

JORNADAS DE REFERENCIA 2024

RESIDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINARIOS

Análisis de florfenicol y sus metabolitos en
músculo por LC-MS/MS

Charo Velarte Moliner
Área de Análisis Químico de Alimentos
Laboratorio Salud Pública de Aragón



Florfenicol (FF) (B1a):
antibiótico de amplio
espectro de la familia
de los anfenicoles para
tratar infecciones
respiratorias en
múltiples especies

REGLAMENTO 37/2010

Florfenicol	Suma de florfenicol y de sus metabolitos medidos en florfenicolamina	Bovinos, ovinos y caprinos	200 µg/kg 3 000 µg/kg 300 µg/kg	Músculo Hígado Riñón	No debe utilizarse en animales que producen leche para consumo humano. No debe utilizarse en animales que producen huevos para consumo humano.	Antiinfecciosos/ Antibióticos
		Porcinos	300 µg/kg 500 µg/kg 2 000 µg/kg 500 µg/kg	Músculo Piel y grasa Hígado Riñón		
		Aves de corral	100 µg/kg 200 µg/kg 2 500 µg/kg 750 µg/kg	Músculo Piel y grasa Hígado Riñón		
		Peces	1 000 µg/kg	Músculo y piel en proporciones naturales		
		Todas las demás especies destinadas a la producción de alimentos	100 µg/kg 200 µg/kg 2 000 µg/kg 300 µg/kg	Músculo Grasa Hígado Riñón		

