

Analisi di residui multipli di farmaci ad uso veterinario in fegato bovino tramite LC/MS/MS

**Agilent Bond Elut QuEChERS
Enhanced Matrix Removal—Lipid**

Nota applicativa

Analisi alimentare e agricoltura

Autori

Limian Zhao, Derick Lucas
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) rappresenta l'ultima generazione di prodotti per la preparazione del campione e viene usato in un apposito formato per l'estrazione in fase solida dispersa (dSPE). Il materiale è altamente selettivo rispetto agli interferenti della matrice, in particolare per campioni grassi (contenuto di grassi > 5%), senza alcun impatto negativo sul recupero degli analiti. Questo studio dimostra l'applicazione di questo nuovo prodotto per l'analisi di 30 farmaci ad uso veterinario rappresentativi in fegato bovino. La procedura include un'estrazione e precipitazione di proteine rapida ed efficiente con acetonitrile acidificato, seguita dall'uso di EMR—Lipid dSPE e di un kit di purificazione da usare successivamente. La quantità di matrice rimossa tramite il protocollo EMR-Lipid è stata determinata in base al peso degli interferenti e a esperimenti di infusione post-colonna. Rispetto ad altri prodotti di purificazione di matrice, EMR—Lipid dSPE offre una rimozione più efficace della matrice e un migliore recupero di analiti. Il metodo EMR—Lipid ottimizzato offre una maggiore purificazione e una precisione e accuratezza eccellenti per i 30 farmaci a tutti i livelli, garantendo un'analisi rapida, robusta e veloce di campioni ad alto contenuto di grassi.



Agilent Technologies

Introduzione

I farmaci ad uso veterinario sono ampiamente usati su animali destinati alla produzione alimentare per evitare malattie o promuovere la crescita. Questi farmaci si accumulano nei tessuti animali e il loro uso improprio può portare alla formazione di residui in parti destinate al consumo, che costituiscono un rischio noto per la salute umana. Grazie a una maggior attenzione alla sicurezza degli alimenti, in quasi tutti i paesi sono stati adottati provvedimenti per limitare l'utilizzo di farmaci nell'industria alimentare animale [1-4].

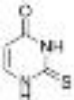
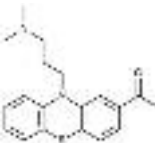
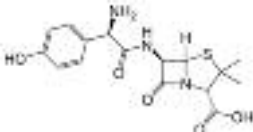
Alimenti di origine animale come muscoli, fegato e uova sono in genere complessi dal punto di vista chimico ed è quindi fondamentale applicare un metodo efficiente di preparazione del campione, che includa un'estrazione generica e una purificazione efficace. I consueti metodi di preparazione del campione includono estrazione in solvente tradizionale, SPE o una combinazione di più tecniche. Tali metodi necessitano solitamente di molto tempo e di un'intensa preparazione in laboratorio e sono adatti unicamente ad un numero limitato di classi di composti, oltre a richiedere uno sviluppo di metodi aggiuntivi.

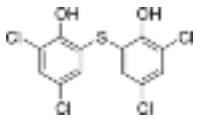
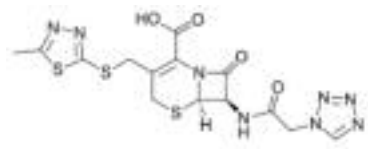
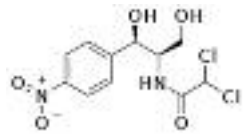
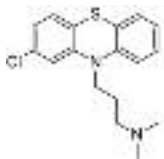
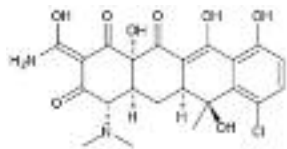
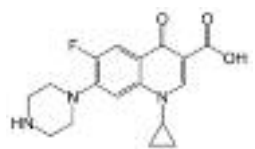
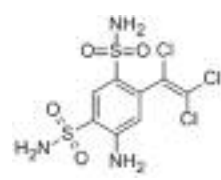
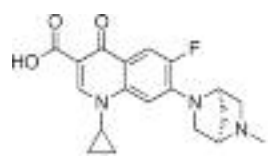
I metodi multiresiduali e a classi multiple stanno acquisendo sempre più popolarità nell'ambito dei programmi normativi di monitoraggio, grazie all'estensione del loro campo di applicazione analitico e ad una maggiore efficienza in laboratorio. Il numero di farmaci veterinari monitorati è aumentato negli ultimi anni, per cui oggi ne sono riportati oltre 100 [5-8]. Il pre-trattamento dei campioni comporta solitamente l'estrazione con una miscela di acetonitrile e acqua, seguita da purificazione con C18, altre tecniche di purificazione o entrambe. Fasi come la C18 garantiscono solo una rimozione parziale di lipidi, con conseguente possibile

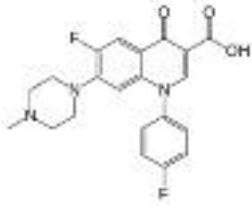
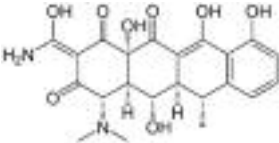
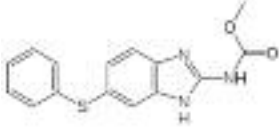
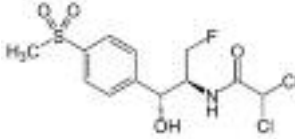
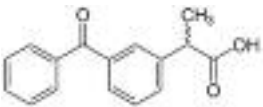
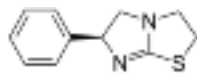
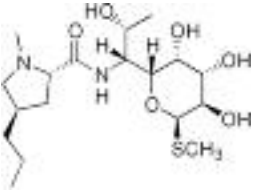
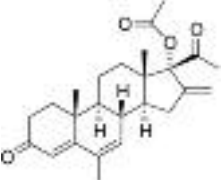
precipitazione nel campione finale in fase di diluizione o ricostituzione. La formazione di precipitato richiede la filtrazione dei campioni prima dell'iniezione in LC/MS/MS e può causare una perdita di analiti. Durante l'estrazione in fase solida dispersiva (dSPE) è possibile aggiungere esano per rimuovere lipidi, ma ciò, oltre ad eliminare gli analiti idrofobi, può rivelarsi non selettivo e dispendioso in termini di tempo. L'impiego di materiali adsorbenti in zirconia per eseguire la purificazione garantisce una migliore purificazione della matrice rispetto alla C18, ma genera una maggiore perdita di analiti, soprattutto in composti contenenti acido carbossilico e idrossile, come fluorochinoloni, tetracicline e macrolidi [7,8].

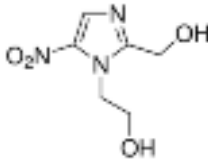
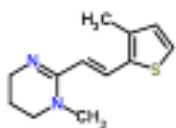
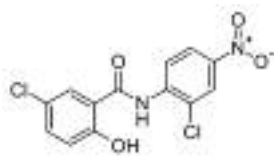
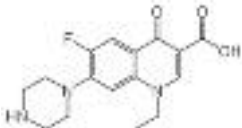
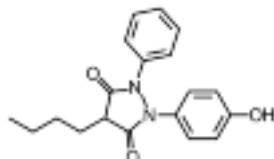
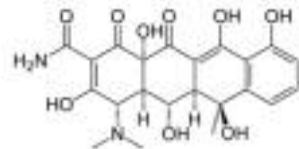
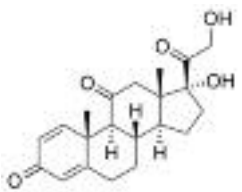
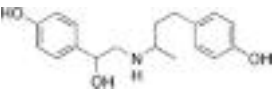
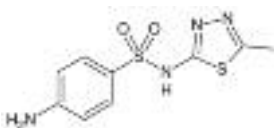
Agilent Bond Elut QuEChERS Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid) è un nuovo materiale adsorbente che rimuove selettivamente le principali classi di lipidi senza trattenere gli analiti. L'eliminazione dell'interferenza dei lipidi da matrici complesse è particolarmente importante nell'ambito di tecniche come QuEChERS e precipitazione delle proteine. Poiché questi semplici metodi di preparazione dei campioni non sono in grado di rimuovere grandi percentuali di lipidi, gli interferenti rimangono nell'estratto finale del campione insieme agli analiti. Ciò può causare anomalie cromatografiche, una scarsa accuratezza e precisione dei dati e necessità di interventi di manutenzione. In questo studio viene esaminato un nuovo approccio alla preparazione del campione per l'analisi di 30 farmaci ad uso veterinario, rappresentativi e problematici, in fegato bovino, utilizzando una semplice estrazione e precipitazione di proteine seguita da una purificazione con EMR-Lipid. I farmaci veterinari selezionati rappresentano 17 diverse classi, con farmaci con caratteristiche da idrofile a idrofobe, acidi, neutri e basici. La Tabella 1 mostra le informazioni chimiche e normative relative a tali farmaci.

