

VALIDACIÓN Y ESTABILIDAD DE TIROSTÁTICOS SIN DERIVATIZAR EN ORINA DE BOVINOS POR CROMATOGRFÍA LÍQUIDA CON DETECTOR DE TRIPLE CUADRUPOLO

VALIDATION AND STABILITY OF UNDERIVATIZED THYROSTATICS IN BOVINE URINE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH A TRIPLE QUADRUPOLE DETECTOR

Ángel Totoricagüena. Senasa (Argentina)

Ingeniero Químico – Analista Profesional de Laboratorio – DGLyCT - Dirección de Laboratorio Animal - Coordinación de Activos y Residuos Químicos – Departamento de Investigación y Desarrollo
atotoric@senasa.gob.ar /

Silvia Paula Lombardi. Senasa (Argentina)

Licenciada Química – Analista Profesional de Laboratorio – DGLyCT - Dirección de Laboratorio Animal - Coordinación de Activos y Residuos Químicos – A cargo del Departamento de Contaminantes
splombardi@senasa.gob.ar /

Sonia Olga Oliva. Senasa (Argentina)

Bioquímica – Analista Profesional de Laboratorio – DGLyCT - Dirección de Laboratorio Animal - Coordinación de Activos y Residuos Químicos – A cargo del Departamento de Investigación y Desarrollo
soliva@senasa.gob.ar /

Carlos Eugenio Alli. Senasa (Argentina)

Licenciado Químico – Analista Profesional de Laboratorio – DGLyCT - Dirección de Laboratorio Animal - A cargo de la Coordinación de Activos y Residuos Químicos
calli@senasa.gob.ar /

Resumen

Los tirostáticos son sustancias farmacológicamente activas prohibidas en bovinos y otras especies destinadas a consumo por la Unión Europea según la Directiva del Consejo 96/22/CE. El siguiente trabajo presenta la validación de un método de detección y confirmación para el análisis rutinario de tirostáticos en orina sin derivatizar, por cromatografía líquida de alto rendimiento asociado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-MS/MS), mediante una desnaturalización de la muestra y una extracción líquido-líquido con acetato de etilo. Es un método analítico rápido y simple en el rango de 5 – 20 µg L-1 para cuantificar tiouracilo, fenil-tiouracilo, metil-tiouracilo, propil-tiouracilo y tapazol, además de cumplir los criterios analíticos con coeficientes de regresión (R²)>0.995 para todos los analitos estudiados, límite de decisión (CC_α) en el rango de 0.4 a 1.8 µg L-1 y capacidad de detección (CC_β) entre 1.0 y 2.8 µg L-1. Este método se validó de acuerdo con la legislación del SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad

Abstract

Tyrostatics are pharmacologically active substances banned in cattle and other species intended for consumption by the European Union according to Council Directive 96/22/EC. The following work presents the validation of a detection and confirmation method for the routine analysis of tyrostatics in urine without derivatization, by high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS), by denaturing the sample and liquid-liquid extraction with ethyl acetate. It is a rapid and simple analytical method in the range of 5 - 20 µg L-1 to quantify thiouracil, phenyl thiouracil, methyl thiouracil, propyl thiouracil and tapazol. The method meets the analytical criteria with regression coefficients (R²)>0.995 for all analytes studied, decision limit (CC_α) in the range of 0.4 to 1.8 µg L-1 and detection capability (CC_β) between 1.0 and 2.8 µg L-1. This method was validated according to SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) legislation, which is in accordance

Agroalimentaria), que se encuentra en concordancia con los criterios de validación de la UE (Unión Europea) según la Decisión de la Comisión 2002/657/EC.

Palabras clave: Tirostáticos; Orina; Validación; Estabilidad; UHPLC-MS/MS.

with EU (European Union) validation criteria according to Commission Decision 2002/657/EC.

Keywords: Thyrostatics; Urine; Validation; Stability; UHPLC-MS/MS.

1. Introducción

Los tirostáticos son un grupo de sustancias complejas farmacológicamente activas que interfieren con la función de la glándula tiroidea, disminuyen la producción de las hormonas tiroideas triiodotironina (T^3) y tiroxina (T^4). Algunos de estos compuestos son utilizados en la medicina, tanto humana como animal, y se registra uso ilegal con fines de engorde en la cría de animales. El uso de los tirostáticos produce un aumento de peso debido al aumento del llenado del tracto gastrointestinal y la retención de agua en los tejidos comestibles al inhibir la producción de las hormonas tiroideas. En consecuencia, se obtiene carne de menor calidad y esto constituye un engaño al consumidor considerando la relación proteína animal/peso de carne. Existe evidencia que los residuos de los tirostáticos pueden ser teratogénicos y cancerígenos según la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) (Vanden Bussche et al., 2010; Vanden Bussche, 2011). Por esta razón, los tirostáticos están prohibidos en Europa desde 1981 por normativa establecida por el Consejo Europeo Directiva 81/602/EC, y años más tarde por su reemplazo, la Directiva del Consejo 96/22/EC en 1996. Argentina adopta medidas a través de la sanción de la Resolución 370/97 de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA, 1997), que establece los requisitos para la exportación de carnes con destino a la Unión Europea y la refuerza posteriormente con la Resolución 148/06 (SAGPyA, 2006), que prohíbe el uso de productos veterinarios de sustancias con acción tirostática.