REGLAMENTO 808/2021

Florfenicolamina (FFA) **NMC = 20 µg/Kg** 1/10 del LMR

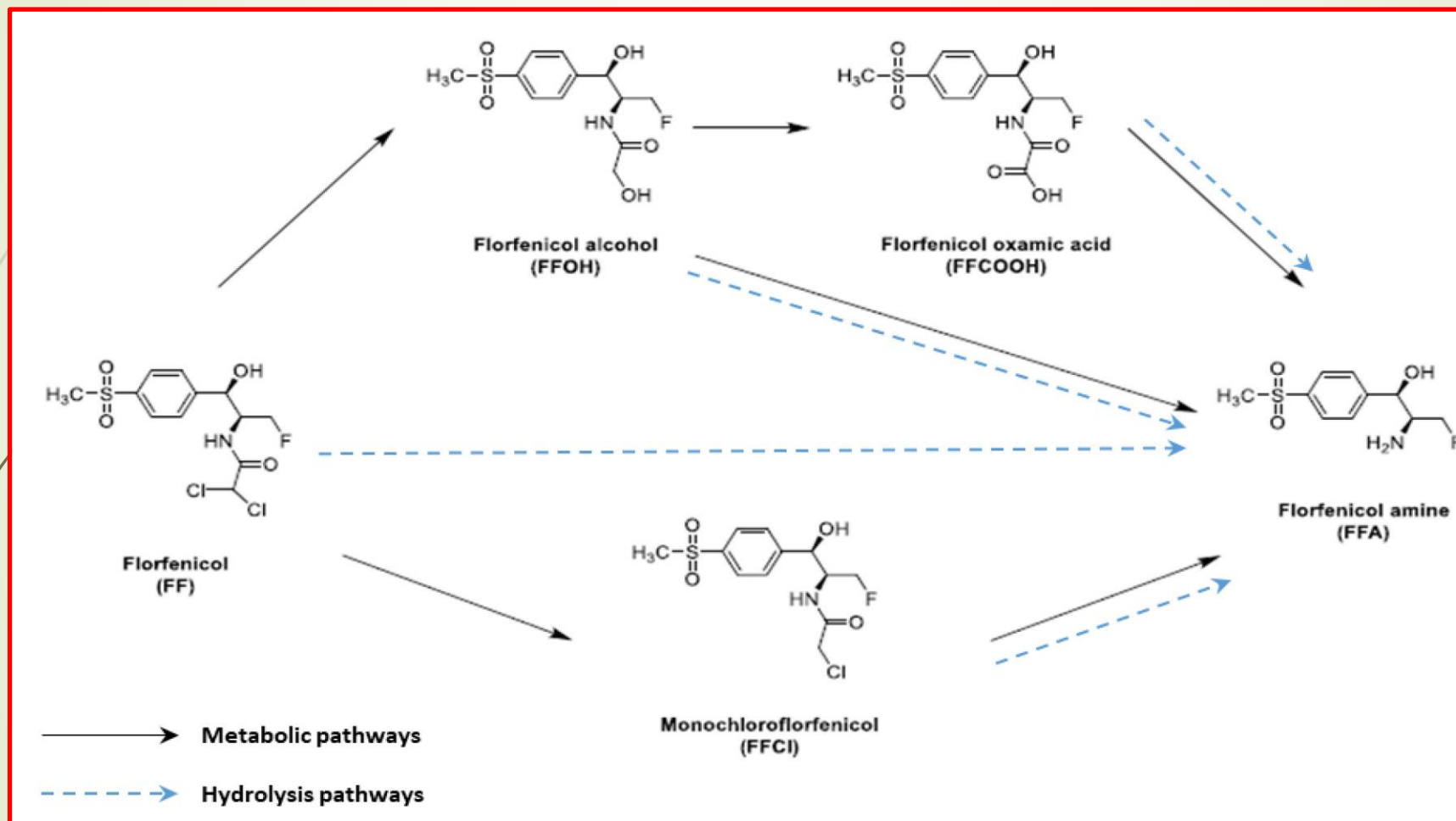
REPRODUCTION DEL MÉTODO DE ANSES



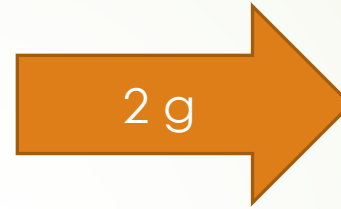
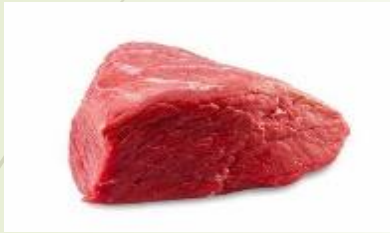
F/CHIM/SM/PTC/033 - Version 1

September 2022

METABOLISMO DEL FLORFENICOL EN MUSCULO



PROCEDIMIENTO



PD: FF+FFA+FF-D4+FFA-D4

BR: FF-D4

BM: FF-D4

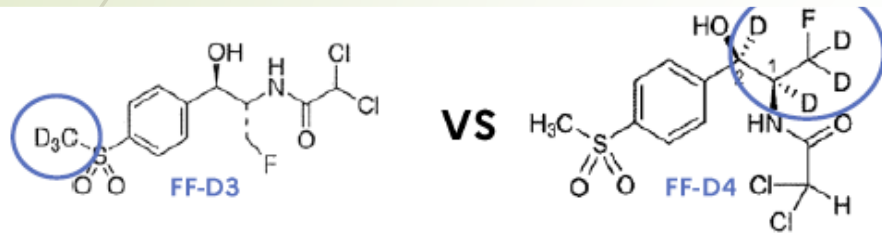
Muestra de control nivel NMC: FF (28,9 $\mu\text{g/Kg}$ = 20 $\mu\text{g/Kg}$ de FFA)+ FF-D4

Muestra de rutina: FF-D4



Relación peso molecular
FF/FFA = 1,445

PROCEDIMIENTO



Not use of IS in the bibliography

- ☒ FF-D3 : obtaining FFA + FFA-D3 after hydrolysis
- ☒ FF-D4 : obtaining FFA-D4 exclusively

PROCEDIMIENTO

1

- Hidrólisis (liberación de la matriz y transformación FF en FFA)

