

Análisis de antibióticos polipeptídicos en matrices de origen animal

Antoni Rubies

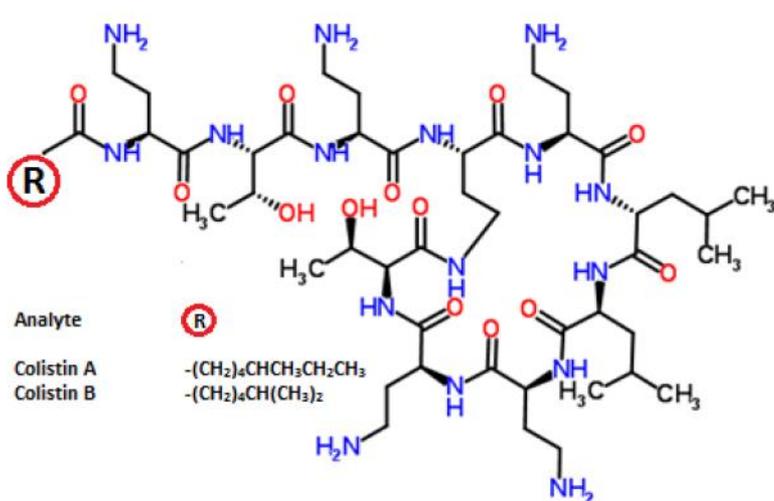
Laboratorio de la Agencia de Salud Pública de Barcelona.



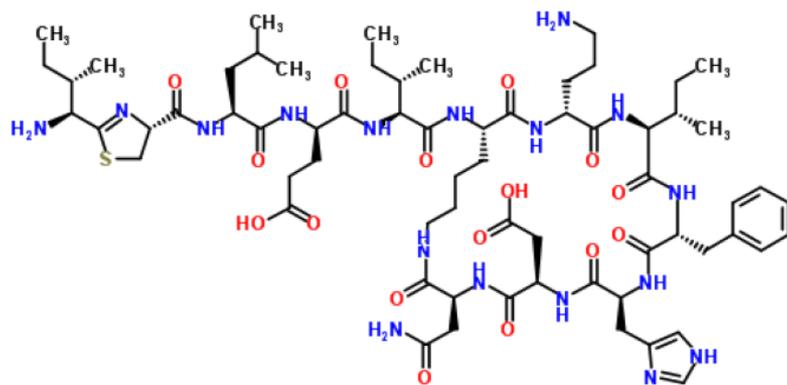
Indice

- I. Introducción
- II. Objetivos
- III. Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRMS)
- IV. Separación cromatográfica
- V. Tratamiento de muestra
- VI. Validación
- VII. Conclusiones

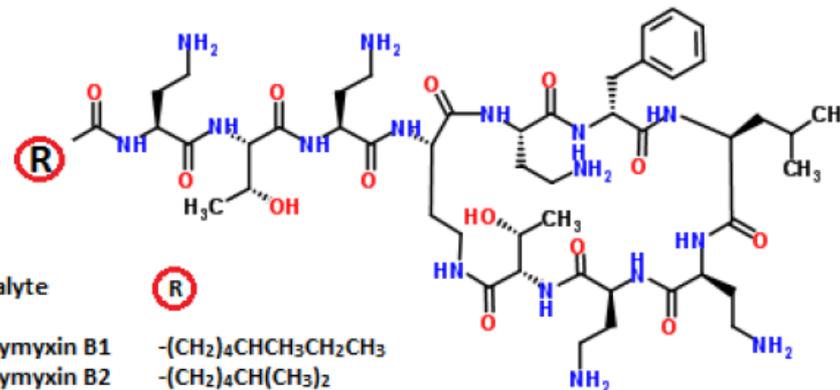
Antibióticos Polipeptídicos



Colistin A (1169.460 Da); Colistin B (1155.434 Da)



Bacitracin A (1422.693 Da)



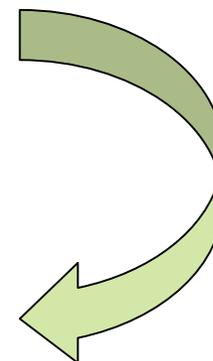
Polymyxin B1 (1203.477 Da); Polymyxin B2 (1189.450 Da)

- ✓ Usados en la producción ganadera
- ✓ Están compuestos por aminoácidos
- ✓ Son efectivos contra microorganismos gram-negativo and gram-positivos
- ✓ Tienen PM: 1000-2000 Da
- ✓ Son mezclas de isómeros
- ✓ Colistina, también llamada Polimixina E

Límite máximo de Residuo (37/2010/UE)

Active substance	Animal species	MRL	Target tissues	Other provisions	Therapeutic classification
Bacitracin	Bovine	100 µg/kg	Milk	NO ENTRY	Anti-infectious agents/ Antibiotics
	Rabbit	150 µg/kg	Muscle Fat Liver Kidney		
	Bovine	No MRL required for all tissues except milk	N/A	For intramammary use in lactating cows only	
Colistin	All food-producing species	150 µg/kg	Muscle	For fin fish, the muscle MRL relates to 'muscle and skin in natural proportions'.	Anti-infectious agents/ Antibiotics
		150 µg/kg	Fat		
		150 µg/kg	Liver		
		200 µg/kg	Kidney		
		50 µg/kg	Milk	MRLs for fat, liver, and kidney do not apply to fin fish	
300 µg/kg	Eggs				
				For porcine and poultry species, the fat MRL relates to 'skin and fat in natural proportions'.	

*N/A – Not applicable



- Polimixina B: no existe LMR publicado para se considera tolerancia = 0
- Bacitracina: LMR únicamente en conejo (150 µg/kg)
- Colistina: legislada en todas las matrices a 150 µg/kg

Certificados de análisis

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
 Website: www.sigmaaldrich.com
 Email USA: techserv@sigma.com
 Outside USA: eurtechserv@sigma.com

SIGMA-ALDRICH

CERTIFICATE OF ANALYSIS

Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH D-30918 Seelze
 Telefon: +49 5137 8238-150

Seelze, 04.01.2013/465196/12/26446
Order-No.:
Customer-No.:
Order-Code:
Quantity:
Production Date: 06. Dec. 2012
Expiry Date: 06. Dec. 2016
Batch : SZBC341XV
Bacitracin A VETRANAL
Reference Material (RM)

1. General Information

Formula: C₆₆H₁₀₃N₁₇O₁₆S
 CAS-No.: [22601-59-8]
 Usage : Antibiotic

Molar mass: 1422.69 g/Mole
 Recomm. storage temp.: 2-8 °C

2. Batch Analysis

Identity (NMR)
 purity (HPLC)
 Water (Karl Fischer)
 Date of Analysis

complying
 71.1 %
 5.3 %
 03. Jan. 2013

Certificate of Analysis

Product Name:
 Colistin sulfate salt - ≥ 15,000 U/mg

Product Number: C446

Batch Number: SLEK0713V
 Brand: SIGMA
 CAS Number: 1264-72-8
 MDL Number: MFCD00146495
 Storage Temperature: Store at 2 - 8 °C
 Quality Release Date: 08 APR 2014

Test	Specification	Result
Appearance (Color)	White to Off White	Off-White
Appearance (Form)	Powder	Powder
Solubility (Color)	Yellow	Faint Yellow
Solubility (Turbidity)	Clear	Clear
Identity	Pass	Pass
by BP Test C	Pass	Pass
Identity	Pass	Pass
by BP Test D	Pass	Pass
Potency	≥ 15000 UN/mg	23535 UN/mg

Robert B. Buehler

Bacitracina A, únicamente
 Reglamento 37/2010/UE incluye
 Bacitracina A, B, C

Polimixina: el certificado incluye abundancias:

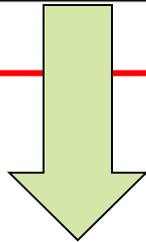
- B1: 69,7%, B2:15,9%,
- B3:3,2%, B1-l: 6,1%

Colistina: son 2 picos cromatográficos,
 pero el certificado no detalla abundancias