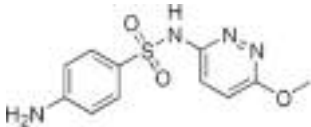
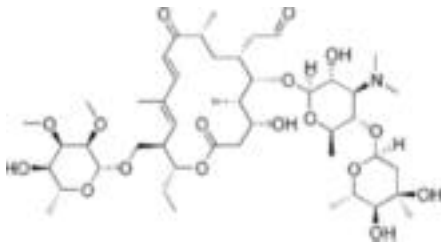
Tabella 1. Proprietà chimiche e fisiche dei farmaci analizzati.

Nome	Classe farmaco	Log P	pKa	Formula molecolare	Struttura	Limite di legge USA (µg/g)
2-Tiouracile	Tireostatico	-0,28	7,75	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂ S		N.A
Acetilpromazina	Tranquillante	3,49	9,3	C ₁₉ H ₂₂ N ₂ O ₂ S		N.A
Amoxicillina	β-Lattame	0,86	2,4	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S		0,01

Nome	Classe farmaco	Log P	pKa	Formula molecolare	Struttura	Limite di legge USA (µg/g)
Bitionolo	Vermicida	5,51	4,82	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$		N.A
Cefazolina	Cefalosporina	-1,5	2,3	$C_{14}H_{14}N_8O_4S_3$		N.A.
Cloramfenicolo	Fenicolo	1,14	5,5	$C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$		(c)
Clorpromazina	Tranquillante	5,20	9,3	$C_{17}H_{19}ClN_2S$		N.A
Clortetraciclina	Tetraciclina	0,24	3,3 7,4 9,3	$C_{22}H_{23}ClN_2O_8$		2 (d)
Ciprofloxacina	Fluorochinolone	0,28	6,09 8,74	$C_{17}H_{18}FN_3O_3$		(c)
Clorsulon	Vermicida	1,25	-	$C_8H_8Cl_3N_3O_4S_2$		0,1 (e)
Danofloxacina	Fluorochinolone	1,2	6,04	$C_{19}H_{20}FN_3O_3$		0,02 (a, e)

Nome	Classe farmaco	Log P	pKa	Formula molecolare	Struttura	Limite di legge USA (µg/g)
Difloxacina	β-Lattame	2,78	5,85	C ₂₁ H ₁₉ F ₂ N ₃ O ₃		N.A.
Doxiciclina	Tetraciclina	-0,54	3,4	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈		N.A
Fenbendazolo	Antelmintico	3,75	10,27	C ₁₅ H ₁₃ N ₃ O ₂ S		0,4 (e, h), 2 (b)
Florfenicolo	Fenicolo	-0,12	10,73	C ₁₂ H ₁₄ C ₁₂ FNO ₄ S		0,2 (b)
Ketoprofene	Tranquillante	2,81	3,88	C ₁₆ H ₁₄ O ₃		N.A
Levamisolo	Antelmintico	1,85	8,0	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S		0,1 (e)
Lincomicina	Lincosamide	0,91	7,8	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S		0,1(b)
Melengestrol acetato (MGA)	Altri	4,21	11,42	C ₂₅ H ₃₂ O ₄		0,025 (g)

Nome	Classe farmaco	Log P	pKa	Formula molecolare	Struttura	Limite di legge USA (µg/g)
Metronidazolo-OH	Nitroimidazolo	-0,81	3,09	C ₆ H ₉ N ₃ O ₄		(c)
Morantel	Antelmintico	1,97	>12	C ₁₂ H ₁₆ N ₂ S		N.A
Nicosamide	Vermicida	5,41	5,6	C ₁₃ H ₈ C ₁₂ N ₂ O ₄		N.A
Norfloxacina	Fluorochinolone	0,82	6,32	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃		(c)
Ossifenilbutazone	NSAID	2,72	4,87	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₃		N.A
Ossitetraciclina	Tetraciclina	-1,5	3,27	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉		2 (d)
Prednisone	Corticosteroide	1,57	12,58	C ₂₁ H ₂₆ O ₅		N.A
Ractopamina	β-Agonista	1,65	9,4	C ₁₈ H ₂₃ NO ₃		0,03 (e)
Sulfametizolo	Solfonammide	0,51	5,45	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₂ S ₂		N.A

Nome	Classe farmaco	Log P	pKa	Formula molecolare	Struttura	Limite di legge USA (µg/g)
Sulfametossipiridazina	Solfonammide	0,32	6,7	C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S		N.A
Tilosina	Macrolide	3,27	7,7	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇		0,2 (f)

a Limite nel fegato di bovino (per la tulatromicina è stato stabilito un residuo marker)

b Limite nel muscolo di suino

c Vietato per uso fuori etichetta

d La tolleranza è la somma dei residui di tetraciclina, incluse clortetraciclina, ossitetraciclina e tetraciclina nei muscoli

e Limite nel muscolo di bovino

f Limite nel grasso, muscolo, fegato e rene di bovino non cotti

g Limite nel grasso di bovino

h Limite nel muscolo di capra

Risultati sperimentali

Tutti i reagenti e i solventi utilizzati erano di grado HPLC o analitico. Acetonitrile (ACN) è stato acquistato da Honeywell (Muskegon, MI, USA). Il dimetilsolfossido (DMSO), gli standard dei farmaci veterinari e lo standard interno sono stati acquistati da Sigma-Aldrich, Corp. (St Louis, MO, USA). L'acido formico di grado reagente (FA) è stato acquistato da Agilent (codice G2453-86060). L'acetato di ammonio (NH₄OAc) è stato acquistato da Fisher Chemicals (Fair Lawn, NJ, USA).

Soluzioni e standard

L'acido formico (5%) in ACN è stato preparato aggiungendo 5 mL di acido formico a 95 mL di ACN. La soluzione stock di acetato di ammonio (1 M) è stata ottenuta dissolvendo 19,27 g di NH₄OAc in 250 mL di acqua Milli-Q. La soluzione è stata conservata a 4 °C. Una soluzione a 5 mM di acetato di ammonio in acqua è stata ottenuta aggiungendo 5 mL di soluzione stock di acetato di ammonio (1 M) a 1 L di acqua Milli-Q.

Soluzioni stock di standard e standard interno (SI) sono state ottenute in DMSO a 2,0 mg/mL, tranne la soluzione stock di danofloxacina (in DMSO a 1,0 mg/mL) e la soluzione stock di ciprofloxacina (in DMSO a 0,25 mg/mL). Soluzioni stock di amoxicillina e cefazolina sono state ottenute in acqua a 2,0 mg/mL. Tutte le soluzioni stock sono state preparate in vial di

vetro ambrato, ad eccezione dei vial di plastica utilizzati per le soluzioni madre di amoxicillina e cefazolina. Tutte le soluzioni stock sono state conservate a -20 °C. I 30 composti sono stati divisi in due gruppi, G1 e G2, in base alla risposta degli strumenti. È stata preparata una soluzione di lavoro standard combinata 25/5 µg/mL (G1/G2) in ACN e acqua in proporzione 1/1. È stata preparata una soluzione di lavoro di Flunixin-d₃ IS (25 µg/mL) in ACN e acqua in proporzione 1/1.

Apparecchiature

Le apparecchiature e i materiali usati per la preparazione del campione comprendevano:

- Geno/Grinder (SPEX, Metuchen, NJ, USA)
- Centrifuga Centra CL3R (Thermo IEC, MA, USA)
- Microcentrifuga Eppendorf (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Vortexer e vortexer multitubo (VWR, Radnor, PA, USA)
- Dosatore per bottiglia (VWR, So. Plainfield, NJ, USA)
- Pipette e ripetitore Eppendorf
- Tubi Agilent Bond Elut EMR—Lipid (codice 5982-1010), Agilent Bond Elut Final Polish for Enhanced Matrix Removal-Lipid (codice 5982-0101)

Strumentazione

Le analisi sono state effettuate su un Sistema LC Agilent 1290 Infinity costituito da:

- Pompa quaternaria Agilent 1290 Infinity (G4204A)
- Autocampionatore ad alte prestazioni Agilent 1290 Infinity (G4226A) dotato di Termostato Agilent 1290 Infinity (G1330B) e comparto colonna termostato Agilent 1290 Infinity (G1316C)

Il sistema UHPLC è stato abbinato a un sistema LC/MS Agilent 6490 a triplo quadrupolo dotato di sorgente di ionizzazione elettrospray Agilent Jet Stream e tecnologia iFunnel. Per l'acquisizione dei dati e relativa analisi è stato usato il software Agilent MassHunter Workstation.