2

- Extracción con acetato de etilo

3

- Purificación con SPE

4

- Análisis por UHPLC-MS-MS

1

- Hidrólisis

HCl 6 N 95°C 2h
Vortex cada 30'



pH > 10 para garantizar todo FFA se encuentre sin carga

2

- Extracción con acetato de etilo

Evaporación a sequedad
Redisolución con ACN



3

- Purificación del extracto con cartucho HLB Prime (passthrough)

Evaporación a sequedad
Redisolución con agua:ACN 90:10

4

- Análisis por UHPLC-MS-MS

Método cromatográfico

Método de ANSES: columna Symmetry C18 100 mm x 2,1 mm; 3,5 μm

En el LSPA: columna Acquity HSS C18 100 mm x 2,1 mm; 1,8 μm

A: 1 mM de HFBA / 9.5 mM PFPA en agua

B: 1 mM de HFBA / 9.5 mM PFPA en ACN



Método MS

Modo ionización: **ESI+**

Voltaje capilar: **3kV**

Temperatura fuente: **150°C**

Temperatura de desolvatación: **650°C**

Flujo del gas del cono: **50 lph**

Flujo del gas de desolvatación: **1000 lph**

<u>Analito</u>	Tiempo (min)	Ion precursor	Ion producto	Dwell (s)	Voltaje del cono	Energía de colisión
FF	3.50	360	243.05/342.05	0.044	30	15/8
FFA	2.22	248.2	130.1/230.1	0.044	40	40/10
FFd4	3.49	362.3	344	0.100	40	8
FFAd4	2.21	252.2	234.1	0.044	40	10

VALIDACIÓN SEGÚN 808/2021

Validación convencional

Version 1.1, 25 November 2021
EURL Guidance Document on
Confirmation Method Validation

European Union
Reference Laboratories
supported by the



EURL Guidance Document on Confirmation Method Validation

VALIDACIÓN SEGÚN 808/2021

ALCANCE

Músculo especies bovina y porcina

NIVEL MÁS BAJO DE CALIBRACIÓN NMC

NMC = 1/10 LMR 20 µg/Kg

ESPECIFICIDAD

Especificidad > 20 muestras 10 de bovino y 10 de porcino

No se registran interferencias en la ventana de tiempos de las transiciones de FFA. Señales S/R<3

EFEECTO MATRIZ RELATIVO

20 muestras: 10 muestras de bovino y 10 muestras de porcino

Antes de la adición del disolvente de redisolución se añade FFA y su patrón interno

Criterio: CV%<20%

Analito	EMR (%)
FFA	1,2

Se demuestra la equivalencia entre especies por lo tanto es posible la validación de todo el alcance simultáneamente

PARÁMETROS ANALÍTICOS: VERACIDAD, REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

SERIES DE VALIDACIÓN

6 ME Nivel 1: 1/10 LMR bovino (20 µg/Kg)

6 ME Nivel 2: LMR bovino (200 µg/Kg)

6 ME Nivel 3: LMR porcino (300 µg/Kg)

6 ME Nivel 4: 1,5 LMR porcino (450 µg/Kg)

6 Rectas de calibrado (rango 20-600 µg/Kg)

(3 especie porcina y 3 especie bovina)

BM + 7 puntos

3 días diferentes

2 Analistas diferentes

Total 120 ME (60 porcino + 60 bovino)

PARÁMETROS ANALÍTICOS: VERACIDAD, REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD

Veracidad FFA

Concentración µg/Kg	Criterio 808	Resultado
≥ 10	80% - 120%	99-106%

Precisión FFA

Criterio 808

C µg/Kg	R	r
120-1000	16	11
10-120	22	15

C µg/Kg	R	r
20-450	2-13	1,5-6

CRITERIOS DE CONFIRMACIÓN

2 transiciones detectadas con $S/R > 3$

Tiempo de retención relativo (tRR) $\leq 1\%$

Ion Ratio tolerancia: $\pm 40\%$ respecto muestra de control o referencia

120/120

RECTAS DE CALIBRADO

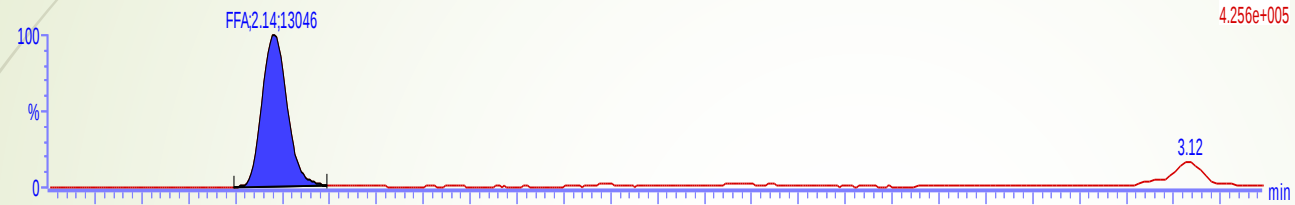
r^2	Residuales
0,98	$\pm 30\%$ primer punto $\pm 15\%$ siguientes

6 Rectas de calibrado (rango 20-600 $\mu\text{g/Kg}$)
(3 especie porcina y 3 especie bovina)

Bm + 7 puntos

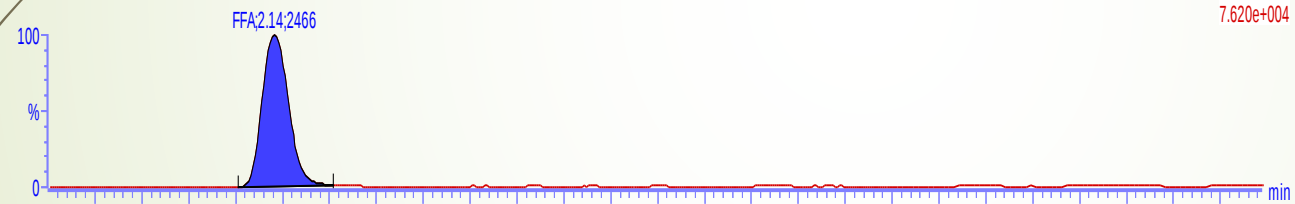
S/R FFA en el nivel NMC > 3

20240227_FF_NMC_M19 Smooth(Mn,1x2)



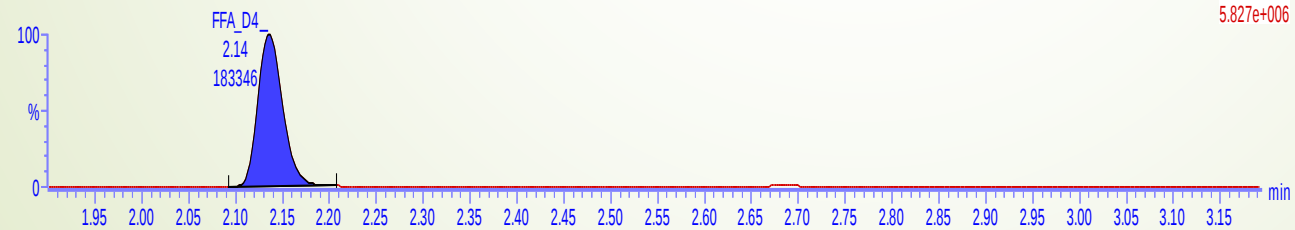
F4:M/RM of 2 channels,ES+
248.2 > 230.1
4.256e+005

20240227_FF_NMC_M19 Smooth(Mn,1x2)