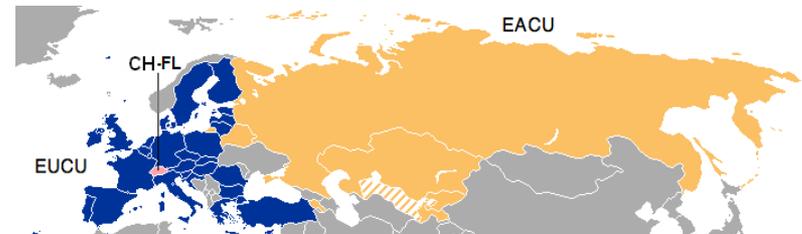
Colistina A: Polimixina E1
 Colistina B: Polimixina E2

Otros límites regulados

Country/Organization	Substance	Animal species	Target tissues	MRL
United States [39]	Bacitracin	Cattle	Edible tissues	500 µg/kg
		Chicken		
		Swine		
		Turkey		
	Not specified	Eggs	500 µg/kg	
	Not specified	Milk	500 µg/kg	
China[39]	Bacitracin	Cattle	Edible tissues	500 µg/kg
		Chicken		
		Swine		
		Chicken	Eggs	500 µg/kg
	Turkey			
	Cattle	Milk	500 µg/kg	
Eurasian Customs Union [46]*	Bacitracin	Meat products	Not specified	20 µg/kg



Unión aduanera, Eurasia





MINISTERIO DE
AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

DIRECCIÓN GENERAL DE
SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN
AGRARIA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE
ACUERDOS SANITARIOS Y
CONTROL EN FRONTERA



MINISTERIO DE
AGRICULTURA Y PESCA,
ALIMENTACIÓN Y MEDIO AMBIENTE

DIRECCIÓN GENERAL DE
SANIDAD DE LA PRODUCCIÓN
AGRARIA
SUBDIRECCIÓN GENERAL DE
ACUERDOS SANITARIOS Y
CONTROL EN FRONTERA

PROCEDIMIENTO DE AUTOCONTROL PARA EL CUMPLIMIENTO DE LA LEGISLACION DE LA UNIÓN ADUANERA

CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS

3. CONTROL DE ANTIBIÓTICOS¹

Los antibióticos recogidos en la legislación de la Unión Aduanera que han de ser sometidos a control obligatorio por las empresas exportadoras, y sus respectivos niveles máximos admitidos son los siguientes:

ANTIBIÓTICOS	Decisión 299 y Decisión 68 RT 034/2013 (niveles no permitidos, < mg / kg; indica el límite de detección del método)
Cloranfenicol	0.0003
Grupo de Tetraciclinas	0.01
Bacitracina	0.02

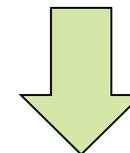
INTRODUCCIÓN.....	4
1. LEGISLACIÓN APLICABLE	4
2. PRINCIPIOS GENERALES.....	5
3. CONTROL DE ANTIBIÓTICOS.....	6
4. CONTROL DE OTROS RESIDUOS	7
5. RADIOACTIVIDAD	8
6. CONTROLES MICROBIOLÓGICOS.....	9
7. EJECUCIÓN DE LOS CONTROLES.....	17
A) Riesgos microbiológicos.....	17
B) Antibióticos y otros residuos	18
PORCINO:	18
VACUNO:	25
8. LABORATORIOS DE ANÁLISIS.....	27
9. MEDIDAS A ADOPTAR EN EL CASO DE DETECCIÓN DE NO CONFORMIDADES	28
9.1. PORCINO.....	28
A) Incumplimientos de antibióticos y residuos	28
B) Incumplimientos microbiológicos.....	31
9.2. VACUNO	32
A) Incumplimientos de antibióticos y residuos	32
B) Incumplimientos microbiológicos.....	34
ANEXO 1 CARNE Y PRODUCTOS CÁRNICOS DE AVE.....	36

Cloranfenicol < 0,0003 mg/kg
Σ (Tetraciclinas) < 0,01 mg/kg
Bacitracina < 0,02 mg/kg



Planes de control (UD) 2016:

121 muestras en matrices diversas: Hígado, grasa, corazón, músculo, lengua, bacon ahumado, riñón...



Necesidad de un método de análisis transversal!

22/11/2016	16_30574	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	LLENGUA	Unión Aduar	09/12/2016
23/11/2016	16_30576	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BLOC DE CARN CONGELADA SENSE OS I SENSE GREIX	Unión Aduar	28/11/2016
23/11/2016	16_30577	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	DESPULLES CONGELADES (FETGE)	Unión Aduar	28/11/2016
23/11/2016	16_30589	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	PRODUCTE CÀRNIC CRU CURAT ASSECAT	Unión Aduar	30/11/2016
23/11/2016	16_30590	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	GREIX DE PORCI SENSE SALAR	Unión Aduar	09/12/2016
23/11/2016	16_30661	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	GREIX DE PORCÍ SENSE SALAR	Unión Aduar	09/12/2016
23/11/2016	16_30662	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BLOC DE CARN CONGELADA SENSE OS I SENSE GREIX	Unión Aduar	28/11/2016
25/11/2016	16_30797	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	DESPULLA (FETGE)	Unión Aduar	09/12/2016
25/11/2016	16_30812	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	CORS DE PORC (DESPULLES CONGELADES)	Unión Aduar	07/12/2016
25/11/2016	16_30813	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	GREIX DE PORC SENSE SALAR (CANSALADA)	Unión Aduar	09/12/2016
25/11/2016	16_30830	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	DESPULLES (COR DE PORC)	Unión Aduar	07/12/2016
25/11/2016	16_30831	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MAGRE DE VEDELLA CONGELAT	Unión Aduar	07/12/2016
25/11/2016	16_30863	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	GREIX DE PORCI SENSE SALAR	Unión Aduar	09/12/2016
25/11/2016	16_30864	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BLOC DE CARN CONGELADA SENSE OS I SENSE GREIX	Unión Aduar	07/12/2016
29/11/2016	16_31032	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCUL CONGELAT	Unión Aduar	13/12/2016
29/11/2016	16_31070	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BACON TACO (10.025420 IB)	Unión Aduar	07/12/2016
29/11/2016	16_31071	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BLOC DE CARN SENSE GREIX, AMB O SENSE OS	Unión Aduar	07/12/2016
29/11/2016	16_31072	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	GREIX DE PORC SENSE SALAR	Unión Aduar	09/12/2016
30/11/2016	16_31089	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	GREIX DE PORCÍ SENSE SALAR	Unión Aduar	09/12/2016
30/11/2016	16_31090	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BLOC DE CARN CONGELADA SENSE OS I SENSE GREIX	Unión Aduar	07/12/2016
30/11/2016	16_31103	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	DESPULLA	Unión Aduar	07/12/2016
01/12/2016	16_31292	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	COR	Unión Aduar	13/12/2016
01/12/2016	16_31293	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	CARN ESCORXADOR (CAP DE LLOM) DE PORC CONGELAT	Unión Aduar	23/12/2016
01/12/2016	16_31340	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	CARN DE BOVI CONGELADA	Unión Aduar	07/12/2016
02/12/2016	16_31451	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BACON AHUMADO LONCHEADO	Unión Aduar	14/12/2016
02/12/2016	16_31452	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	BACON	Unión Aduar	14/12/2016
07/12/2016	16_31607	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	RONYONS	Unión Aduar	16/12/2016
07/12/2016	16_31608	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCUL	Unión Aduar	29/12/2016
07/12/2016	16_31609	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCUL	Unión Aduar	29/12/2016
07/12/2016	16_31610	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCULO DE CERDO	Unión Aduar	29/12/2016
07/12/2016	16_31611	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCUL	Unión Aduar	29/12/2016
07/12/2016	16_31613	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCUL	Unión Aduar	29/12/2016
07/12/2016	16_31614	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	FETGE	Unión Aduar	16/12/2016
07/12/2016	16_31615	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	MÚSCUL	Unión Aduar	29/12/2016
07/12/2016	16_31670	SPS - SERVEI DE PROTECCIÓ DE	CARNS I DERIVATS CARF	CARN DE BOVI REFRIGERADA	Unión Aduar	16/12/2016