Condizioni della strumentazione

Condizioni dell'HPLC

Colonna:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2,1 × 150 mm, 2,7 µm (codice 693775-902), Agilent Poroshell 120 EC-C18 UHPLC Guard, 2,1 × 5 mm, 2,7 µm (codice 821725-911)
Fase mobile:	A) 0,1% di FA in acqua B) 0,1% di FA in acetonitrile
Flusso:	0,3 mL/min
Temp. colonna:	40 °C
Temp. autocampionatore:	4 °C
Volume di iniezione:	3 µL
Lavaggio dell'ago:	1:1:1 ACN:MeOH:IPA:H2O con 0,2% di FA
Gradiente:	Tempo (min) %B 0 10 0,5 10 8,0 100
Tempo finale:	12 min
Posttime (Tempo post-analisi):	3 min

Condizioni, MS

Modalità positiva/negativa

Temp. gas:	120 °C
Flusso di gas:	14 L/min
Nebulizzatore:	40 psi
Riscaldatore sheath gas:	400 °C
Flusso dello sheath gas:	12 L/min
Capillare:	3.000 V

Parametri iFunnel:	Positivo	Negativo
Alta pressione RF	90 V	90 V
Bassa pressione RF	70 V	60 V

Le condizioni DMRM relative agli analiti sono elencate nella Tabella 2 e la Figura 1 mostra un cromatogramma tipico.

Preparazione del campione

La procedura definitiva di preparazione del campione è stata ottimizzata con i passaggi seguenti:

1. Pesare 2 g ($\pm 0,1$ g) di fegato bovino omogeneizzato in un tubo per centrifuga da 50 mL.
2. Aggiungere 10 mL di acetonitrile acidificato (contenente il 5% di FA).
3. Mescolare i campioni in un agitatore meccanico per 2 minuti.
4. Centrifugare a 5.000 giri/min per 5 min.
5. Aggiungere 5 mL di tampone di acetato di ammonio (5 mM) a un tubo EMR-Lipid dSPE da 15 mL.
6. Trasferire 5 mL di soprannatante in un tubo EMR—Lipid.
7. Agitare in vortex immediatamente per disperdere il campione, poi miscelare per 60 secondi su un tavolo vortex multiposizione.
8. Centrifugare a 5.000 giri/min per 3 min.
9. Trasferire 5 mL di soprannatante in un tubo di purificazione EMR—Lipid da 15 mL contenente 2 g di sali (1:4 NaCl:MgSO₄) e agitare in vortex per 1 minuto.
10. Centrifugare a 5.000 giri/min per 3 min.
11. Combinare 200 µL dello strato superiore di ACN e 800 µL d'acqua in un vial da 2 mL e agitare in vortex.

Tabella 2. Parametri LC/MS/MS DMRM e tempi di ritenzione per analiti target.

Analita	RT (min)	Delta RT (min)	Polarità	Ione precursore (m/z)	Ione prodotto			
					Ione quantificatore CE (V)	Ione qualificatore CE (V)		
2-Tiouracile	1,41	2	Negativa	127	57,9	17	–	–
Amoxicillina	1,84	2	Positiva	366,1	349,2	5	114	25
Metronidazolo-OH	2,07	2	Positiva	188,1	123,1	9	126,1	13
Levamisolo	3,4	2	Positiva	205,1	178,1	21	91,1	41
Lincomicina	3,35	2	Positiva	407,2	126,1	37	70,1	80
Norfloxacina	4,22	2	Positiva	320,1	302,2	21	276,1	17
Ossitetraciclina	4,24	2	Positiva	461,2	426,1	17	443,2	9
Ciprofloxacina	4,31	2	Positiva	332,1	231	45	314,3	21
Danofloxacina	4,42	2	Positiva	358,2	340,2	21	81,9	53
Ractopamina	4,4	2	Positiva	302,2	107	33	77	77
Morantel	4,9	2	Positiva	221,1	123,1	37	76,9	80
Cefazolina	4,65	2	Positiva	455	323,1	9	156	13
Sulfametizolo	4,65	2	Positiva	271	156,1	13	92	29
Sulfametossipiridazina	4,69	2	Positiva	281,1	92	33	65,1	57
Difloxacina	4,83	2	Positiva	400,2	382	25	356,3	17
Clortetraciclina	5,11	2	Positiva	479,1	444,2	21	462,1	17
Doxiciclina	5,24	2	Positiva	445,2	428,1	17	410,2	25
Florfenicolo	5,47	2	Negativa	300,1	268,1	25	159,1	41
Cloramfenicolo	5,68	2	Negativa	321	152	17	257,1	9
Tilosina	5,85	2	Positiva	916,5	173,9	45	772,5	33
Clorsulon	5,86	2	Negativa	377,9	341,9	9	–	–
Prednisone	5,88	2	Positiva	359,2	147,2	33	341,2	9
Acetilpromazina	5,93	2	Positiva	327,2	86	21	58	45
Clorpromazina	6,49	2	Positiva	319,1	86	21	58,1	45
Fenbendazolo	6,77	2	Positiva	300,1	268,1	25	159,1	41
Ketoprofene	6,8	2	Positiva	255,1	208,9	13	77	57
Ossifenilbutazone	7,27	2	Negativa	323,1	133,9	25	295	17
Flunixin-d ₃ (NEG)	7,53	2	Negativa	298,1	254,2	17	192	37
Flunixin-d ₃ (POS)	7,53	2	Positiva	300,1	282	25	264	41
Melengestrol acetato	8,78	2	Positiva	397,2	337,4	13	279,2	21
Niclosamide	8,82	2	Negativa	325	170,9	25	289,1	13
Bitionolo	9,49	2	Negativa	352,9	161	21	191,8	25

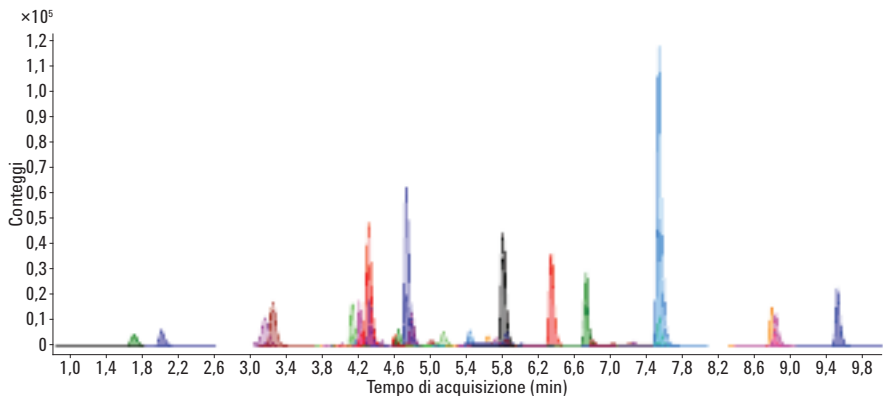


Figura 1. Un tipico cromatogramma LC/MS/MS (DMRM) di un campione di fegato bovino arricchito con uno standard di farmaco veterinario di 50 ng/g ed estratto tramite precipitazione di proteine seguita da purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

Il campione è ora pronto per l'analisi LC/MS/MS. Il percorso completo del flusso di preparazione del campione viene mostrato

nella Figura 2.

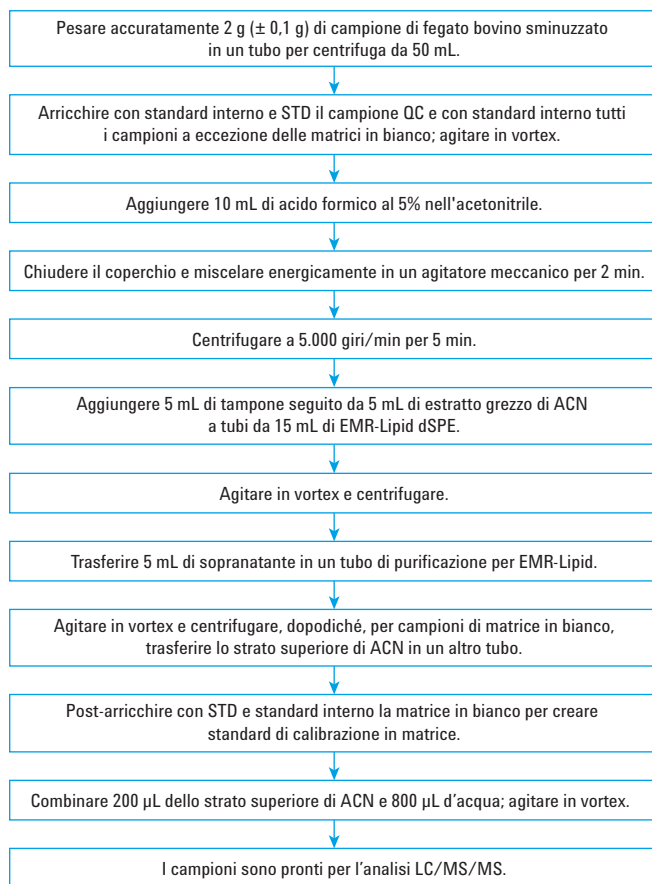


Figura 2, Procedura di preparazione del campione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid per l'analisi di farmaci veterinari in fegato di bovino.