En el Documento de Orientación (CRL, 2020) para los Laboratorios de Referencia de la Comunidad Europea se reconoce que concentraciones menores a $30 \mu\text{g L}^{-1}$ pueden ocurrir naturalmente como resultado del consumo animal de plantas brasicáceas (*Brassicaceae*) o crucíferas (*Cruciferae*) (Vanden Bussche et al., 2011). Estas plantas son conocidas por contener glucosinolatos que pueden metabolizarse a tiouracilo por la acción enzimática de la enzima mironasa durante la masticación, ingesta y digestión. Debido a estos nuevos

conocimientos y a la mejora en las técnicas analíticas disponibles, fue requerido revisar el enfoque de la UE para el tiouracilo (Kiebooms et al., 2012). Diferentes miembros de la UE realizaron distintos estudios basados en las estadísticas obtenidas de sus Planes de Monitoreo Nacional, y observaron que la concentración presente recomendada es inadecuada para diferenciar tiouracilo endógeno del administrado, ya que existen factores influyentes como, por ejemplo, los protocolos de ensayo aplicados en los laboratorios, el género y la edad del animal, que varían el porcentaje de positivos en sus planes de monitoreo. Razón por la cual, se sugirió establecer un rango mayor para la concentración recomendada de 10 a $30 \mu\text{g L}^{-1}$ (Wauters et al., 2015).

Las sustancias tirostáticas debido a su estructura química presentan un carácter polar, anfótero y con capacidad para adoptar diferentes formas tautoméricas que afectan negativamente el rendimiento de su extracción en muestras biológicas, como así también su separación cromatográfica. Además, en el caso de la detección por espectrometría de masas, estas moléculas presentan pesos moleculares bajos que limitan su sensibilidad. La mayoría de los métodos analíticos disponibles evitan estos problemas realizando una derivatización previa a la extracción, que aumenta el peso molecular de los compuestos a través de una transformación química controlada, disminuye su polaridad y estabiliza la molécula en una sola forma tautomérica (Vanden Bussche et al., 2010). Para los ensayos han existido diferentes metodologías y diferentes compuestos de derivatización (Vanden Bussche et al., 2009), en el caso de análisis por LC-MSMS se utilizaba solamente el derivatizante 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) (De Wach et al., 2001) y más recientemente el 3-iodobenzylbromide (3-IBBr) desarrollado por Pinel et al. (2005), siendo el más aceptado con excelente límite de decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$). Sin embargo, un procedimiento sin derivatización simplifica el proceso de extracción y reduce los costos del laboratorio en el ensayo rutinario, siempre cumplimentando las exigencias del Documento de Orientación CRL.

Por otro lado, debido a la inestabilidad de los tirostáticos en orina (Vanden Bussche *et al.*, 2012), se ha demostrado la necesidad de un pretratamiento de la muestra con el fin de estabilizar a los tirostáticos, llevando a la orina a pH=1 y agregando un agente quelante como ácido etilendiamino tetracético (EDTA).

El presente trabajo presenta la validación de un método para la detección y confirmación para el análisis rutinario de tirostáticos en orina sin derivatizar, por cromatografía líquida de alto rendimiento asociado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (LC-MS/MS). Este procedimiento analítico fue validado de acuerdo con la legislación vigente del SENASA, la Resolución 138/2002, la Disposición 06/2004 y la Resolución 125/2006, y en concordancia con los criterios establecidos en la Decisión de la Comisión 2002/657/EC (Comisión Europea, 2002), cumpliendo con los valores mínimos de performance requeridos (MRPL) antes mencionados de 10 µg L⁻¹ para todos los tirostáticos investigados: tiouracilo, fenil-tiouracilo, metil-tiouracilo, propil-tiouracilo y tapazol.

2. Materiales y métodos

2.1. Reactivos y Productos Químicos

Se utilizaron estándares de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA), excepto el 6-metil-2-tiouracilo marca comercial Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Las soluciones de 2-tiouracilo (TU), 6-fenil-2-tiouracilo (FTU), 6-metil-2-tiouracilo (MTU), 6-propil-2-tiouracilo (PTU) y tapazol (TAP) se prepararon a una concentración de 1000 µg ml⁻¹. Luego se realizaron dos diluciones, una mezcla con los cinco analitos a una concentración de 4.0 µg ml⁻¹ cada uno y la solución de fortificación a 400 ng ml⁻¹. El estándar interno (SI) 5,6-dimetil-2-tiouracilo (DTU) se preparó a una concentración de 1000 µg ml⁻¹, una dilución a una concentración de 8.0 µg ml⁻¹ y la solución de fortificación a 800 ng ml⁻¹. Todas las soluciones fueron preparadas en metanol grado MS/MS y almacenadas en freezer a <-18 °C.

Se utilizaron solventes de grado cromatográfico y MS/MS para purificación y cromatografía líquida respectivamente, de marca Merck (Darmstadt, Germany). El buffer fosfato (pH=7) fue preparado con fosfato de sodio monobásico anhidro y fosfato de sodio dibásico anhidro y ajustado a pH= 7 y el 1,4-Ditioerythritol (DTE) utilizado con pureza ≥ 99 % fueron de Merck (Darmstadt, Germany).