EN CUANTO AL PNIR 2016: EVALUACIÓN DE LOS LABORATORIOS DE REFERENCIA

Evaluation of Member State Residue Monitoring Plans: 2016

Bovine: A1, A2, A4: all recommended substances are covered; one additional substance (A2) is also included; A3: **apart from testosterone -17-beta** all recommended substance are covered; one additional substance is also included; A5: minimum requirements fulfilled and all optional and recommended substances also covered; A6: testing for chloramphenicol, chlorpromazine, dapsone, 5 nitroimidazoles, 5 nitrofurans (parent substances) and 4 nitrofurans metabolites; B1: wide selection of groups/antimicrobials covered: penicilins, tetracyclines, aminoglycosides, cephalosporins, macrolides, quinolones, sulfonamides, amphenicols, lincosamides and others (trimethoprim); **peptides (colistin) are not included**; B2a: **apart from triclabendazole** minimum requirements are met; some recommended **analytes are also covered but closantel, nitroxinil and rafoxanide not included**; B2b: absolute minimum requirements, most recommended and some optional analytes covered; B2c: testing for a selection of pyrethroids and carbamates; B2d: comprehensive selection: 13 analytes covered; B2e: minimum requirements only partially fulfilled: flunixin, metamizole and ibuprofen not covered; many recommended and one optional substance included; B2f: testing for a selection of corticosteroids; B3a and B3b: wide selection of substances covered; B3c: testing for Pb and Cd; B3d: aflatoxins B1/B2/G1/G2 and ochratoxin A covered;

Antibióticos polipeptídicos no incluidos!



Métodos Analíticos

Analytes	Sample Preparation	Separation Conditions	MS Detection	Reference
Bacitracin A Colistin A Colistin B Polymyxin B1 Polymyxin B2	Extraction: 25% MeOH in water + 1M H ₂ SO ₄ Clean-up: SPE Oasis HLB	Column: Kinetex C-18 (2.1 x 150 mm, 2.6 μm) Mobile phases: A: 50mL ACN+3mL formic acid+0.1mL TFA diluted to volume with water (500 mL) B: 50mL water+3mL formic acid+0.1mL TFA diluted to volume with ACN (500 mL)	Triple-quadrupole mass spectrometer	Kaufmann et al. [6]
Bacitracin A Colistin A Colistin B Polymyxin B1 Polymyxin B2 Enduracidin A Enduracidin B	Extraction: 1% TFA in MeOH + 1% TFA in water 0.1M HCl Clean-up: SPE IRIS	Column: Poroshell 120 (100 x 2.1 mm, 2.7 μm) Mobile phases: A: 0.1% formic acid in water B: methanol	Triple-quadrupole mass spectrometer	Boison et al. [3]

Son métodos de LC-MS/MS: QqQ



Etapas de los Métodos de Análisis

Pesada de la muestra



Extracción

- ✓ Mezcla hidro-orgánica
- ✓ Metanol o Acetonitrilo
- ✓ Se acidifica para precipitar las proteínas



Clean-up

- ✓ Cartuchos SPE de fase polimérica



LC-MS/HRMS

- ✓ Columna C18
- ✓ Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo



Objetivo

- ✓ Desarrollar un método sencillo, robusto y rápido para el análisis de antibióticos polipeptídicos en rutina y aplicarlo a campañas de muestreo
 - **Optimizar los parámetros del espectrómetro de masas**
 - **Optimizar la separación cromatográfica**
 - **Optimizar el tratamiento de la muestra**
 - **Validar el método siguiendo la Decisión 2002/657/EC**



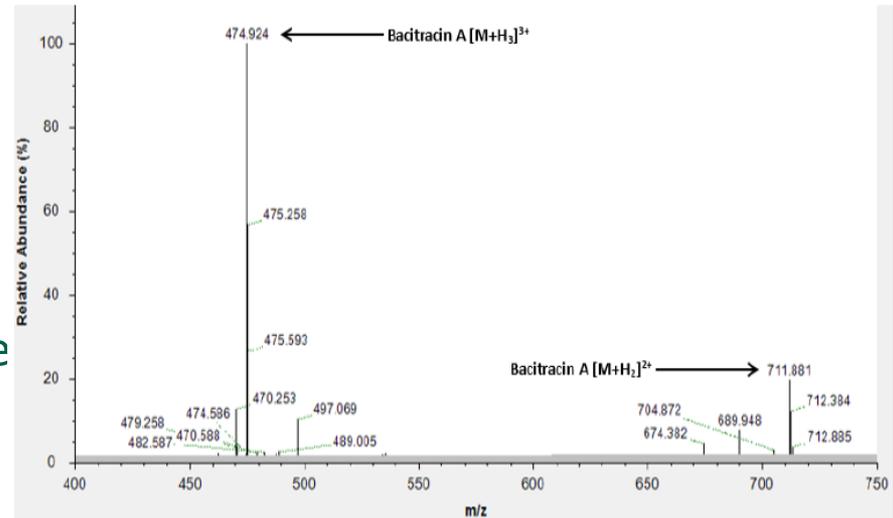
HRMS:

Error masa < 5 ppm

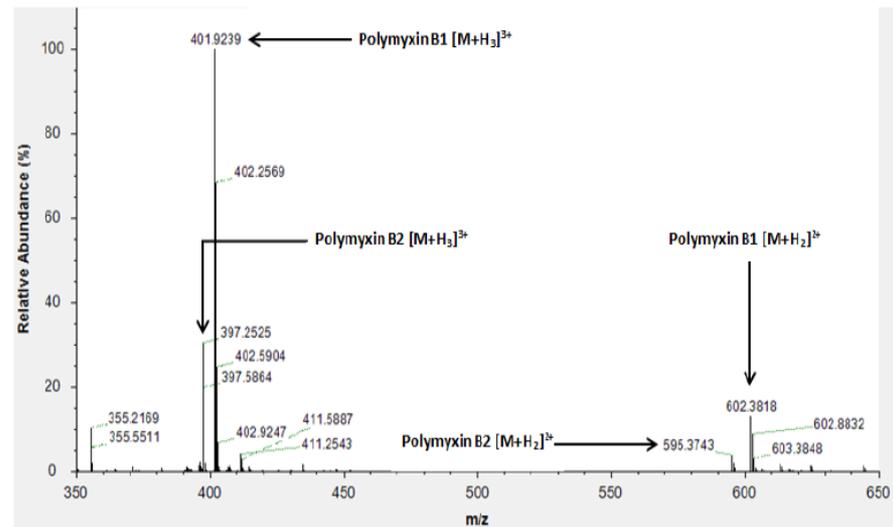
Rs: 70000 ($m/z = 200$ FWHM)

HESI+,

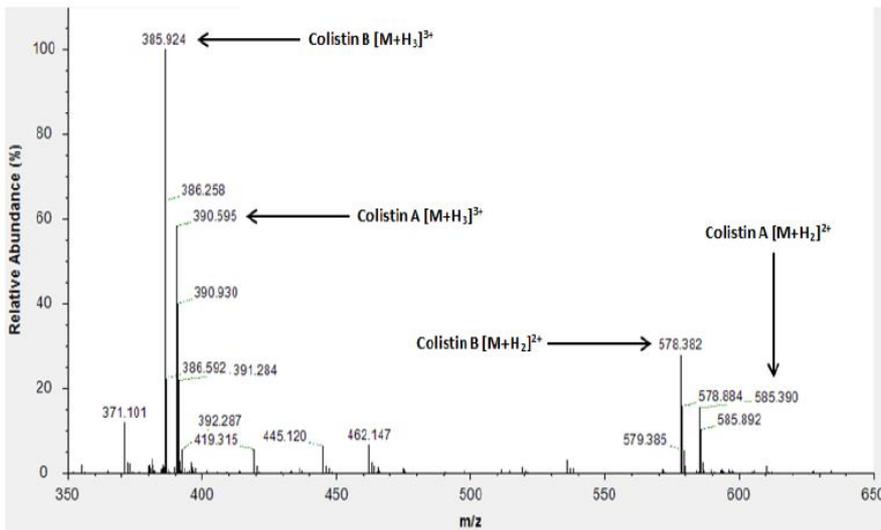
Característica: moléculas cargadas doble y triplemente : $[M+H_3]^{3+}$, $[M+H_2]^{2+}$