Standard di calibrazione e campioni di controllo qualità

I campioni QC precedentemente arricchiti sono stati arricchiti con soluzioni standard di lavoro appropriatamente combinate, dopo la fase 1, per sei replicati. Per gli analiti G1, i campioni QC corrispondono a 10, 50, 250, e 750 ng/g nel fegato. Per gli analiti G2, i campioni QC corrispondono a 2, 10, 50, e 150 ng/g nel fegato. Anche la soluzione IS è stata arricchita in tutti i campioni eccetto la matrice in bianco, corrispondendo a 200 ng/g di flunixin-d₃ nel fegato.

Gli standard di calibrazione abbinati alla matrice sono stati preparati con standard e soluzioni di lavoro IS. Le concentrazioni scelte nei campioni di matrice in bianco dopo la fase 8 corrispondono a 5, 25, 50, 250, 750, e 1.000 ng/g nel fegato (G1), o 1, 5, 10, 50, 150, e 200 ng/g nel fegato (G2), e 200 ng/g di IS nel fegato.

Determinazione della quantità di interferenti

La quantità di interferenti estratti è stata stabilita tramite misure gravimetriche [7] per tre diverse tecniche di purificazione; C18, adsorbente in zirconia ed EMR—Lipid. I campioni sono stati preparati come descritto di seguito:

1. Scaldare i tubi di vetro per circa 1 ora a 110 °C per eliminare l'umidità.
2. Raffreddare i tubi a temperatura ambiente.
3. Pesare i tubi di analisi.
4. Trasferire accuratamente 1 mL di estratto iniziale di matrice in bianco (no purificazione) e le matrici in bianco con le differenti purificazioni, ognuna in duplicato.
5. Asciugare tutti i campioni con una CentriVap a 50 °C per 1 h, o fino a quando sono asciutti.
6. Riscaldare i tubi per circa 1 h a 110 °C per eliminare l'umidità.
7. Raffreddare i tubi a temperatura ambiente.
8. Ripesare i tubi.

La differenza di peso tra la fase 8 e la fase 3 è la quantità di interferenti estratti del campione. La quantità di interferenti rimossa dalla purificazione era la differenza media di peso degli interferenti della matrice prima e dopo la purificazione.

Valutazione dell'effetto matrice

L'effetto matrice cromatografico è stato valutato tramite un esperimento di infusione post-colonna. I campioni di matrice in bianco sono stati iniettati simultaneamente ad una infusione post-colonna di 10 ppb di soluzione pura standard di farmaco veterinario a 60 µL/min. Tutte le transizioni di composto sono state monitorate durante tutto il ciclo LC.

Abbiamo inoltre confrontato la risposta dell'analita (area del picco) tra gli estratti di fegato arricchiti dopo l'estrazione e le soluzioni pulite equivalenti. Gli estratti di fegato arricchiti sono stati fatti arricchendo con la soluzione standard l'estratto di matrice in bianco di fegato. La differenza nelle risposte (area del picco) è direttamente correlata agli effetti della matrice.

Ottimizzazione, validazione e comparazione del metodo

Sono stati effettuati diversi test durante l'ottimizzazione: 5% di FA in ACN rispetto a 1% di FA in ACN per la precipitazione di proteine; tampone acetato di ammonio rispetto ad acqua per la purificazione con EMR—Lipid; con e senza sali di purificazione dopo purificazione con EMR—Lipid. I risultati sono stati analizzati in base a recupero di analiti, precisione e altri parametri quantitativi. Il metodo ottimizzato finale è stato poi validato eseguendo un lotto di quantificazione completo con curva di calibrazione in doppio applicati a tutti i campioni QC.

I dati di comparazione del recupero sono stati raccolti tramite arricchimento prima e dopo l'estrazione dei campioni di fegato a 50 ng/g. Gli estratti sono poi stati trattati secondo i protocolli di purificazione da testare. Per il protocollo EMR—Lipid con precipitazione di proteine è stata applicata la procedura di purificazione illustrata in Figura 2. Per QuEChERS, è stata eseguita una purificazione dSPE con C18 o con adsorbente in zirconia, come di seguito descritto.

1. Pesare 2 g di fegato in un tubo da 50 mL.
2. Aggiungere 8 mL di tampone di fosfato (pH 7,0) e 10 mL di ACN acidificato (5% di FA).
3. Agitare in vortex il campione per 30 secondi.
4. Aggiungere sali EN per partizione/estrazione e agitare energicamente in un agitatore meccanico.
5. Centrifugare a 5.000 giri/min per 5 min.

L'estratto di fegato grezzo in ACN usato per ulteriori purificazioni è stato preparato nel modo seguente.

1. Aggiungere 1 mL di estratto di fegato grezzo in ACN a un vial da 2 mL contenente 25 mg di C18 e 150 mg di MgSO₄ (codice 5982-4921), o a un vial da 2 mL contenente 100 mg di adsorbente in zirconia.
2. Chiudere il coperchio e agitare in vortex per 1 minuto.
3. Centrifugare a 13.000 giri/min per 3 minuti (micro-centrifuga).
4. Trasferire 200 µL di soprannatante in un altro vial contenente 800 µL d'acqua.
5. Agitare in vortex e filtrare con un filtro in cellulosa rigenerata da 0,45 µm.

I campioni sono quindi pronti per l'analisi LC/MS/MS. I recuperi sono stati calcolati con il rapporto delle aree del picco dell'analita dai campioni arricchiti pre- e post-estrazione.

Risultati e discussione

Quantità di interferenti estratti

La Tabella 3 mostra i risultati del test gravimetrico sugli interferenti del campione, dimostrando chiaramente che una dSPE con EMR—Lipid garantisce la migliore efficienza di purificazione della matrice in termini di peso, se paragonata a dSPE con C18 o adsorbente in zirconia.

Tabella 3. Risultati gravimetrici degli interferenti della matrice di fegato di bovino per purificazioni con Agilent Bond Elut EMR—Lipid, zirconia e C18.

Tecnica di purificazione	Interferenti per 1 mL di estratto finale di ACN (mg) (n = 2)	Efficienza di rimozione degli interferenti della matrice per purificazione (%)
Nessuna purificazione ulteriore	12,1	–
dSPE con EMR—Lipid	5,3	56,2
Separazione tramite zirconia con dSPE	6,0	50,4
dSPE con C18	7,8	35,5

Valutazione dell'effetto matrice

Un'infusione post-colonna (PCI) di standard di farmaco veterinario è stata utilizzata per l'analisi dell'effetto matrice negli estratti in ACN grezzi e in tre estratti in ACN finali purificati con EMR—Lipid, C18 e sorbente in zirconia. Tutti gli analiti sono stati monitorati durante tutto il ciclo LC. I cromatogrammi PCI riflettono l'impatto della matrice per gli analiti monitorati in modalità positiva e negativa. L'estratto ACN finale non è stato diluito prima dell'iniezione e l'ACN è stato iniettato direttamente. I profili PCI sono mostrati in Figura 3.

Come evidenziato dalla traccia rossa, sono state osservate significative soppressioni di segnale (linea di base inferiore) e incrementi di segnale (picchi di grandi dimensioni) in seguito a iniezione di matrice di fegato grezza in bianco senza purificazione. Tale effetto matrice ha un impatto negativo notevole sull'affidabilità del metodo e la qualità dei dati. In confronto, come evidenziato dalla traccia blu, il ricorso a purificazione con EMR—Lipid ha prodotto miglioramenti significativi, come indicato dalla diminuzione di soppressioni e incrementi del segnale.

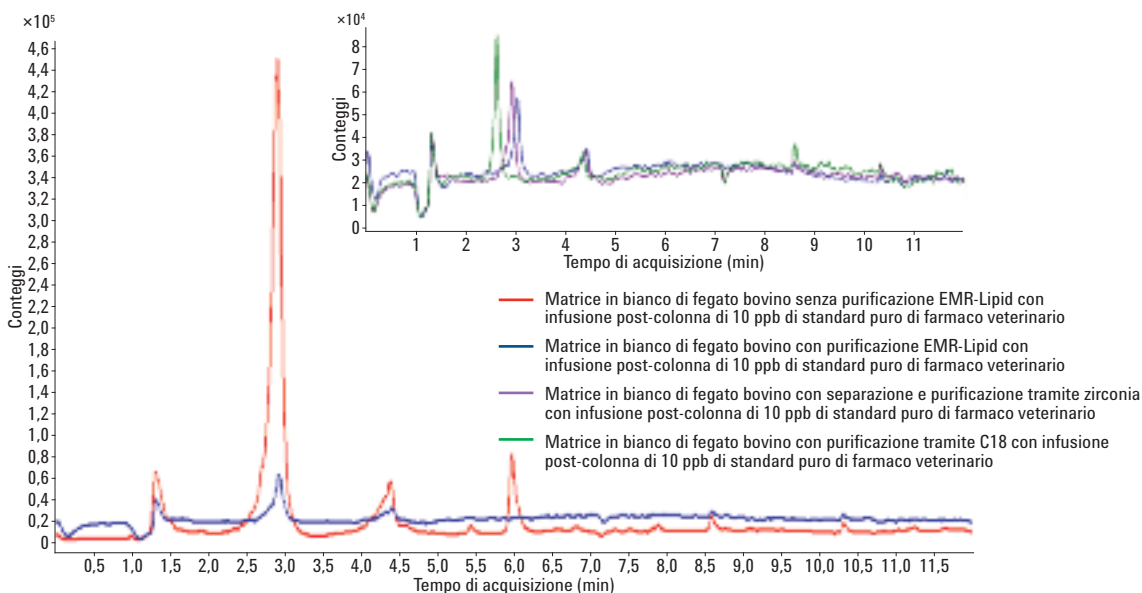


Figura 3. I profili di infusione post-colonna sono stati generati iniettando un campione di matrice in bianco di fegato di bovino (BL) con infusione post-colonna simultanea di 10 ppb di soluzione standard di farmaco veterinario. Tutti gli analiti sono stati monitorati per l'analisi cromatografica e il profilo è un cromatogramma ionico totale (TIC) combinato di tutte le transizioni acquisite degli analiti.