2.2. Instrumentación

Los tirostáticos son separados cromatográficamente con una columna UPLC C18 Eclipse Plus RRHD (1.8 µm x 2.1 mm x 100 mm) marca Agilent a 35 °C. La fase móvil componentes A: metanol y B: agua (25:75), ambos al 0.1% de ácido fórmico, flujo de 0.2 ml min⁻¹, en un cromatógrafo líquido Agilent 1290 con bomba binaria. Durante dos minutos se mantiene la composición inicial (25:75) y luego se realiza un gradiente en dos minutos hasta (60:40) y se mantiene un minuto, luego se alcanza la composición (90:10) a los seis minutos y se mantiene medio minuto para luego volver a las condiciones iniciales, obteniéndose un tiempo total de corrida de siete minutos. La detección se realiza con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6490 con ionización por electrospray en modo positivo (+ES) con un voltaje de capilar de 3500 V, la temperatura de gas y flujo son de 200 °C y 11 L min⁻¹, la temperatura y flujo de desolvatación de 350 °C y 8 L min⁻¹, la presión del nebulizador de 20 psi, el fragmentador a 380 V y la aceleración de la celda es de 4 V. El gas de colisión utilizado es nitrógeno. Previamente se realiza una optimización de cada tirostático con el fin de encontrar las mejores condiciones operativas y las transiciones a monitorear, que se pueden visualizar en la Tabla 1.

Analito	Ión Precursor (m/z)	Ión Producto (m/z)	CE (V)
TAP	115.0	56*	24
		88	16
TU	129.0	111.9*	16
		60	36
MTU	143.0	83.9*	12
		125.8	16
PTU	171.1	112*	16
		59.9	36
FTU	205.1	103*	12
		188.1	24
DTU	157.1	97.9	16

Tabla 1: Iones monitoreados de los analitos estudiados
* Ión Cuantificable

2.3. Extracción y Purificación

Las muestras de orina de origen bovino utilizadas para el desarrollo y validación fueron obtenidas por los inspectores veterinarios del SENASA a partir de muestras oficiales destinadas para otros controles según el Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos. Las muestras fueron recibidas y fraccionadas en tubos de polipropileno de 50 ml para almacenarse a <-18 °C en freezer con previa centrifugación durante 15 minutos a 3000rpm.

Se toman 2 ml de orina y se colocan en tubos de polipropileno de 15 ml, se agregan 50 μ l de la solución de fortificación de estándar interno y se agregan 2 ml de solución desnaturalizante 1% de DTE en solución buffer de fosfato de pH= 7, se agita vigorosamente durante 15 minutos en Vortex y se colocan en estufa a 65 °C durante 45 minutos. Se deja enfriar y se agregan 7 ml de acetato de etilo, se agitan vigorosamente 2 minutos y se centrifugan a 3000 rpm durante 15 minutos a 5 °C. Se repite la extracción con 5 ml de acetato de etilo y se juntan las alícuotas en un tubo de vidrio de 15 ml. Se colocan los tubos en baño termostático a 45 °C bajo flujo de aire hasta sequedad. Luego resuspender en 300 μ l de fase móvil de agua: metanol con 0.1 % de ácido fórmico (75:25), agitar 1 minuto con vortex. Inyectar 20 μ l en el LC-MS/MS.

3. Discusión

En nuestro laboratorio, debido a una limitada disponibilidad de reactivos y con el objetivo de implementar un método sencillo y rápido, se decidió investigar la presencia de tirostáticos en orina sin derivatizar, empleando un agente reductor (desnaturalizante) que impide la formación de los puentes disulfuros y facilitar su extracción de la orina.

Para ello, se realizaron distintos ensayos en la etapa del clean up para 2 ml de orina hasta optimizar las condiciones de trabajo logrando que se cumpla con los criterios de aceptación requeridos. Para las distintas pruebas se utilizó en la cuantificación una curva en solvente, obteniéndose recuperaciones entre 40 – 60% para todos los analitos demostrando un fuerte efecto matriz.

En primer lugar, se probaron dos agentes reductores, el DTE y el 1,4-Dithiothreitol (DTT), siendo el DTE un epímero del DTT en la forma cis. Se realizó un ensayo con 1 ml y 2 ml de la solución buffer con DTE y DTT ambos al 1 %, agitando vigorosamente durante 1 minuto para luego colocarlo en la estufa durante 30 minutos a 65 °C. Luego se extrajo con acetato de etilo. Se cuantificaron utilizando una curva de

calibración preparada en solvente y se observó que con 2 ml de la solución desnaturalizante de DTE al 1% se obtuvieron mejores resultados para la mayoría de los analitos estudiados incluyéndose el TU.

Luego se realizaron ensayos con 2 ml de buffer fosfato de pH= 7 con DTE al 1 %, con variación del tiempo de agitación posterior al agregado del DTE y la temperatura de desnaturalización durante 45 minutos. Continuando con la cuantificación en curva de calibración en solvente, se obtuvieron los mejores resultados a mayor tiempo de agitación y mayor temperatura, siendo estos de 15 minutos y 65°C.