F4:M/RM of 2 channels,ES+
248.2 > 130.1
7.620e+004

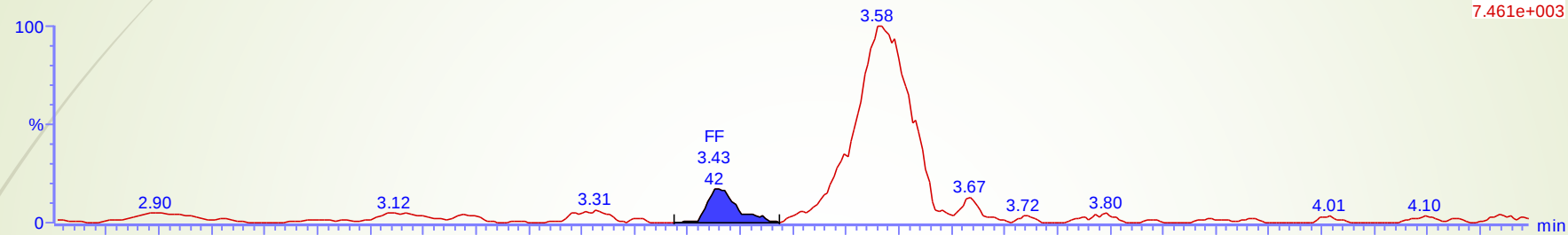
20240227_FF_NMC_M19 Smooth(Mn,1x2)



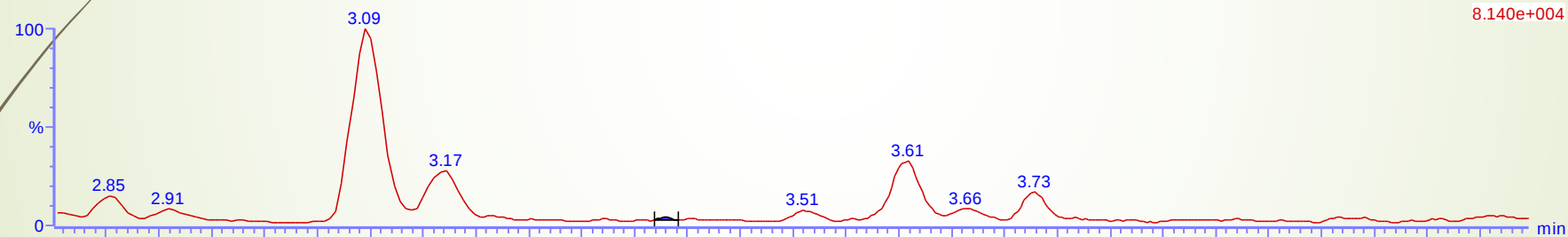
F1:M/RM of 1 channel,ES+
252.2 > 234.1
5.827e+006

No se registra señal ni de FF ni de FFD4

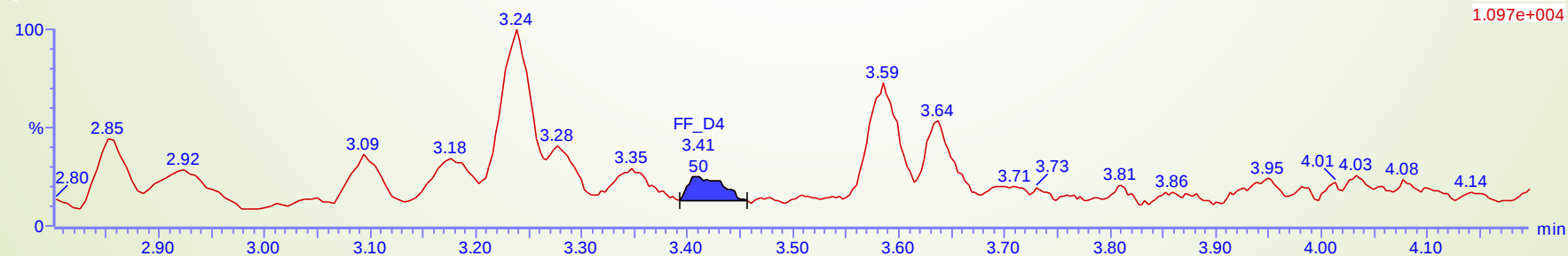
20240227_FF_2400497_2 Smooth(Mn,1x2)