Il cromatogramma in Figura 3 mostra i profili PCI con l'iniezione di campioni di matrice in bianco utilizzando purificazioni differenti. I profili per EMR—Lipid (in blu) e per adsorbente in zirconia (in viola) sono simili. Anche il profilo di purificazione con C18 (in verde) mostra similitudini con gli altri due, ma con più regioni di incremento e soppressione di matrice. Il confronto corrisponde a quello dell'analisi gravimetrica degli interferenti, in cui la purificazione con EMR—Lipid presenta un'efficienza di purificazione leggermente superiore rispetto all'adsorbente in zirconia ed entrambi garantiscono una purificazione migliore rispetto al C18.

Anche il confronto della risposta degli analiti nei campioni di matrice arricchita post-estrazione e negli standard puri è stato utilizzato per valutare l'effetto matrice. Per la maggior parte degli analiti, non si sono osservate differenze significative nella risposta degli analiti. Tuttavia, negli ultimi composti di eluizione, che presentano un grado di idrofobia più elevato, è stata osservata una maggiore soppressione ionica della matrice in campioni purificati con C18 e adsorbente in zirconia. Poiché per la maggior parte delle interferenze dovute a lipidi l'eluizione richiede più tempo, la riduzione della soppressione ionica della matrice negli analiti idrofobi conferma che EMR—Lipid rimuove efficacemente i lipidi se paragonato a dSPE con C18 e adsorbente di zirconia. La Figura 4 mostra due esempi di come la purificazione con EMR—Lipid riduca l'effetto matrice di soppressione ionica.

Ottimizzazione del metodo

Anche il solvente impiegato nella fase di precipitazione delle proteine è stato sottoposto ad analisi. È risaputo che l'acetonitrile precipita le proteine in maniera efficace con un rapporto campione:organico che va da 1:3 a 1:5, mentre l'acetonitrile acidificato garantisce una maggiore resa sulla precipitazione. Il fegato bovino (BL) è una matrice complessa e la rimozione di proteine è importante non solo per la rimozione dalla matrice, ma anche per facilitare un'efficiente purificazione con EMR—Lipid. In questo studio, proporzioni di 1% e 5% di FA in ACN sono state testate nella fase di precipitazione delle proteine seguita da purificazione con EMR—Lipid e analisi con LC/MS/MS. L'utilizzo di 5% di FA in ACN ha garantito una maggiore precisione, come mostrato dalle curve di calibrazione (Figura 5). Anche i recuperi degli analiti sono stati confrontati e di nuovo il 5% di FA in ACN ha garantito una maggiore precisione.

È importante che una quantità extra di acqua o tampone sia aggiunta per attivare il materiale EMR-Lipid. Ciò migliora la sua interazione con la parte indesiderata della matrice del campione, specialmente i lipidi, risultando in una rimozione della matrice più efficace. Gli effetti dell'utilizzo del tampone acetato di ammonio (5 nM) durante la purificazione con EMR—Lipid sono stati analizzati e i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti con l'impiego di acqua. In generale, l'utilizzo del tampone acetato di ammonio ha migliorato il recupero di molti analiti tra il 5 e il 10%, tranne che per le tetracicline.

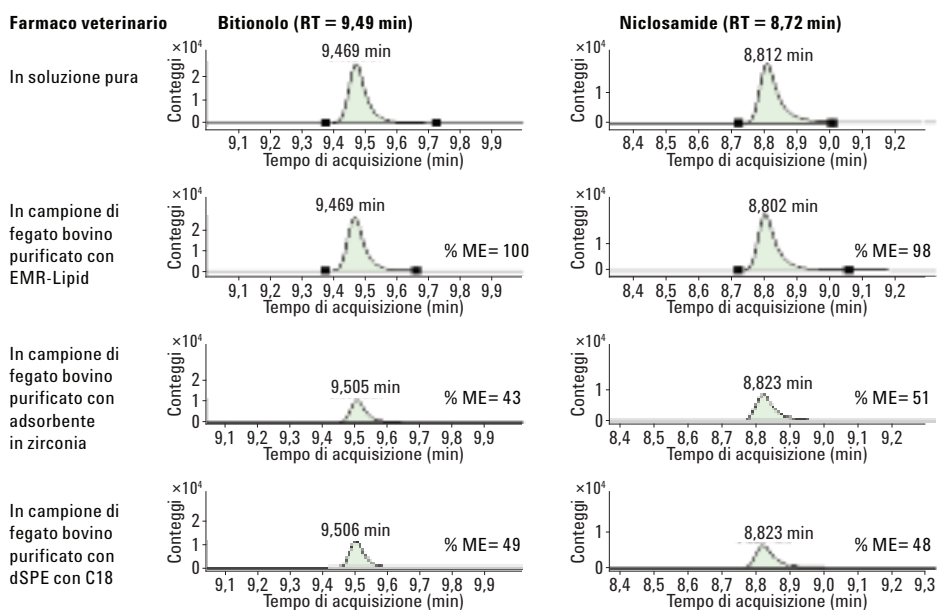


Figura 4. Confronto degli effetti matrice di soppressione ionica per analiti idrofobi. L'effetto matrice (ME) è stato calcolato dal rapporto tra le aree del picco nell'estratto di fegato arricchito dopo l'estrazione e nel corrispondente standard puro.

Solvente utilizzato in estrazione per la precipitazione delle proteine

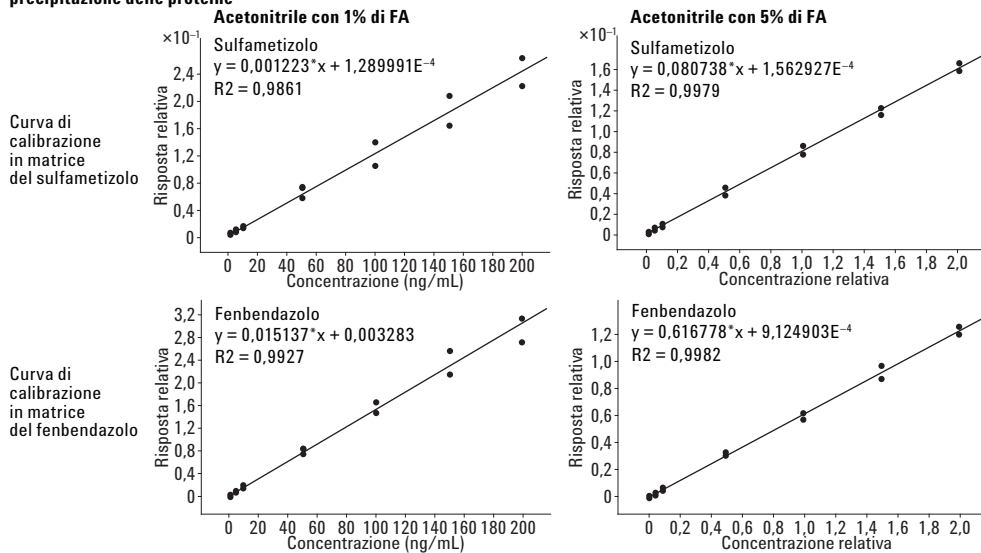


Figura 5. Confronto della linearità della curva di calibrazione utilizzando 1% di FA in ACN rispetto a 5% di FA in ACN per la precipitazione delle proteine.

Per questi composti, l'impiego di tamponi comporta una riduzione di circa il 5% dei recuperi, se paragonato all'utilizzo di acqua senza tamponi. Gli analiti che mostrano un'evidente differenza in termini di recupero, a seconda che si utilizzino tamponi piuttosto che acqua, sono stati selezionati per un confronto, illustrato in

Figura 6. Poiché il recupero di analiti migliora con l'impiego di tamponi e la perdita di tetraciclina causata dall'utilizzo di tamponi risulta minima, la soluzione con tampone 5 mM di acetato di ammonio è stata usata per il prosieguo dello studio.