Posteriormente, se modificó la cantidad de desnaturalizante utilizado, agregando 2 ml de la solución de DTE a 1 %, 2 %, 4 % y 6 % en solución buffer fosfato a pH= 7. Al cuantificarse en curva de calibración en solvente, se observó que al aumentar la concentración de DTE los resultados no eran reproducibles y la resolución de los picos cromatográficos obtenidos disminuía. Por lo tanto, se decidió continuar trabajando con la solución de DTE al 1 %.

Una vez optimizada esta etapa de extracción, se procedió a realizar un nuevo ensayo con 2 ml de la solución buffer con DTE al 1 %, agitación vigorosa por 15 minutos y desnaturalización a 65 °C durante 45 minutos, con cuantificación de una curva de calibración en matriz y una curva de calibración en matriz fortificada, resultando las recuperaciones aceptables para todos los analitos, concluyendo que se obtuvo mejores coeficientes de correlación con curva en matriz fortificada para todos los analitos.

4. Validación

Como se mencionó anteriormente, la validación se realizó según la legislación propia del SENASA. Se presentarán los siguientes parámetros:

- Linealidad
- Selectividad
- Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio
- Incertidumbre, Limite de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$)
- Robustez
- Veracidad

4.1 Linealidad

Para este ensayo se realizaron tres curvas de calibración a cinco niveles de concentración, en el rango de 5 – 20 ng ml⁻¹ en orina bovina, y el agregado de 50 μ l de la solución de fortificación de SI. Las mismas son sometidas a todo el proceso de extracción mencionado

en el Punto 2.3. En la Figura 1 se observa el total ion chromatograma (TIC) para el valor de 10 ng ml⁻¹.

Las curvas de calibración se obtienen de graficar la relación de áreas (ion cuantificable/ion SI) versus la

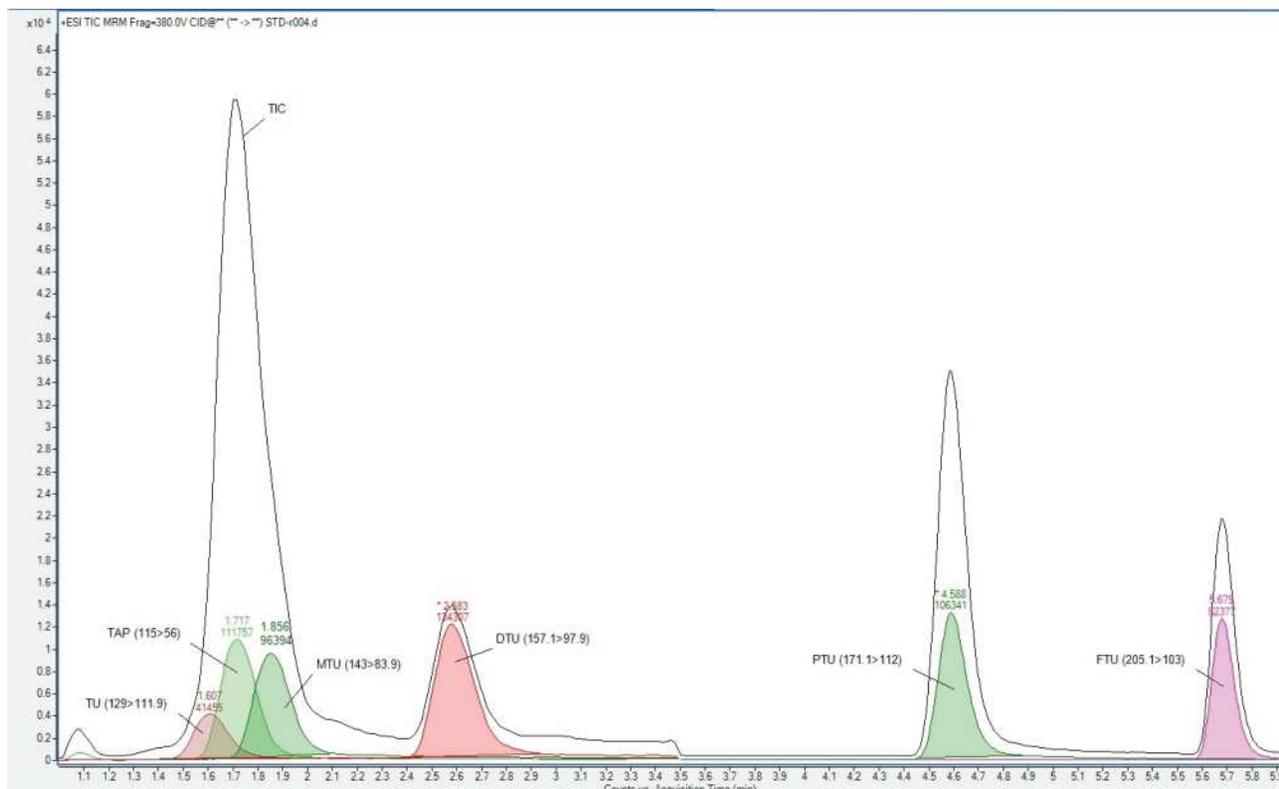


Figura 1: Cromatograma del total ion (TIC) de 10 ng ml⁻¹ de concentración superpuesta con el ion cuantificable de cada analito.

concentración de cada analito, los coeficientes de regresión (R^2) son todos >0.995. Para el caso de TU es 0.996, TAP es 0.997, MTU es 0.998, PTU es 0.997 y FTU es 0.998.