Bacitracina A



Polimixina B1/B2



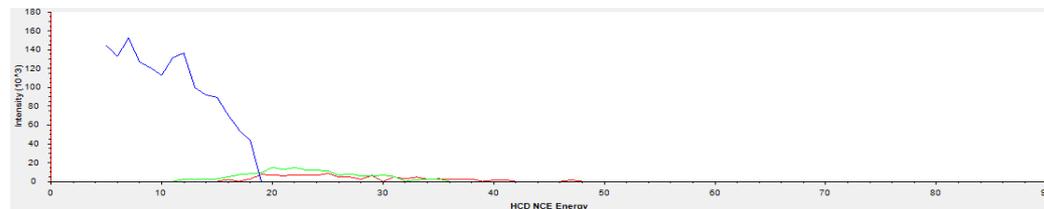
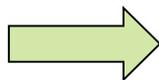
Colistina A/B



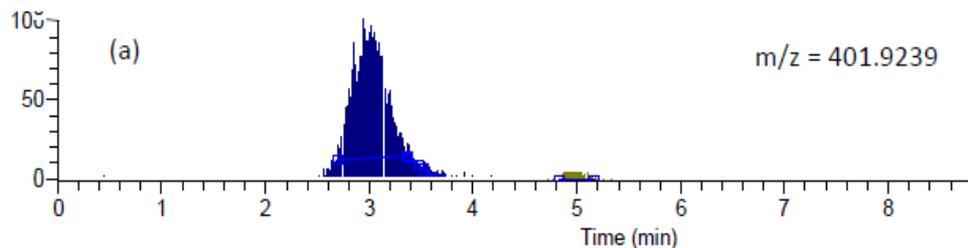
Parámetros de HRMS

Analyte	Ion	m/z	PRM	Start (min)	End (min)	MSX count	Max IT
Colistin B	$[M+H_2]^{2+}$	578.3817	PRM1	0.00	4.00	8	40 ms
	$[M+H_3]^{3+}$	385.9234					
Polymyxin B2	$[M+H_2]^{2+}$	595.3744					
	$[M+H_3]^{3+}$	397.2520					
Colistin A	$[M+H_2]^{2+}$	585.3896					
	$[M+H_3]^{3+}$	390.5952					
Polymyxin B1	$[M+H_2]^{2+}$	602.3822					
	$[M+H_3]^{3+}$	401.9239					
Bacitracin A	$[M+H_2]^{2+}$	711.8806	PRM2	4.00	11.00	2	100 ms
	$[M+H_3]^{3+}$	474.9232					

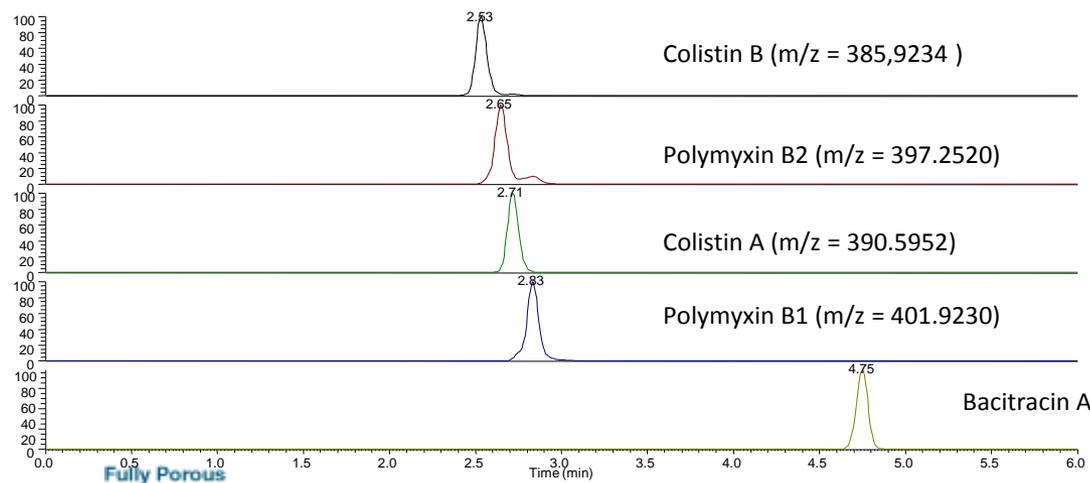
- ✓ **Cuantificación:** Iones triplemente cargados
- ✓ **Confirmación:** Iones doblemente cargados
- ✓ **No fragmentan**



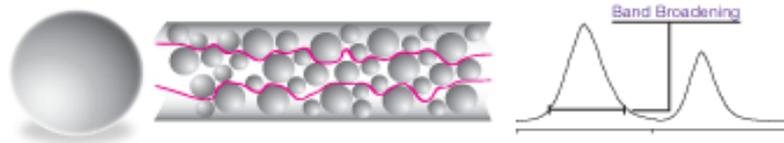
Selección de la Columna C18



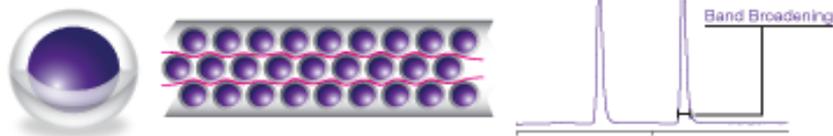
Hypersil Gold aQ C18



Kinetex C18



Kinetex Core-Shell





Fases Móviles

✓ Fases móviles descritas por Kaufmann:

Fase Móvil A: 5% acetonitrilo, 0.3% ácido fórmico y 0.01% **ácido trifluoroacético** en agua

Fase Móvil B: 5% agua, 0.3% ácido fórmico, and 0.01% **ácido trifluoroacético** en acetonitrilo

Pares iónicos!



✓ Fases móviles escogidas:

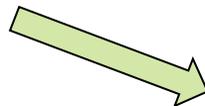
Fase Móvil A: 0.2% ácido fórmico en agua

Fase Móvil B: 0.2% ácido fórmico en acetonitrilo

✓ Ventajas/inconvenientes:

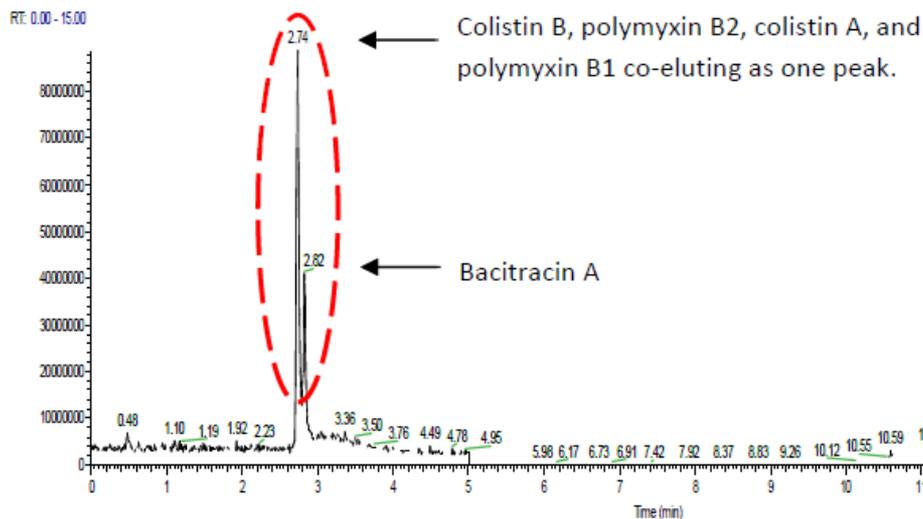
- ✓ Picos más estrechos y mejor sensibilidad
- ✓ No es necesario el lavado entre inyecciones