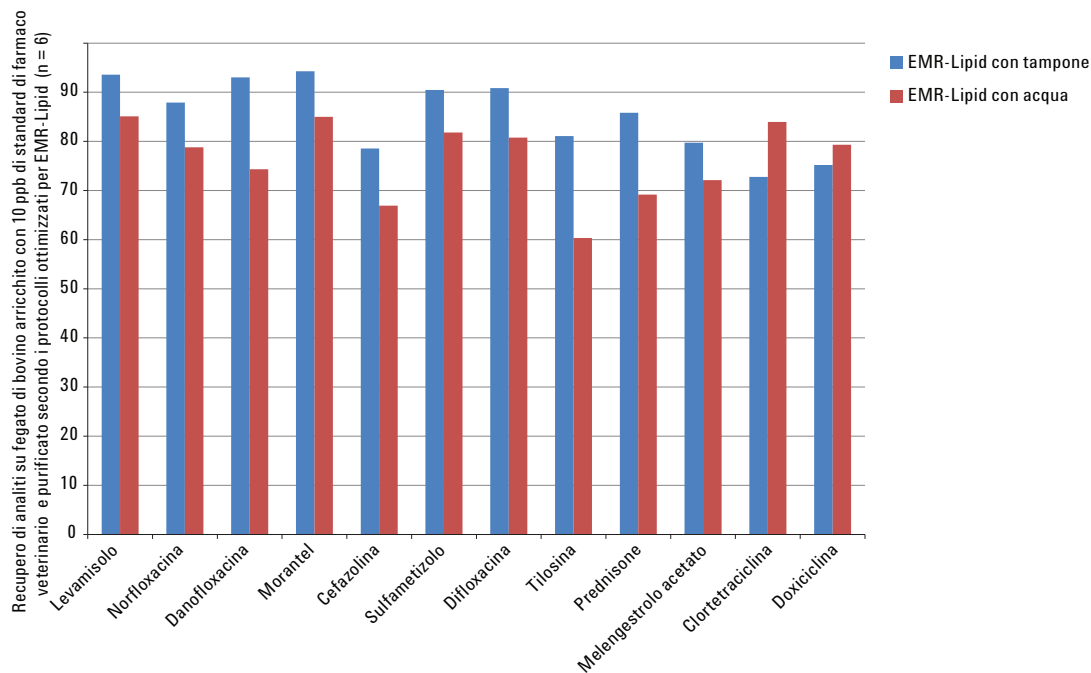


Figura 6. Confronto del recupero di analiti utilizzando un tampone 5 mM di acetato di ammonio rispetto ad acqua nella fase di purificazione dSPE con maggiore rimozione della matrice.

Dopo la purificazione con EMR-Lipid, il soprannatante è una miscela circa 1:1 di ACN e acqua. Un'aliquota di 5 mL di soprannatante viene poi trasferita in un tubo di purificazione EMR—Lipid, contenente 2 g di miscela di sali (4:1 MgSO₄:NaCl) per separare la fase organica da quella acquosa tramite partizione. Questa fase non solo produce la partizione ma facilita anche un'ulteriore purificazione della matrice e rimuove adsorbenti e sali disciolti in eccesso. Questa fase è quindi fortemente raccomandata sia per l'analisi GC che per quella LC. Nel corso dello sviluppo dei metodi, buoni livelli di recupero degli analiti e di precisione sono stati ottenuti per tutti gli analiti tranne le tetracicline. In seguito a ricerche più approfondite, abbiamo constatato che i bassi livelli di recupero delle tetracicline (dal 45 al 68%) erano conseguenza della fase di partizione dei sali. Per ridurre la perdita di tetracicline, è stato preso in esame un protocollo alternativo (Figura 7), che esclude i sali di purificazione EMR—Lipid. Questa procedura è analoga, tranne che in questo caso 400 µL di estratto (da una dSPE con EMR—Lipid) e 600 µL di acqua sono stati miscelati in un vial per micro-centrifuga e agitati con vortex per un minuto, senza eseguire la fase di purificazione. I campioni sono stati centrifugati in una micro-centrifuga a 13.000 giri/min per tre minuti e successivamente il soprannatante è stato trasferito in un vial da 2 mL per eseguire l'analisi LC/MS/MS. L'arricchimento post estrazione di standard e IS nella matrice in bianco è stato eseguito prima della fase di miscelazione/diluizione. Questo protocollo può essere considerato non partitivo, poiché i sali di partizione non sono stati utilizzati.

I risultati riportati in Figura 8 mostrano chiaramente che il recupero delle tetracicline può essere notevolmente migliorato grazie a questo protocollo alternativo. Tuttavia, i risultati dell'utilizzo del protocollo di purificazione (come mostrato in Figura 2) per le tetracicline possono essere considerati accettabili, poiché la precisione è significativa per la quantificazione. I bassi livelli di recupero possono essere corretti adottando un appropriato standard interno marcato stabile. In questo studio, abbiamo estratto separatamente i campioni per il protocollo alternativo di non-purificazione dopo una purificazione con EMR—Lipid, e riportato tre esiti per tetracicline (ossitettraciclina, clortetraciclina e doxiciclina) dal protocollo alternativo.

Confronto tra metodi

Il metodo ottimizzato EMR-Lipid è stato successivamente confrontato con un metodo QuEChERS tradizionale con purificazione dSPE tramite C18 e purificazione tramite adsorbente in zirconia. Il metodo QuEChERS è usato spesso per l'estrazione di analiti o residui e prevede una fase di purificazione dSPE. La Figura 9 mostra i risultati statistici del confronto tra i livelli di recupero, mentre la Figura 10 mostra il confronto tra analiti complessi e problematici. Il protocollo ottimizzato EMR—Lipid garantisce miglioramenti significativi in termini di recupero e precisione degli analiti problematici, in particolare rispetto all'adsorbente in zirconia, che offre un basso grado di recupero per le classi fluorochinoloni e tetracicline. Solo l'ossitettraciclina e la niclosamide hanno mostrato

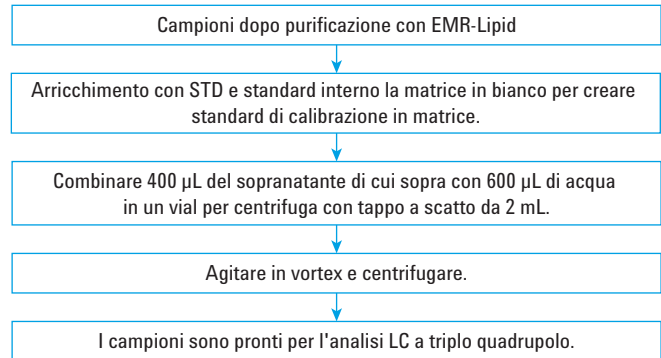


Figura 7. Procedura opzionale dopo la purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid per migliorare il recupero della tetraciclina.

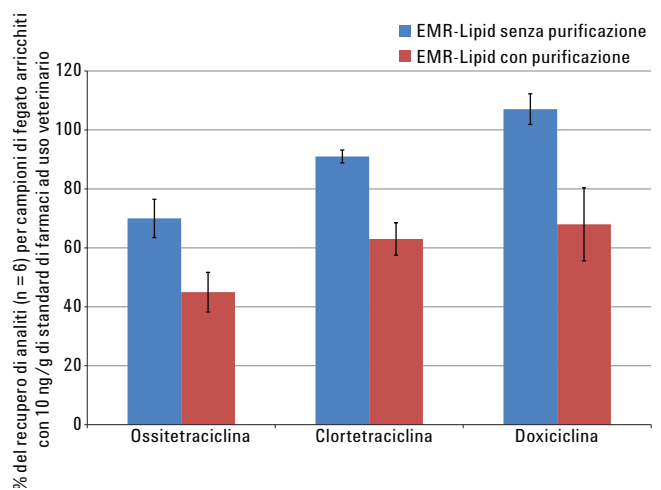


Figura 8. Confronto di precisione e recupero di tetraciclina per campioni di fegato preparati con e senza una fase di purificazione in seguito a purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid.

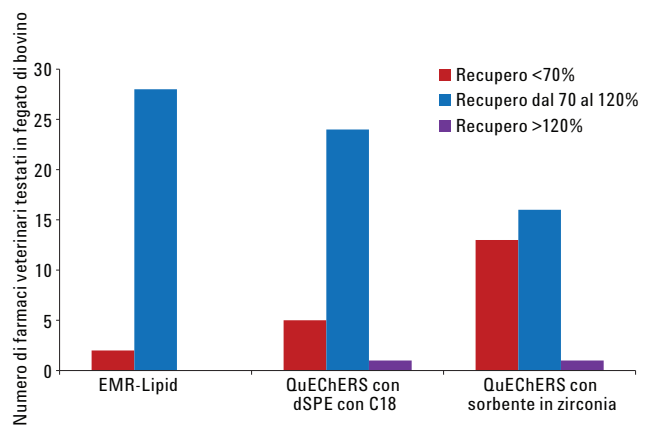


Figura 9. Risultati statistici di recupero per un confronto tra il protocollo Agilent Bond Elut EMR—Lipid e i protocolli tradizionali QuEChERS.

un recupero assoluto rispettivamente del 67% e 68%. Tuttavia, la precisione per questi due composti nell'arco di sei cicli è stata accettabile, con valori RSD rispettivamente del 12,8% e del 2,0%, considerati accettabili in base alle linee guida SANCO [9]. Questi risultati sono superiori a quelli ottenuti con gli altri due protocolli, che prevedono dSPE con C18 e adsorbenti di zirconia.