4.2 Selectividad

Se realizaron 20 muestras de diferentes animales con el correspondiente agregado de SI y se procesaron conjuntamente con la curva de calibración. En la Figura 2 se observa como ejemplo el MRM del TU de uno de los

20 blancos analizados y el punto de la curva de calibración en matriz fortificada a 5 ng ml⁻¹, dado que fue uno de los analitos que mayor interferencia presentó. Las señales observadas en cada tiempo de retención correspondiente a cada analito no resultaron significativas y en aquellas que sí se observaron, esos picos fueron descartados por el criterio de tiempo de retención (tiempo analito/tiempo SI, $\pm 2.5\%$), y además presentaban señales menores al 1% del primer punto de la curva de calibración.

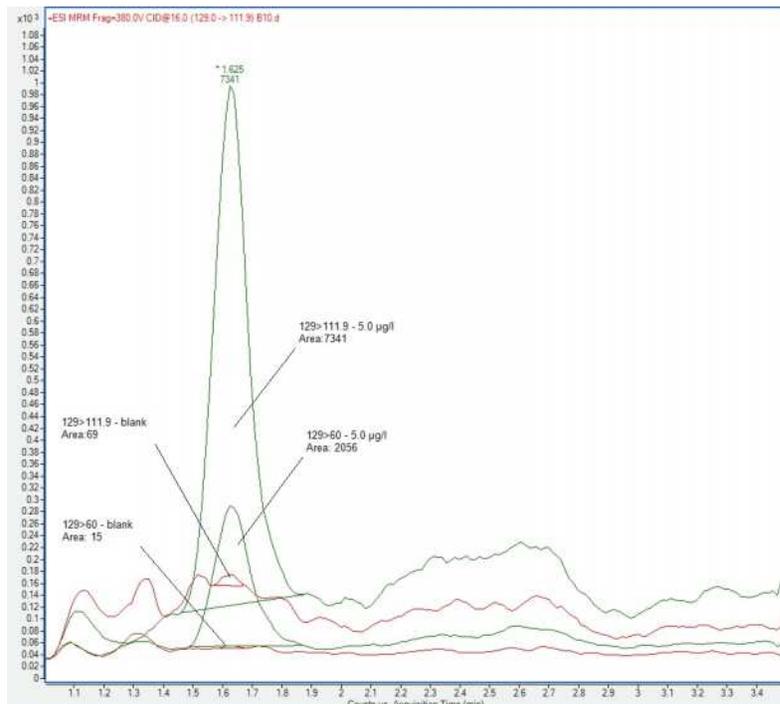


Figura 2: MRM superpuesto para el TU de uno de los blancos estudiados y del punto de la curva en matriz correspondiente a 5 ng ml⁻¹.

4.3 Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

Se procesaron 15 muestras de orina y se fortificaron con la solución mezcla de tirostáticos correspondiente en cinco niveles por triplicado y la curva de calibración correspondiente, por dos analistas en semanas distintas, totalizando una validación de 30 muestras

fortificadas. En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los analistas, donde las muestras enriquecidas deben presentar recuperaciones porcentuales (%R) entre 80 - 120% por ser las mismas cuantificadas con SI, además de cumplir los criterios de identificación correspondientes a la metodología.

Analito	Concentración Nominal (ng ml ⁻¹)	Recuperación		Repetibilidad				Reproducibilidad por nivel RSD (%)	Reproducibilidad intralaboratorio RSD (%)
		Analista 1	Analista 2	Analista 1		Analista 2			
		Promedio (%)		Prom (ng ml ⁻¹)	RSD (%)	Prom (ng ml ⁻¹)	RSD (%)		
TAP	5	110,0	95,2	5,8	7,1	5,0	0,9	9,3	8,3
	7,5	92,7	100,5	7,4	4,1	8,0	6,5	6,6	
	10	104,0	100,9	10,9	6,8	10,6	6,9	6,3	
	15	90,5	108,1	14,3	1,7	17,0	4,6	10,2	
	20	92,2	108,4	19,4	4,4	22,8	4,8	9,8	
TU	5	103,5	96,1	5,4	8,8	5,0	2,1	7,2	9,5
	7,5	86,6	98,0	6,9	3,4	7,8	6,2	8,2	
	10	101,1	89,6	10,6	12,1	9,4	9,0	11,8	
	15	93,9	86,5	14,8	14,8	13,6	5,5	11,2	
	20	96,3	89,8	20,2	4,9	18,9	11,5	8,6	
MTU	5	83,0	95,7	4,3	0,4	4,9	2,9	8,0	6,3
	7,5	90,0	94,1	7,0	9,0	7,3	4,1	6,6	
	10	86,9	93,6	8,9	3,8	9,6	5,7	5,9	
	15	84,2	91,6	12,9	7,1	14,1	3,4	6,7	
	20	96,2	91,5	19,7	3,5	18,8	2,7	3,9	
PTU	5	115,1	91,7	6,0	6,0	4,8	1,2	13,1	10,1
	7,5	103,6	92,9	8,3	3,8	7,4	1,7	6,6	
	10	110,0	91,3	11,5	10,3	9,6	2,4	12,5	
	15	102,1	93,8	16,1	14,2	14,8	5,1	10,9	
	20	100,3	91,8	21,1	6,1	19,3	3,7	6,7	
FTU	5	106,5	100,9	5,5	4,3	5,2	2,6	4,4	8,5
	7,5	95,6	101,7	7,4	6,8	7,9	4,1	6,0	
	10	106,0	96,6	10,9	15,1	9,9	3,1	11,4	
	15	89,1	97,5	13,7	10,7	15,0	1,3	8,2	
	20	92,3	94,8	18,9	10,4	19,4	5,2	7,5	

