salino
POPOP	1,4-bis(5-fenil-2-oxazolilo benceno)
PPO	2,5-difeniloxazol
PSA	amina primaria secundaria
psi	libra por pulgada cuadrada
PTFE	politetrafluoroetileno
QuEChERS	rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro
r ²	coeficiente de regresión
RIA	radioinmunoensayo
rpm	revoluciones por minuto
RSD	desviación estándar relativa
s	segundo
SSNI	solución patrón secundaria uno
SSNII	solución patrón secundaria dos
TCA	ácido tricloroacético
TPP	fosfato de trifenilo
tR	tiempo de retención
USP	farmacopea de los Estados Unidos
UV	ultravioleta
V	voltaje
v/v	volumen por volumen
v/v/v	volumen por volumen por volumen
Vol	volumen
μg/ml	microgramo por mililitro

COLABORADORES EN LA REDACCIÓN Y REVISIÓN

- A. Cannavan (OIEA)
- E. G. Nacif (OIEA)
- Los participantes en el PCI que figuran a continuación:
 - Centro Nacional de Ciencias y Tecnologías Nucleares (Túnez).
 - Centro de Análisis Químicos y Ensayos Físicos, Centro Shenzhen de Control de Enfermedades (China).
 - Instituto de Seguridad Alimentaria Global-Escuela de Ciencias Biológicas, Universidad de Queen, Belfast (Reino Unido).
 - Instituto de Normas de Calidad y Tecnología de Ensayo de Productos Agropecuarios (IQSTAP), Academia China de Agronomía (China).
 - Kenya Agricultural Research Institute, Trypanosomiasis Research Centre (Actualmente Kenya Agricultural and Livestock Research Organization).
 - Laboratorio Microbióticos (Brasil).
 - Ministerio de Agricultura, Servicio Nacional de Sanidad Agraria (Perú).
 - Ministerio de Agricultura y Cooperativas, Departamento de Desarrollo Ganadero (Tailandia).
 - Ministerio de Agricultura y de Industria Ligera, Laboratorio Veterinario Nacional Central de Mongolia.
 - Ministerio de Inocuidad Alimentaria y Seguridad Farmacológica, Administración Regional Alimentaria y Farmacológica de Busan, Centro de Análisis de Alimentos y Medicamentos y Agencia de Cuarentena Animal y Vegetal (República de Corea).
 - Agencia Austriaca de Salud e Inocuidad de los Alimentos GmbH (Austria).
 - RIKILT – Centro Universitario y de Investigación de Wageningen (Países Bajos).
 - Universidad Técnica de Múnich (Alemania).
 - Universidad Estatal Paulista, Facultad de Medicina Veterinaria (Brasil).
 - Universidad de Gante, Facultad de Medicina Veterinaria (Bélgica).
 - Universidad de Peradeniya, Facultad de Medicina Veterinaria y Ciencias Pecuarias, Departamento de Salud Pública Veterinaria y Farmacología, Peradeniya (Sri Lanka).



IAEA

Organismo Internacional de Energía Atómica

N° 24

PEDIDOS DE PUBLICACIONES

En los siguientes países, las publicaciones de pago del OIEA pueden adquirirse a través de los proveedores que se indican a continuación o en las principales librerías locales.

Los pedidos de publicaciones gratuitas deben hacerse directamente al OIEA. Al final de la lista de proveedores se proporcionan los datos de contacto.

ALEMANIA

Goethe Buchhandlung Teubig GmbH

Schweitzer Fachinformationen

Willstätterstrasse 15, 40549 Düsseldorf, ALEMANIA

Teléfono: +49 (0) 211 49 874 015 • Fax: +49 (0) 211 49 874 28

Correo electrónico: kundenbetreuung.goethe@schweitzer-online.de •

Sitio web: <http://www.goethebuch.de>

BÉLGICA

Jean de Lannoy

Avenue du Roi 202, 1190 Bruselas, BÉLGICA

Teléfono: +32 2 5384 308 • Fax: +32 2 5380 841

Correo electrónico: jean.de.lannoy@euronet.be • Sitio web: <http://www.jean-de-lannoy.be>

CANADÁ

Renouf Publishing Co. Ltd.