Validazione del metodo

Il metodo ottimizzato EMR—Lipid è stato validato eseguendo un set di campioni di quantificazione completo, adottando il metodo descritto nel paragrafo sulla preparazione dei campioni. Uno standard interno (flunixin-d₃ per modalità positiva e negativa) è stato utilizzato per la determinazione di accuratezza e precisione. Il recupero assoluto di flunixin-d₃ è risultato essere tra il 90 e il 100%. Pertanto, l'accuratezza coincide quasi con i recuperi

assoluti. La Tabella 4 mostra i risultati di quantificazione. Una sintesi dei dati di accuratezza (Figura 11) è stata generata determinando accuratezza e precisione di 24 QC a quattro differenti livelli (G1 = 10, 50, 250, e 750 ppb e G2 = 2, 10, 50, e 150 ppb; vedere il paragrafo sugli standard di calibrazione), con sei repliche per ciascun livello. Livelli di accuratezza accettabili (dal 70 al 120%) sono stati raggiunti per il 93% degli analiti, fatta eccezione per due valori anomali, che si collocano leggermente al di sotto di un recupero del 70%, con RSD buono. I valori RSD relativi a sei repliche per ciascun livello sono stati eccezionali, collocandosi al di sotto del 10% per la maggior parte dei composti. È opportuno segnalare che ractopamina e ketoprofene sono stati individuati a bassi livelli nel bianco di fegato bovino, producendo un range di calibrazione differente.

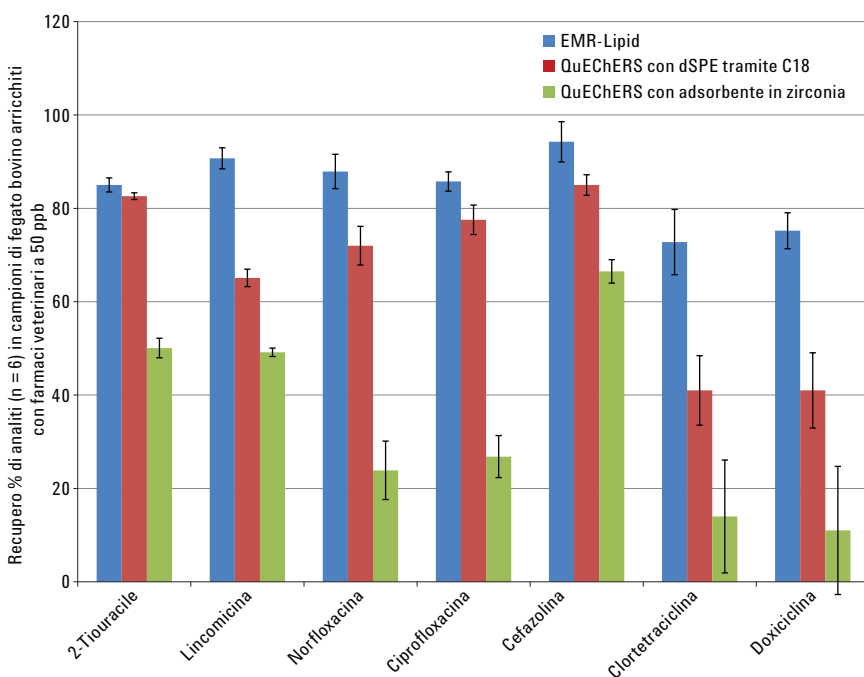


Figura 10. Risultati del recupero di alcuni analiti selezionati confrontando il protocollo Agilent Bond Elut EMR-Lipid con i protocolli tradizionali. I risultati relativi a clortetraciclina e doxiciclina sono stati generati con un protocollo alternativo, mostrato in Figura 6. Per gli altri composti si è adottato il protocollo mostrato in Figura 1.

Tabella 4. Risultati di quantificazione per gli analiti target utilizzando Agilent Bond Elut EMR-Lipid. Ciascun analita è stato analizzato a quattro livelli di concentrazione per sei repliche per ciascun livello.

N. gruppo	Analita	Curva di calibrazione		Recupero e precisione del metodo (ng/g QCs)												
		Adatt. regressione/peso	R ²	Intervallo cal. 2 (ng/g)	10		50		150		250		750			
					Rec%	RSD	Rec%	RSD	Rec%	RSD	Rec%	RSD	Rec%	RSD		
1	2-Tiouracile	Lineare, 1/x	0,9976	5-1.000	—	—	106,6	4,9	93,6	5,4	—	—	87,0	3,0	85,4	8,3
1	Amoxicillina	Lineare, 1/x	0,9978	5-1.000	—	—	65,9	12,1	74,3	8,8	—	—	79,5	4,1	79,7	4,8
1	Metronidazolo-OH	Lineare, 1/x	0,9981	5-1.000	—	—	92,6	15,1	89,4	6,6	—	—	89,4	3,5	89,7	3,3
1	Ossitettraciclina	Lineare, 1/x	0,9963	5-1.000	—	—	73,9	19,1	71,2	14,0	—	—	67,0	12,8	63,4	9,0
1	Cefazolina	Lineare, 1/x	0,9966	5-1.000	—	—	72,1	9,4	81,2	2,7	—	—	86,7	3,8	82,9	3,0
1	Difloxacina	Lineare, 1/x	0,9978	5-1.000	—	—	79,0	8,3	86,5	5,9	—	—	104,4	5,1	97,7	6,3
1	Clortetraciclina	Lineare, 1/x	0,9928	5-1.000	—	—	100,6	14,1	96,9	9,5	—	—	93,8	14,0	85,0	11,6
1	Doxiciclina	Lineare, 1/x	0,9972	5-1.000	—	—	118,9	12,0	102,7	10,0	—	—	110,0	7,7	104,5	8,6
1	Florfenicolo	Lineare, 1/x	0,9942	5-1.000	—	—	103,4	6,2	107,9	6,0	—	—	115,2	13,5	107,0	4,0
1	Cloramfenicolo	Lineare, 1/x	0,9962	5-1.000	—	—	103,6	6,6	107,1	7,9	—	—	113,7	9,8	100,9	5,2
1	Clorsulon	Lineare, 1/x	0,9954	5-1.000	—	—	77,9	10,3	104,4	6,0	—	—	102,2	7,1	94,3	3,3
1	Prednisone	Lineare, 1/x	0,9984	5-1.000	—	—	105,9	9,1	92,1	11,1	—	—	103,9	10,5	94,5	2,3
1	Ossifenilbutazone	Lineare, 1/x	0,9903	5-1.000	—	—	93,6	3,4	91,9	5,2	—	—	93,7	5,6	97,0	4,6
1	Melengestrol acetato	Lineare, 1/x	0,9994	5-1.000	—	—	70,6	1,4	77,3	3,0	—	—	82,8	2,1	77,1	2,6
1	Bitionolo	Quadratica, 1/x	0,9981	5-1.000	—	—	69,4	6,2	90,4	2,9	—	—	91,3	4,3	83,1	3,7
2	Levamisolo	Lineare, 1/x	0,9967	1-200	84,5	11,3	95,5	5,1	103,8	5,2	89,4	9,7	—	—	—	—
2	Lincomicina	Lineare, 1/x	0,9950	1-200	89,5	16,4	79,6	10,6	74,1	4,5	74,8	11,2	—	—	—	—
2	Norfloxacina	Lineare, 1/x	0,9960	1-200	89,5	9,7	89,2	4,7	95,8	7,4	93,5	7,2	—	—	—	—
2	Ciprofloxacina	Lineare, 1/x	0,9980	1-200	81,0	5,6	83,6	6,9	96,9	4,1	99,5	5,9	—	—	—	—
2	Danofloxacina	Lineare, 1/x	0,9985	1-200	78,2	7,8	86,2	5,8	99,5	7,8	96,9	4,8	—	—	—	—
2	Ractopamina	Lineare, 1/x	0,9961	10-200 ^b	—	—	98,1	15,5	105,0	10,4	102,5	6,8	—	—	—	—
2	Morantel	Lineare, 1/x	0,9960	1-200	89,5	4,9	95,1	4,5	101,0	8,6	94,1	7,4	—	—	—	—
2	Sulfametizolo	Lineare, 1/x	0,9928	1-200	85,7	14,6	89,2	8,1	93,9	4,9	88,0	10,4	—	—	—	—
2	Sulfametossipiridazina	Lineare, 1/x	0,9973	1-200	84,7	8,1	84,4	2,9	89,9	5,7	84,9	6,2	—	—	—	—
2	Tilosina	Lineare, 1/x	0,9967	1-200	80,6	11,2	75,6	2,7	71,0	4,5	65,3	2,3	—	—	—	—
2	Acetilpromazina	Lineare, 1/x	0,9973	1-200	74,1	6,3	73,5	3,0	77,2	4,9	75,2	5,3	—	—	—	—
2	Clorpromazina	Lineare, 1/x	0,9967	1-200	66,1	6,1	67,8	3,8	73,4	4,3	72,7	6,5	—	—	—	—
2	Fenbendazolo	Lineare, 1/x	0,9988	1-200	74,6	7,7	82,3	4,6	97,9	9,9	84,9	3,5	—	—	—	—
2	Ketoprofene	Lineare, 1/x	0,9978	5-200 ^c	—	—	88,3	7,2	98,1	6,9	94,5	3,8	—	—	—	—
2	Niclosamide	Lineare, 1/x	0,9996	1-200	60,0	15,3	66,6	4,7	71,7	2,0	67,6	3,1	—	—	—	—