Tabla 2: Valores obtenidos de las tandas de repetibilidad y reproducibilidad de los dos analistas involucrados en la validación.

De los valores de la tabla se observa cumplimiento de todos los criterios de aceptación según la normativa vigente, obteniéndose reproducibilidades intralaboratorio (RSD%) por debajo del 10 % para la mayoría de los analitos.

4.4 Incertidumbre, Límite decisión ($CC\alpha$) y capacidad de detección ($CC\beta$)

La incertidumbre para cada analito se calculó en base al procedimiento llamado “top down”, donde se permite utilizar datos de la validación. En nuestro caso se dispone de 30 valores de recuperación. La expresión es la siguiente ($u = k \cdot RSD\%$), (Comisión del Codex Alimentarius, 2006), donde el RSD% corresponde al valor de reproducibilidad intralaboratorio de la Tabla 2, y el valor de k es igual a 2. Para determinar el $CC\alpha$ y $CC\beta$ se procedió a utilizar una de las formas descriptas en CE 657/02 (Comisión Europea, 2002). Para el caso de $CC\alpha$ (Eq.1) se usó el gráfico de la respuesta obtenida en la concentración hallada versus la concentración nominal, donde se obtiene el valor de ordenada al origen (y_0) y el desvío estándar de la men-

cionada ordenada (DSy_0). Para el valor de $CC\beta$ (Eq. 2) se necesita el desvío estándar en el $CC\alpha$ ($DSCC\alpha$), en nuestro caso se utilizó el desvío en el primer punto de la validación (5 ng ml⁻¹). En la Tabla 3 se muestran los valores obtenidos para estos parámetros calculados.

$$CC\alpha = y_0 + 2.33DSy_0 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$CC\beta = CC\alpha + 1.64DS_{CC\alpha} \quad (\text{Eq. 2})$$

Analito	Incertidumbre (U)	$CC\alpha$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	$CC\beta$ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
TAP	16.6	1.2	2.0
TU	19.0	1.5	2.1
MTU	12.6	0.4	1.0
PTU	20.2	1.6	2.8
FTU	17.0	1.8	2.2

Tabla 3: Valores obtenidos para el cálculo de la incertidumbre, $CC\alpha$ y $CC\beta$

4.5 Robustez

Se realiza este estudio utilizando el Test de Youden y Steiner (Youden *et al.*, 1975), que consiste en la introducción deliberada de pequeñas variaciones razonables y la observación de sus consecuencias. Para

lo cual se procedió a fraccionar 8 muestras para este estudio con su correspondiente curva de calibración. A cada una de las muestras se agregó el volumen de la solución mezcla de fortificación correspondiente al valor recomendado de 10 ng ml⁻¹. En la Tabla 4 se presentan los resultados.

Variable		Analito				
		TAP	TU	MTU	PTU	FTU
% y volumen DTE	A 2 ml 1 %	R	R	R	R	R
	a 1 ml 2 %					
Tiempo en la estufa	B 45 min	R	R	R	R	R
	b 30 min					
Número de extracciones	C 1 x 7 ml, 1 x 5 ml	CP	R	R	R	R
	c 1 x 7 ml					
Temperatura de evaporación	D 45 °C	R	R	CP	R	R
	d 55 °C					

Tabla 4: Parámetros estudiados en el ensayo de Robustez según el Test de Youden y Steiner. R: Robusto, CP: Punto Crítico

De los datos obtenidos resultaron la temperatura de evaporación y el número de extracciones realizadas como puntos críticos en el método analítico descripto. Según el estudio de Youden y Steiner, los puntos críticos pueden estudiarse individualmente para su mejor interpretación.

4.6 Veracidad

Cuando se realizó la validación en el laboratorio no se disponía de un material de referencia certificado, por lo cual se optó por preparar seis muestras fortificadas ciegas para ensayar por uno de los analistas. Las mismas se procesaron conjuntamente con la curva de calibración respectiva. Una vez cuantificadas dichas muestras, se compararon con respecto a su valor nominal. Este valor obtenido debe cumplir con los criterios de aceptación establecidos, siendo que para concentraciones menores a 10 ng ml⁻¹ la diferencia porcentual no debe exceder el 25% y para valores entre 10 - 100 ng ml⁻¹ no debe superar el 20%.