✗ La fuente de ionización se ensucia más





Optimización del Gradiente

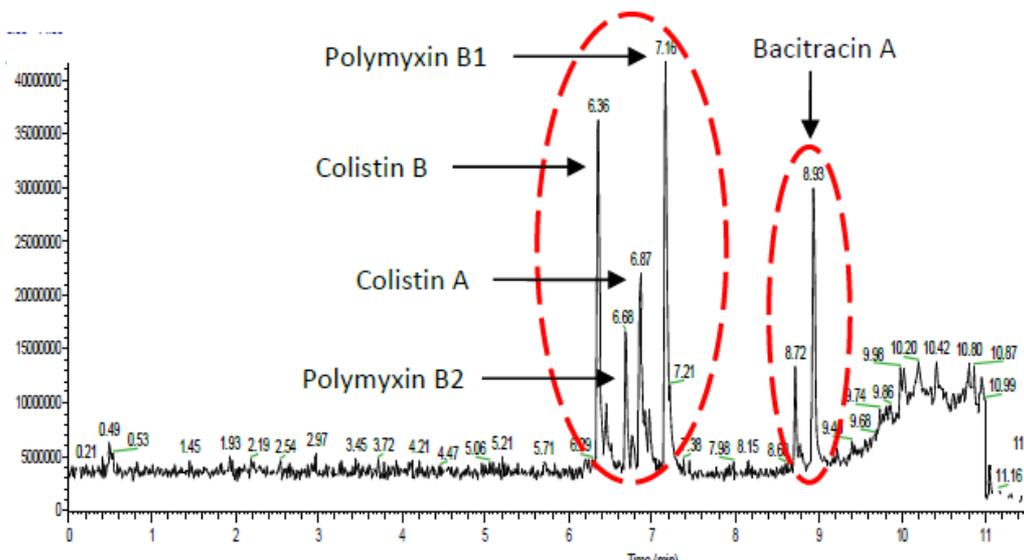


Gradiente (tiempo, %B):

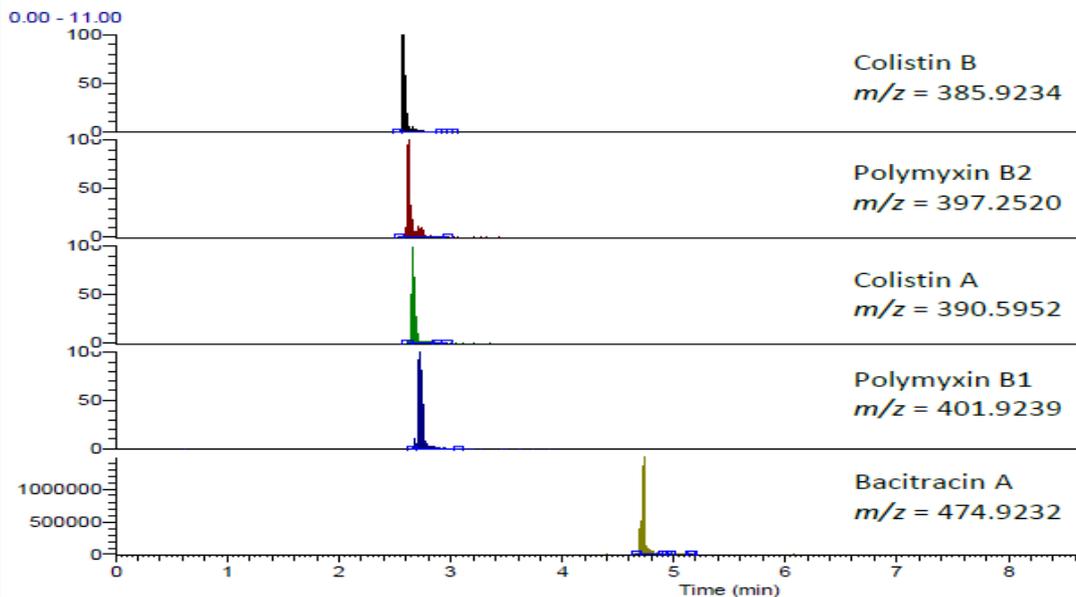
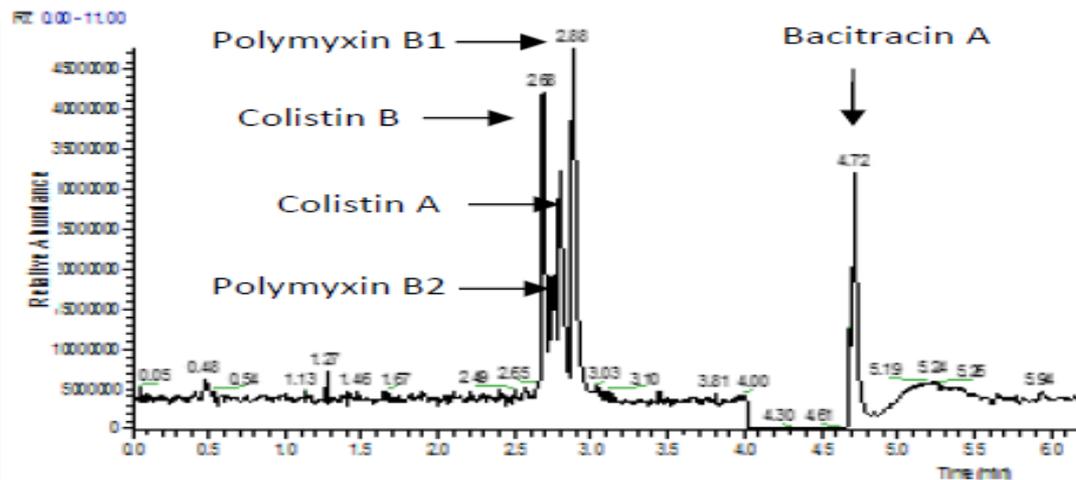
Tiempo (min)	%B
0-1,5	10
1,6	25
9	50
9-11	98
11-15	10

Gradiente (tiempo, %B):

Tiempo (min)	%B
0-2	8
7	20
8	30
11-12,5	100
12,5-14	8



Condiciones Cromatográficas finales



- ✓ **Columna:** Kinetex C18
- ✓ **Fase Móvil A:** 0.2% ácido formico en agua
- ✓ **Fase Móvil B:** 0.2% formic acid in ACN
- ✓ **Gradiente (tiempo, %B):** (0-1, 10), (1.5-3.5, 20), (4-6.5, 90), (7-9, 100), (9.1-11, 10)



Disolución de Extracción

Pesar la muestra



Extracción

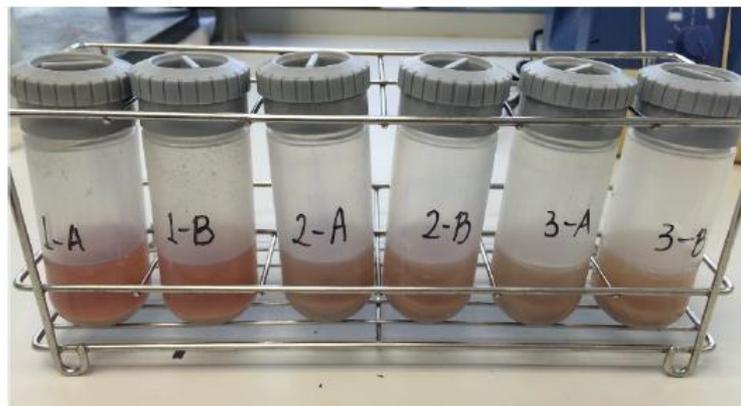


Clean-up



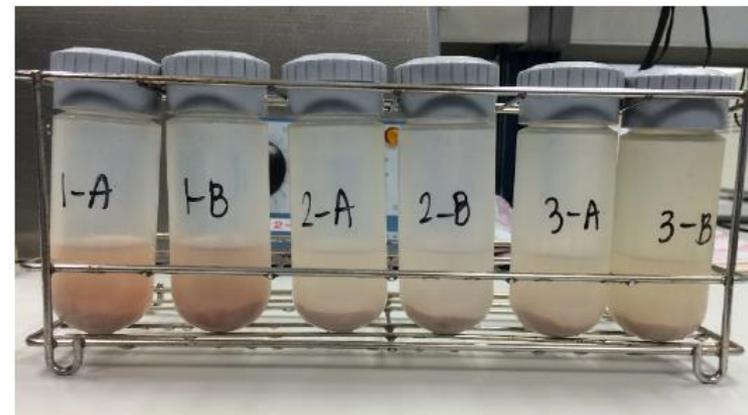
LC-MS/HRMS

- ✓ **Disolvente Orgánico:** Metanol o Acetonitrilo?
- ✓ **Ácidos para precipitar las proteínas:** HCl, H₂SO₄ o HCOOH?