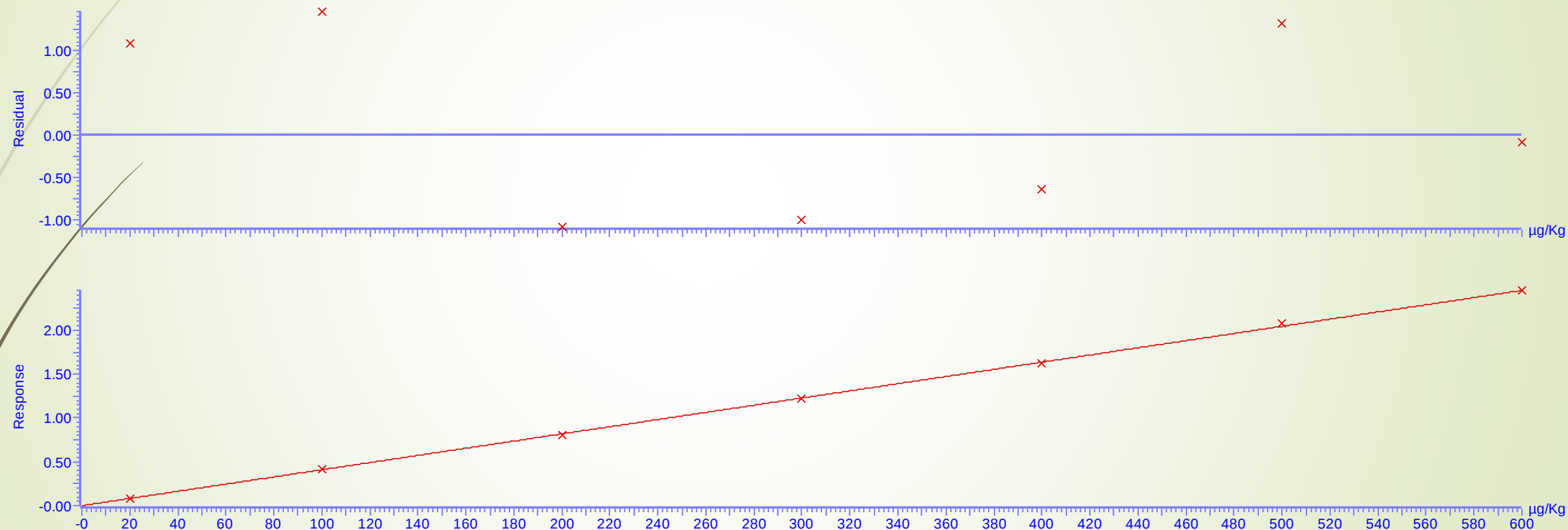
20240227_FF_2400497_2 Smooth(Mn,1x2)



20240227_FF_2400497_2 Smooth(Mn,1x2)



Compound name: FFA
Correlation coefficient: $r = 0.999947$, $r^2 = 0.999894$
Calibration curve: $0.00408986 * x + 0.000856016$
Response type: Internal Std (Ref 4), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



ROBUSTEZ. CAMBIOS MENORES

Criterio REC 808

CV% < 20

8 ME Nivel 2: LMR bovino (200 µg/Kg)

Analito	CV (%)
FFA	4,0

INCERTIDUMBRE

$$U_{exp} = 2U_{comb}$$

$$U_{comb} = \sqrt{S_R^2 + \frac{s_r^2}{n} + sesgo^2/3}$$

Analito	Uexp (%) NMC
FFA	22

LÍMITES DE DECISIÓN CC α

Método 2:

$$LMR + 1,64 \times U_{comb} (LMR)$$

Analito	CC α bovino	CC α porcino
FFA	247	368
Ccα max	282	423