Todos los analitos cumplieron los criterios de aceptación en todas las muestras. La mayoría presentó valores de diferencia porcentual de ± 6%, excepto el TAP que presentó valores de ± 15%.

5. Estabilidad

Durante el análisis de rutina de residuos de tirostáticos en orina ocasionalmente resultan muestras no

conforme para estas sustancias prohibidas. Cuando se reanalizaron esas muestras no conformes, se reportó una concentración más baja a la informada en el ensayo inicial. Esta disminución puede atribuirse a una pérdida de la estabilidad de los tirostáticos en la matriz estudiada. Para verificar la estabilidad de los mismos, se realizó un estudio con distintas pruebas para caracterizar el comportamiento de los analitos cuando se los conserva a una temperatura menor a -18 °C por un tiempo determinado (Vanden Bussche *et al.*, 2012).

Se fortificó orina con la solución de trabajo que contenía los cinco analitos estudiados a tres niveles de concentración distintas de 5, 10 y 20 ng ml⁻¹ y se guardaron en el freezer a -18 °C durante un período de 15 días y 30 días. Se procesaron las muestras con su curva de calibración correspondiente y a partir de la concentración hallada se calculó el porcentaje de recuperación para cada caso como se muestra en la Tabla 5. El caso A representa las condiciones originales, se agregó el SI en el momento de realizar el análisis de las mismas; en el caso B a 2 ml de orina se agregó HCl concentrado hasta llevar la muestra a pH= 1 y 40 µl de EDTA 0,1 M y se agregó el SI en el momento de realizar el análisis de las mismas; en el caso C a 2 ml de orina se agregó HCl concentrado hasta llegar a pH= 1 y 40 µl de EDTA 0,1 M, agregando el SI en el momento de fortificar; en el caso D a 10 ml de orina se le agregó HCl concentrado hasta llevar la muestra a pH= 1 y 200 µl de EDTA 0,1 M, tomando 2 ml y agregando el SI en el momento de analizar las muestras.

ANALITO	Conc. Nominal (ng/ml)	R% A		R% B		R% C		R% D	
		15 días	30 días						
TAP	5	88	81	95	90	115	111	67	93
	10	84	86	114	82	101	119	94	75
	20	84	66	100	88	113	118	116	82
TU	5	35	29	72	59	66	81	82	68
	10	30	19	74	48	63	75	88	77
	20	26	17	64	44	81	68	76	75
MTU	5	72	60	108	114	116	118	113	115
	10	69	57	114	91	100	117	96	83
	20	72	45	97	90	118	118	104	91
PTU	5	63	55	93	91	108	112	95	87
	10	65	51	118	89	106	117	92	85
	20	80	41	91	95	118	115	99	86
FTU	5	32	34	81	63	102	75	89	74
	10	32	26	98	52	78	92	84	62
	20	39	19	85	50	118	88	89	70

Tabla 5: Recuperaciones porcentuales obtenidas del estudio de estabilidad en matriz fortificada.

De los valores resultantes, se observa que se obtienen las mejores recuperaciones para todos los analitos en los casos C y D, donde se les agrega a la muestra HCl y EDTA 0,1 M. Siendo el caso D el más adecuado debido a que el volumen de orina estabilizado permite repetir el análisis en caso de ser necesario.

6. Conclusiones

El método desarrollado y validado que se presenta en este trabajo para la determinación de tirostáticos en orina sin derivatización por cromatografía líquida ultra rápida con espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, es adecuado para la identificación y la cuantificación de dicho grupo de sustancias en el rango de 5 - 20 ng ml⁻¹.

Los valores obtenidos para la incertidumbre, CC α y CC β son semejantes a los presentados en otros trabajos para métodos sin derivatizar, considerando que este método analítico utiliza un desnaturalizante diferente al que refiere la bibliografía estudiada. El método obtenido reduce tiempos de análisis por lo que representa menores costos, es relativamente sencillo, accesible y robusto. El método cromatográfico utilizado establece un tiempo de corrida de 7 minutos obteniendo buena separación y resolución de los picos de interés.

Finalmente, resaltamos la importancia y la necesidad de estudiar la estabilidad de los analitos en su matriz, en especial para el TU que presenta mayor inestabilidad con el transcurso del tiempo. Esto permitió establecer el procedimiento de estabilización de los tirostáticos en la orina apenas se realiza el muestreo, con HCl y EDTA.

Bibliografía

Comisión del Codex Alimentarius (2006). “Directrices sobre la estimación de la incertidumbre de los resultados”. *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura / Organización Mundial de la Salud*. (CAC/GL 59). Disponible en: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/guidelines/es/>

Comisión Europea (2002). “Decisión 2002/657/CE, 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”. Disponible en: <http://data.europa.eu/eli/dec/2002/657/oj>

Consejo de la Unión Europea (1981). “Directiva 81/602/CEE referente a la prohibición de determinadas sustancias de efecto hormonal y de sustancias de efecto tirostático”. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1981/602/oj>

Consejo de la Unión Europea (1996). “Directiva 96/22/CE por la que se prohíbe utilizar determinadas sustancias de efecto hormonal y tirostático y sustancias β -agonistas en la cría de ganado y por la que se derogan las Directivas 81/602/CEE, 88/146/CEE y 88/299/CEE”. Disponible en: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1996/22/oj>