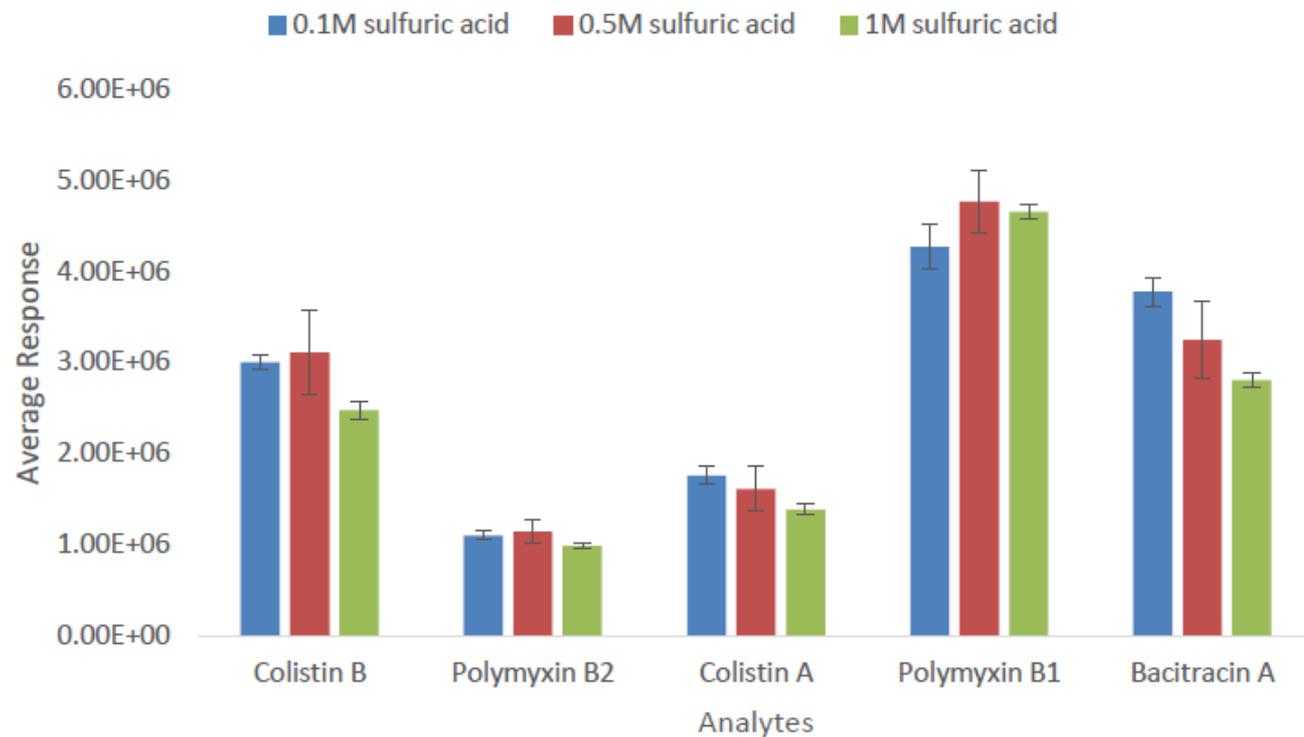


- ✓ **HCOOH** (de izquierda a derecha):
0.1 M, 0.5 M, 1.0 M

- ✓ **H₂SO₄** (de izquierda a derecha):
0.1 M, 0.5 M, 1.0 M



Disolución de Extracción



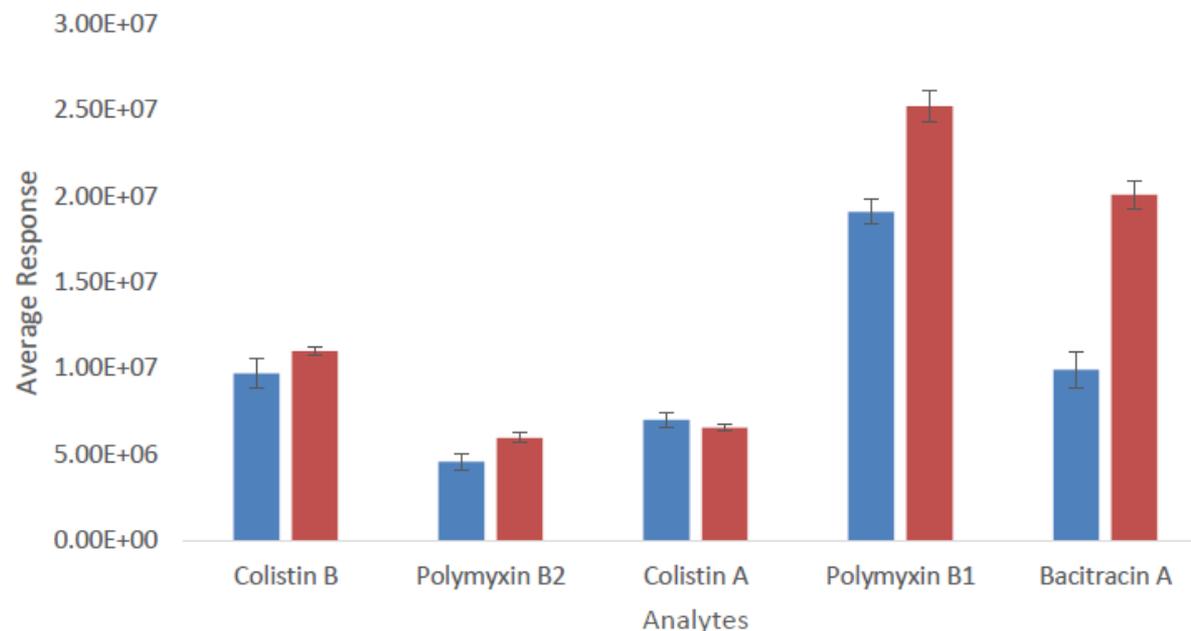
- ✓ **Disolución de Extracción:** metanol: agua (1:3)
- ✓ **Ácido para precipitar las proteínas :** 0.5 M H₂SO₄

Cartuchos SPE de fase polimérica



■ OASIS HLB (200 mg, 6 mL)

■ BOND ELUT PLEXA (200 mg, 6 mL)