20-1010 Polytek Street, Ottawa, ON K1J 9J1, CANADÁ

Teléfono: +1 613 745 2665 • Fax: +1 643 745 7660

Correo electrónico: order@renoufbooks.com • Sitio web: <http://www.renoufbooks.com>

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 800 865 3457 • Fax: +1 800 865 3450

Correo electrónico: orders@bernans.com • Sitio web: <http://www.bernans.com>

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Bernan Associates

4501 Forbes Blvd., Suite 200, Lanham, MD 20706-4391, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 800 865 3457 • Fax: +1 800 865 3450

Correo electrónico: orders@bernans.com • Sitio web: <http://www.bernans.com>

Renouf Publishing Co. Ltd.

812 Proctor Avenue, Ogdensburg, NY 13669-2205, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Teléfono: +1 888 551 7470 • Fax: +1 888 551 7471

Correo electrónico: orders@renoufbooks.com • Sitio web: <http://www.renoufbooks.com>

FEDERACIÓN DE RUSIA

Scientific and Engineering Centre for Nuclear and Radiation Safety

107140, Moscú, Malaya Krasnoselskaya st. 2/8, bld. 5, FEDERACIÓN DE RUSIA

Teléfono: +7 499 264 00 03 • Fax: +7 499 264 28 59

Correo electrónico: secnrs@secnrs.ru • Sitio web: <http://www.secnrs.ru>

FRANCIA

Form-Edit

5 rue Janssen, PO Box 25, 75921 París CEDEX, FRANCIA

Teléfono: +33 1 42 01 49 49 • Fax: +33 1 42 01 90 90

Correo electrónico: fabien.boucard@formedit.fr • Sitio web: <http://www.formedit.fr>

Lavoisier SAS

14 rue de Provigny, 94236 Cachan CEDEX, FRANCIA

Teléfono: +33 1 47 40 67 00 • Fax: +33 1 47 40 67 02

Correo electrónico: livres@lavoisier.fr • Sitio web: <http://www.lavoisier.fr>

L'Appel du livre

99 rue de Charonne, 75011 París, FRANCIA

Teléfono: +33 1 43 07 43 43 • Fax: +33 1 43 07 50 80

Correo electrónico: livres@appeldulivre.fr • Sitio web: <http://www.appeldulivre.fr>

HUNGRÍA

Librotrade Ltd., Book Import

Pesti út 237. 1173 Budapest, HUNGRÍA

Teléfono: +36 1 254-0-269 • Fax: +36 1 254-0-274

Correo electrónico: books@librotrade.hu • Sitio web: <http://www.librotrade.hu>

INDIA

Allied Publishers

1st Floor, Dubash House, 15, J.N. Heredi Marg, Ballard Estate, Bombay 400001, INDIA

Teléfono: +91 22 4212 6930/31/69 • Fax: +91 22 2261 7928

Correo electrónico: alliedpl@vsnl.com • Sitio web: <http://www.alliedpublishers.com>

Bookwell

3/79 Nirankari, Delhi 110009, INDIA

Teléfono: +91 11 2760 1283/4536

Correo electrónico: bkwel@nde.vsnl.net.in • Sitio web: <http://www.bookwellindia.com/>

ITALIA

Libreria Scientifica "AEIOU"

Via Vincenzo Maria Coronelli 6, 20146 Milán, ITALIA

Teléfono: +39 02 48 95 45 52 • Fax: +39 02 48 95 45 48

Correo electrónico: info@libreriaaeiou.eu • Sitio web: <http://www.libreriaaeiou.eu/>

JAPÓN

Maruzen-Yushodo Co., Ltd.

10-10, Yotsuyasakamachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0002, JAPÓN

Teléfono: +81 3 4335 9312 • Fax: +81 3 4335 9364

Correo electrónico: bookimport@maruzen.co.jp • Sitio web: <http://maruzen.co.jp>

REPÚBLICA CHECA

Suweco CZ, s.r.o.

SESTUPNÁ 153/11, 162 00 Praga 6, REPÚBLICA CHECA

Teléfono: +420 242 459 205 • Fax: +420 284 821 646

Correo electrónico: nakup@suweco.cz • Sitio web: <http://www.suweco.cz>

Los pedidos de publicaciones, tanto de pago como gratuitas, se pueden enviar directamente a:

Sección Editorial del OIEA, Dependencia de Mercadotecnia y Venta

Organismo Internacional de Energía Atómica

Vienna International Centre, PO Box 100, 1400 Viena, Austria

Teléfono: +43 1 2600 22529 ó 22530 • Fax: +43 1 2600 29302

Correo electrónico: sales.publications@iaea.org • Sitio web: <http://www.iaea.org/books>