De Wasch, K.; De Brabander, H. F.; Impens, S.; Vandewiele, M.; Courtheyn, D. (2001). “Determination of mercaptobenzimidazol and other thyreostat residues in thyroid tissue and meat using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry”. *Journal of Chromatography A* (912, pp. 311-317). Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00563-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00563-5)

Guidance Document (2020). “EURL guidance on minimum method performance requirements (MM-PRs) for specific pharmacologically active substances in specific animal matrices”. Disponible en: https://sitesv2.anses.fr/en/system/files/EURL_MMPR_guidance%20paper_final.pdf

Kiebooms, J. A.; Vanden Bussche, J.; Hemeryck, L. Y.; Fievez, V.; Vanhaecke, L. (2012). “Intestinal microbiota contribute to the endogenous formation of thiouracil in livestock”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (60, pp. 7769–7776). Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf3017145>

Löhmus, M.; Kallaste, K.; Le Bizec, B. (2009). “Determination of thyreostats in urine and thyroid gland by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry”. *Journal Chromatography A* (1216, pp. 8080-8089). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.04.005>

Pinel, G.; Bichon, E.; Pouponneau, K.; Maume, D.; Andre, F.; Le Bizec, B. (2005). “Multi-residue method for the determination of thyreostats in urine samples using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after derivatisation with 3-iodobenzylbromide”. *Journal Chromatography A* (1085, pp. 247-252). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.055>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (1997). “Resolución 370/97: Requisitos para la exportación de carnes procedentes de la faena de bovinos, ovinos, caprinos y cérvidos destinados a la Unión Europea”. Disponible en: <https://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/40000-44999/43872/norma.htm>

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (2006). “Resolución 148/06: Prohíbese el uso de productos veterinarios indicados como promotores de crecimiento, que contengan en su formulación sustancias de acción beta agonista o sustancias con acción tirostática”. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-148-2006-115400/texto>

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2002). “Resolución 138/2002: Control de productos de origen animal”. Disponible en: <http://www.senasa.gov.ar/normativas/resolucion-138-2002-senasa-servicio-nacional-de-sanidad-y-calidad-agroalimentaria>

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2004). “Disposición 06/2004: Control de productos de origen animal”. Dirección de Laboratorios y Control Técnico. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-6-2004-101460>

Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (2006). “Disposición 125/2006: Confirmaciones de residuos de sustancias prohibidas. Incorporarse ‘parámetros de validación’”. Dirección de Laboratorios y Control Técnico. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/disposici%C3%B3n-125-2006-115884/texto>

Vanden Bussche, J. (2011). “Analytical approaches to unravel the semi-endogenous status of Thiouracil”. Tesis doctoral. Ghent University, Faculty of Veterinary Medicine.

Vanden Bussche, J.; Noppe, H.; Verheyden, K.; Wille, K.; Pinel, G.; Le Bizec, B.; De Brabander, H. F. (2009). “Analysis of thyreostats: A history of 35 years”. *Analytica Chimica Acta* (637, pp. 2-12). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.08.027>.

Vanden Bussche, J.; Sterk, S. S.; De Brabander, H. F.; Blokland, M. H.; Deceuninck, Y.; Le Bizec, B.; Vanhaecke, L. (2012). “Thyreostatic drugs, stability

in bovine and porcine urine”. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (403, pp. 2973-2982). Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5739-7>

Vanden Bussche, J.; Vanhaecke, L.; Deceuninck, Y.; Verheyden, K.; Wille, K.; Bekaert, K.; Le Bizec, B.; De Brabander, H.F. (2010). “Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for quantifying thyreostats in urine without derivatisation”. *Journal of Chromatography A* (1217, pp. 4285-4293). Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.04.030>

Vanden Bussche, J.; Vanhaecke, L.; Deceuninck, Y.; Wille, K.; Bekaert, K.; Le Bizec, B.; De Brabander, H. F. (2011). “Ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry detection of naturally occurring thiouracil in urine of untreated livestock, domesticated animals and humans”. *Food Additives and Contaminants (Part A)*, 28, pp. 166-172). Disponible en: <https://doi.org/10.1080/19440049.2010.544681>

Wauters, J.; Vanden Bussche, J.; Le Bizec, B.; Kiebooms, J. A.; Dervilly-Pinel, G.; Prevost, S.; Wozniak, B.; Sterk, S. S.; Grønningen, D.; Glenn Kennedy, D.; Russell, S.; Delahaut, P.; Vanhaecke, L. (2015). “Toward a New European Threshold to Discriminate Illegally Administered from Naturally Occurring Thiouracil in Livestock”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (63, 1339-1346). Disponible en: <https://doi.org/10.1021/jf504475f>.

Woźniak, B.; Witek, S.; Zmudzki, J.; Kłopot, A. (2012). “Natural Occurrence of Thiouracil in of livestock in Poland”. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* (56, pp. 611-615). Disponible en: <https://doi.org/10.2478/v10213-012-0108-z>

Youden, W. J.; Steiner, E. H. (1975). “Statistical Manual of the AOAC—Association of Official Analytical Chemists”. AOAC-I, Washington DC. (p. 35 ff).