✓ **Cartuchos SPE de fase polimérica: Bond Elut Plexa (200 mg, 6 mL)**

Pesar la muestra

Extracción

Clean-up

LC-MS/HRMS

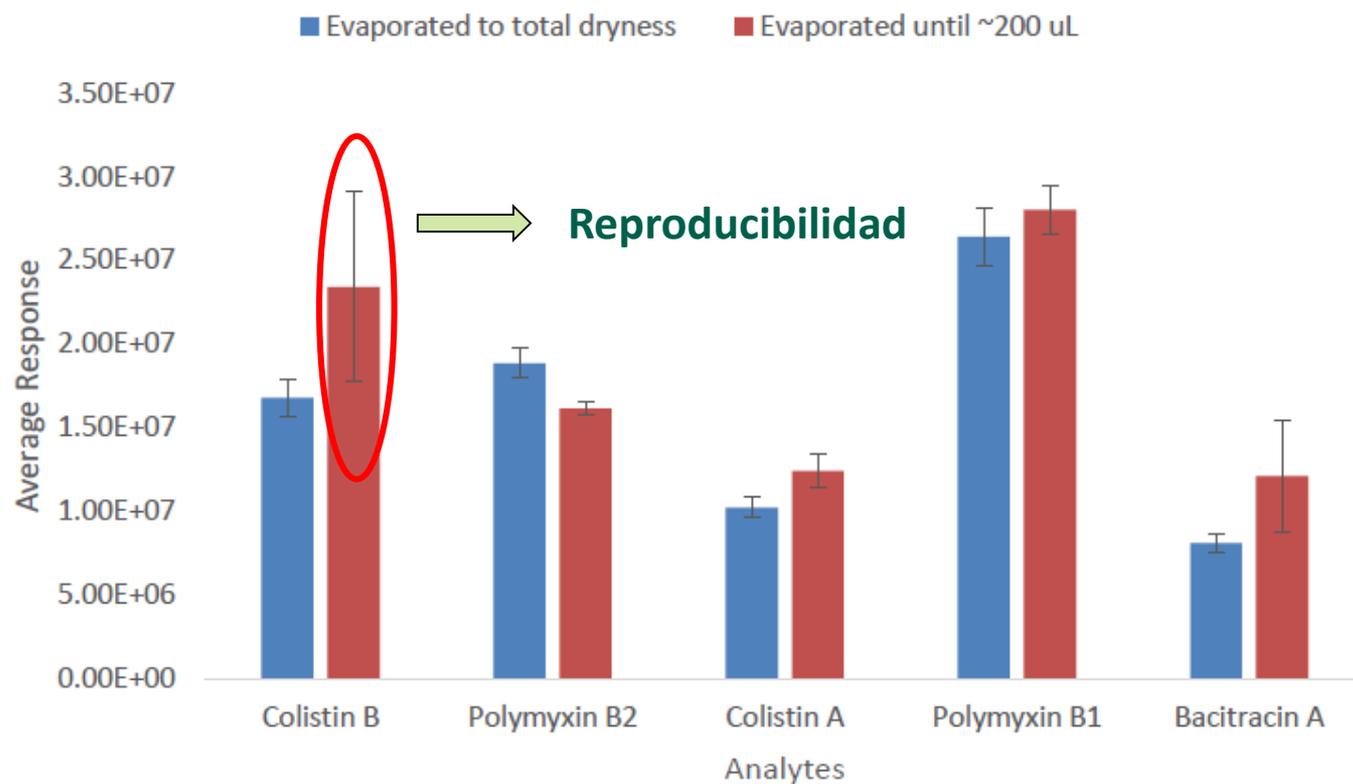
Evaporación

Pesar la muestra

Extracción

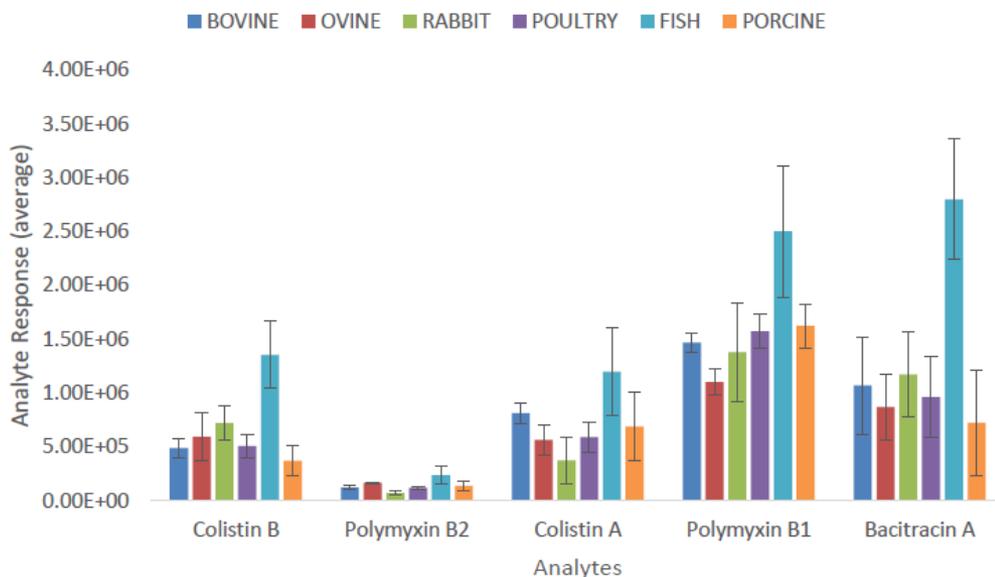
Clean-up

LC-MS/HRMS



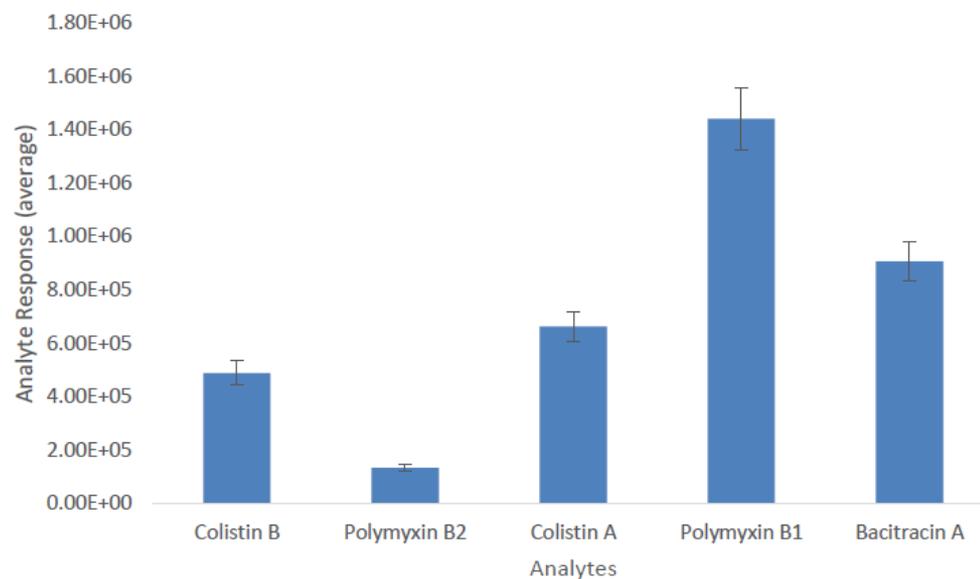
✓ **Evaporación:** Evaporar hasta sequedad

Selectividad / Especificidad



- ✓ La matriz pescado presenta una mayor respuesta respecto al resto de matrices; se excluye del estudio de validación.
- ✓ La matriz conejo se validará por separado (LMR para BCT).

- ✓ Una vez excluidas la matriz pescado y conejo, se evalúa la respuesta del resto de matrices.
- ✓ RSD para todos los analitos es <20%.
- ✓ Se demuestra la equivalencia de matrices y se lleva a cabo una única validación.



LOQ y Linealidad

Estudio: dopaje a concentraciones crecientes partiendo de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ \Rightarrow 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Requisitos: Bacitracina: 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (UD); Bacitracina (conejo): LMR= 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Colistina: LMR= 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$

Analyte	Limit of quantification ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Analyte	Ion ratio for the spiked samples ($\pm s$)	Ion ratio for the matrix-matched stds	% Difference	Tolerance ($\pm 25\%$)
Bacitracin A	20.0	Colistin B	0.298 (± 0.037)	0.344	-13.6	✓
Colistin A	30.0	Polymyxin B2	0.271 (± 0.046)	0.278	-2.4	✓
Colistin B	45.0	Colistin A	0.329 (± 0.027)	0.324	1.7	✓
Polymyxin B1	16.3	Polymyxin B1	0.300 (± 0.021)	0.277	8.5	✓
Polymyxin B2	3.7	Bacitracin A	0.199 (± 0.009)	0.198	0.6	✓