^a Gli analiti del Gruppo 1 hanno un range di calibrazione da 5 a 1.000 ng/g e livelli di arricchimento QC di 10, 50, 250, e 750 ng/g. Gli analiti del Gruppo 2 hanno un range di calibrazione da 1 a 200 ng/g e livelli di arricchimento QC di 2, 10, 50, e 150 ng/g.

^b Range di calibrazione modificato dovuto a ractopamina individuata nel bianco di controllo di fegato di bovino.

^c Range di calibrazione modificato dovuto a ketoprofene individuato nel bianco di controllo di fegato di bovino.

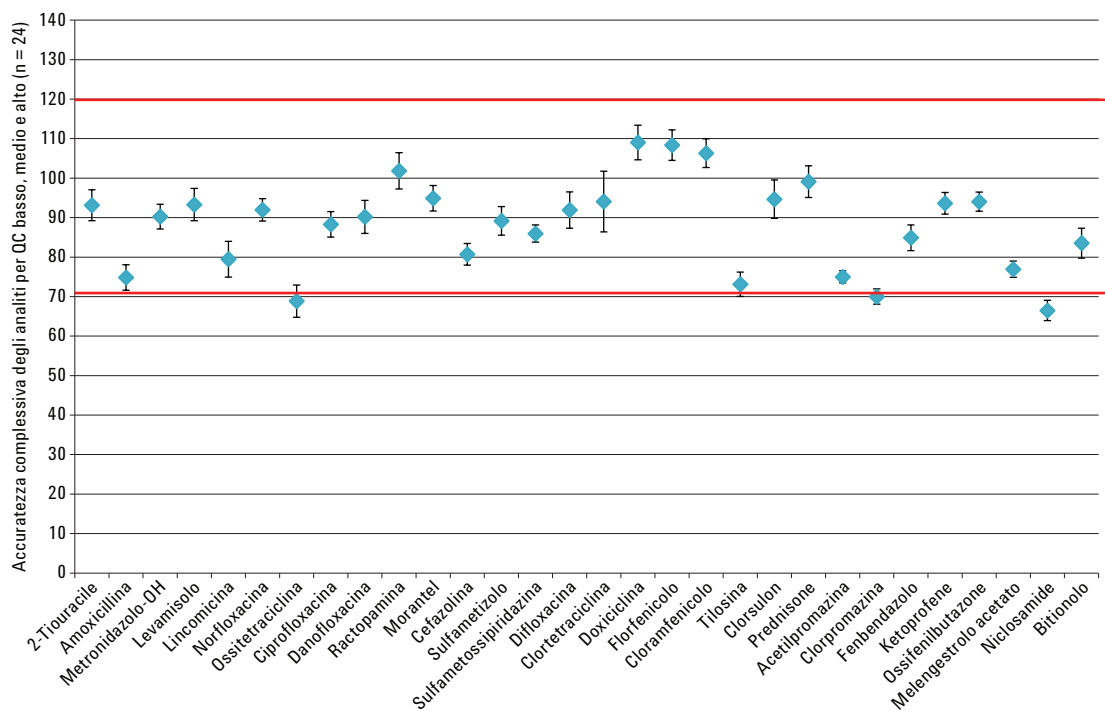


Figura 11. Quantificazione di 30 farmaci veterinari rappresentativi, analizzati in fegato di bovino utilizzando il protocollo ottimizzato Agilent Bond Elut EMR-Lipid. I dati sulla precisione e l'accuratezza sono stati calcolati utilizzando 24 repliche totali a quattro diversi livelli di arricchimento (n = 6 per ogni livello). Barra errore = 95% CI. I risultati relativi ai tre composti di tetraciclina sono stati generati con un protocollo alternativo, mostrato in Figura 6. Per gli altri composti si è adottato il protocollo mostrato in Figura 1.

Conclusioni

Un metodo rapido, affidabile e solido basato sull'estrazione e precipitazione di proteine seguita da purificazione con Agilent Bond Elut EMR—Lipid e EMR—Lipid è stato ottimizzato e validato per l'analisi di multiresiduale di farmaci veterinari in fegato bovino. L'effetto matrice è stato valutato con attenzione e confrontato con la purificazione tradizionale con dSPE C18 e adsorbenti in zirconia. I risultati dimostrano che il metodo EMR-Lipid ottimizzato garantisce una migliore purificazione della matrice, oltre a valori eccellenti di recupero e precisione per questo tipo di applicazione.

È importante segnalare che si è ricorsi a diluizione diretta con acqua prima dell'iniezione per predisporre i campioni all'analisi LC/MS/MS e mantenere l'integrità del picco degli analiti di eluizione iniziali. Il sistema LC/MS/MS utilizzato in questo studio offre un'adeguata sensibilità per l'impiego di diluizione diretta del campione, rispettando i requisiti relativi ai limiti di rivelazione. Paragonata al comune metodo di evaporazione e ricostituzione,

questa procedura ha consentito di risparmiare tempo e lavoro in modo significativo, prevenendo inoltre potenziali variazioni e perdita di analiti. Se la sensibilità dello strumento non è in grado di soddisfare le esigenze con la diluizione diretta del campione, si deve prendere in considerazione una fase di concentrazione del campione al termine del processo. Ciò si ottiene solitamente tramite evaporazione e ricostituzione del campione. Questa applicazione dimostra che una rimozione selettiva della matrice per mezzo di EMR-Lipid garantisce vantaggi notevoli nel caso di campioni complessi come fegato bovino, in termini di campioni più puliti e livelli superiori di recupero e precisione per l'analisi multiresiduale di farmaci veterinari.

Ulteriori studi analizzeranno altre matrici complesse ad alto contenuto di lipidi e altri analiti target, per dimostrare i vantaggi di avere campioni puliti quando si esegue una maggiore rimozione della matrice.

Bibliografia

1. Anon. *A Description of the U.S. Food Safety System, Marzo 2000*; U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Agriculture, Washington DC. www.fsis.usda.gov/oa/codex/system.htm.
2. Anon. European Commission, Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; *Off. J. Eur. Comm.* **2002**, L122, 8.
3. Anon. *Administrative Maximum Residue Limits (AMRLs) and Maximum Residue Limits (MRLs) set by Canada, Maggio 2012*; Health Canada, Ottawa. www.hc-sc.gc.ca/dhp-mps/alt_formats/pdf/vet/mrl-lmr_versus_new-nouveau-eng.pdf.
4. Ellis, R. L. *Food Addit. Contam. A* **2008**, 25, 1432-1438.
5. Fagerquist, C. K.; Lightfield, A. R.; Lehotay, S. J. *Anal. Chem.* **2005**, 5, 1473-1482.
6. Mastovska, K.; Lightfield, A. R. J. *Chromatogr. A* **2008**, 1202, 118-123.
7. Geis-Asteggiane, L.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R.; Dulko, T.; Ng, C.; Bluhm, L. J. *Chromatogr. A* **2012**, 1258, 43-54.
8. Schneider, M. J.; Lehotay, S. J.; Lightfield, A. R. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, 407, 4423.
9. Anon. *Guidance Document on Analytical Quality Control and Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013*; European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Brussels, Belgium.

Ulteriori informazioni

Questi dati rappresentano i risultati tipici. Per ulteriori informazioni sui nostri prodotti e servizi, visitare il nostro sito web all'indirizzo www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent non può essere ritenuta responsabile per errori contenuti nella presente pubblicazione o per danni accidentali o consequenziali derivanti dalla fornitura, dalle prestazioni o dall'utilizzo del presente materiale.

Le informazioni, descrizioni e specifiche fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Stampato negli Stati Uniti
30 luglio 2015
5991-6096ITE



Agilent Technologies