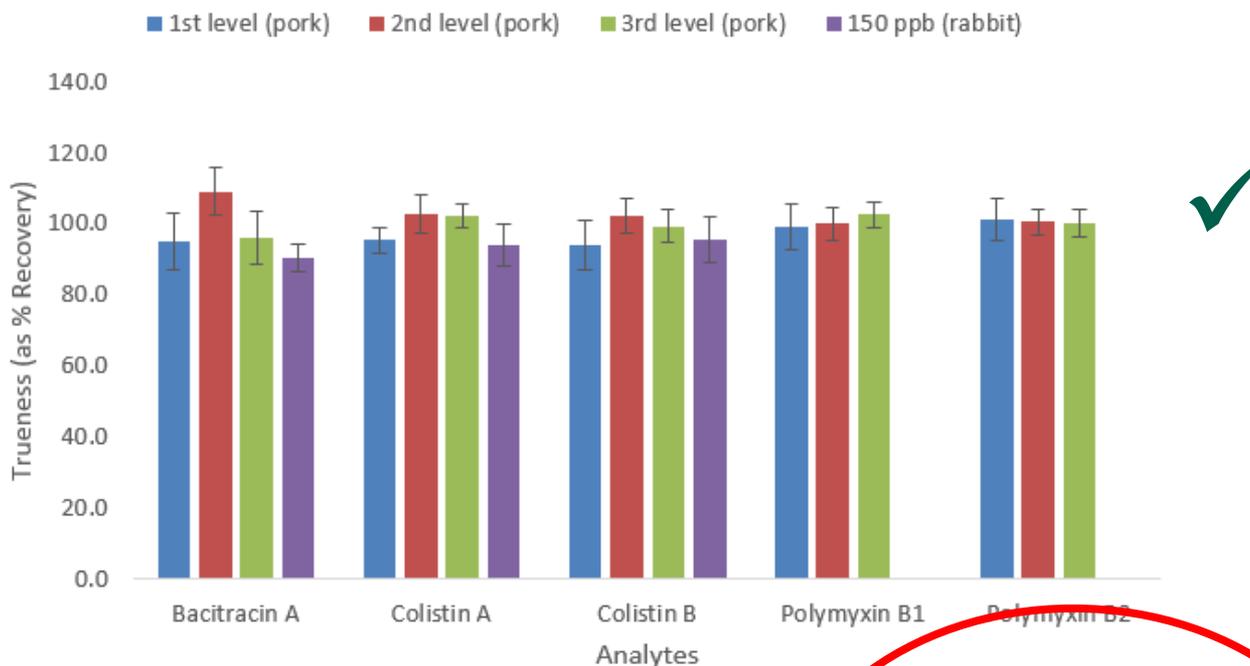
	Linear range ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	r	%RSD of RF
Matrix: porcine			
Bacitracin A	20 – 100	0.9951	11.1
Colistin A	30.0 – 150.0	0.9996	5.4
Colistin B	45.0 – 225.0	0.9995	15.2
Polymyxin B1	16.3 – 81.4	0.9987	4.0
Polymyxin B2	3.7 – 18.6	0.9986	19.6
Matrix: rabbit			
Bacitracin A	50.0 – 250.0	0.9807	15.7
Colistin A	20.0 – 100.0	0.9991	19.6
Colistin B	30.0 – 150.0	0.9986	6.9

Precisión



Analyte	Concentration ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%) within day/between days	2/3 Horwitz ratio
Matrix: porcine			
Bacitracin A	20.0	14.0/16.8	19.2
	40.0	13.4/13.5	17.3
	60.0	12.1/15.6	16.3
Colistin A	30.0	5.2/7.8	18.1
	60.0	7.0/10.7	16.3
	90.0	7.0/6.8	15.3
Colistin B	45.0	11.0/15.2	17.0
	90.0	6.2/9.7	15.3
	135.0	9.7/9.3	14.4
<hr/>			
Polymyxin B1	16.3	9.4/13.2	19.8
	32.6	7.7/9.5	17.9
	48.8	6.2/7.0	16.8
Polymyxin B2	3.7	8.7/12.1	24.8
	7.4	7.0/7.1	22.3
	11.2	7.1/7.5	21.0
<hr/>			
Matrix: rabbit			
Bacitracin A	150.0	12.4/12.7	14.2
Colistin A	60.0	13.5/12.7	16.3
Colistin B	90.0	13.3/14.0	15.3

Veracidad, CC α y CC β



Matrix	Analyte	MRL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC α ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	CC β ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Porcine	Bacitracin A	N/A	4.7	10.0
	Colistin	150	173.5	197.1
	Polymyxin B1	N/A	15.3	18.8
	Polymyxin B2	N/A	2.1	2.8
Rabbit	Bacitracin A	150	177.5	205.0
	Colistin	150	178.1	206.2

N/A – Not applicable; no MRL defined.



Incertidumbre y aplicación del método

	Rel. combined standard uncertainty, u_c (%)	Rel. expanded uncertainty, U (%)
Matrix: porcine		
Bacitracin A	16.8	33.6
Colistin A	10.6	21.3
Colistin B	15.1	30.3
Polymyxin B1	13.2	26.5
Polymyxin B2	12.1	24.1
Matrix: rabbit		
Bacitracin A	12.7	25.5
Colistin A	12.7	25.4
Colistin B	14.0	27.9

- ✓ El método está incluido en la cartera de servicios del LASPB
- ✓ Se han analizado 121 muestras de rutina (2016), y todas ellas han resultado negativas ($< CC\alpha$) para todos los analitos.



EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Colistin All food-producing species 150 µg/kg
 150 µg/kg
 150 µg/kg
 200 µg/kg
 50 µg/kg
 300 µg/kg

Muscle For fin fish, the muscle MRL relates to 'muscle and skin in natural proportions'.
 Fat
 Liver
 Kidney
 Milk
 Eggs
 Anti-infectious agents/
 Antibiotics
 MRLs for fat, liver, and kidney do not apply to fin fish

LMR= 150 µg/kg

For porcine and poultry species, the fat MRL relates to 'skin and fat in

	Sample	Colistin B (+3)	Colistin A (+3)	Total Response	% CST B	% CST A
Colistin: 225 ppb	Sample 1	2,11E+06	4,26E+06	6,37E+06	33,17	66,83
	Sample 2	1,90E+06	3,78E+06	5,69E+06	33,50	66,50
	Sample 3	1,57E+06	3,55E+06	5,12E+06	30,62	69,38
	Sample 4	1,56E+06	3,80E+06	5,36E+06	29,08	70,92
	Sample 5	1,80E+06	4,29E+06	6,09E+06	29,55	70,45
	Sample 6	1,55E+06	3,69E+06	5,24E+06	29,67	70,33
	ME3	1,67E+06	3,89E+06	5,56E+06	30,12	69,88
Colistin: 225 ppb	Sample 1	2,10E+06	4,00E+06	6,10E+06	34,50	65,50
	Sample 2	2,00E+06	3,86E+06	5,86E+06	34,19	65,81
	Sample 3	2,24E+06	4,45E+06	6,69E+06	33,48	66,52
	Sample 4	2,30E+06	3,95E+06	6,25E+06	36,75	63,25
	Sample 5	2,19E+06	3,54E+06	5,73E+06	38,16	61,84
	Sample 6	1,79E+06	3,53E+06	5,32E+06	33,70	66,30
	ME3	1,99E+06	3,68E+06	5,67E+06	35,05	64,95
	AVERAGE			3,57E+06	28	72
	STDEV			1,98E+06	4,53	4,53
	RSD			55,50	16,38	6,27

Estudio proporción Colistina A/B

- Muestras dopadas (75-225) µg/kg: 28%-72%
- Stándares en disolución: 60%-40%

Concentration Level	Sample	Colistin B (+3)	Colistin A (+3)	Total Response	% CST B	% CST A
0.4 ppm	STD	1,88E+07	1,24E+07	3,12E+07	60,14	39,86
0.4 ppm	STD	1,71E+07	1,13E+07	2,84E+07	60,35	39,65
0.4 ppm	STD	1,58E+07	1,15E+07	2,73E+07	57,75	42,25
0.4 ppm	STD	1,56E+07	1,09E+07	2,66E+07	58,80	41,20
0.4 ppm	STD	1,16E+07	7,64E+06	1,92E+07	60,21	39,79
0.4 ppm	STD	2,28E+07	1,76E+07	4,04E+07	56,40	43,60
0.4 ppm	STD	1,89E+07	1,34E+07	3,23E+07	58,50	41,50
0.4 ppm	STD	1,19E+07	7,49E+06	1,94E+07	61,40	38,60
0.4 ppm	STD	2,10E+07	1,35E+07	3,45E+07	60,85	39,15
	AVERAGE			2,88E+07	59,38	40,62
	STDEV			6,83E+06	1,62	1,62
	RSD			23,72	2,74	4,00

Para expresar resultados:
Colistina como suma de (A+B)



Conclusiones

- ✓ En la extracción, la adición de ácido sulfúrico al 0.5 M ha demostrado mejorar la extracción de los compuestos, gracias a la precipitación de la proteína.
- ✓ Evaporar los extractos a sequedad presenta una mayor reproducibilidad.
- ✓ Se ha conseguido una buena separación cromatográfica usando la columna Kinetex C18 y las fases móviles 0.2 % ácido fórmico en agua / acetonitrilo.
- ✓ El Q-Orbitrap presenta una excelente selectividad, resolviendo interferencias de la matriz con m/z muy cercanas a los antibióticos.
- ✓ Se ha desarrollado un método sencillo, robusto y rápido que se usa como parte del programa de control de residuos veterinarios en el LASPB.



**Gracias per la
atención!**

C S B Consorci Sanitari
de Barcelona



**Agència
de Salut Pública**

