

# DETERMINAZIONE DI ALCUNI SULFAMIDICI E DEL TRIMETOPRIM IN MUSCOLO DI POLLO, PESCE ED UOVO MEDIANTE LC-MS/MS

A.F. Forti, M. Multari, L. Di Stefano & G. Scortichini

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale», Teramo - Italia

## RIASSUNTO

*I sulfamidici costituiscono una classe di antibatterici sintetici largamente utilizzata in terapia veterinaria per il trattamento di diverse infezioni batteriche e protozoarie nel bovino, nel suino e nel pollame; il trimetoprim è un altro antibatterico di sintesi impiegato soprattutto in acquacoltura e spesso associato ai sulfamidici nelle formulazioni commerciali. Tuttavia la loro potenziale azione carcinogenica ha indotto l'Unione Europea (UE) e la Food and Drugs Administration (FDA) americana a fissare un limite massimo consentito per i residui (LMR) di entrambi tali tipi di sostanze negli alimenti di origine animale destinati al consumo umano (100 µg/Kg per singolo sulfamidico o come somma di tutte le molecole appartenenti a tale classe e 50-100 µg/Kg per il trimetoprim, a seconda della matrice), ed ha reso importante lo sviluppo di metodi analitici di conferma volti all'identificazione univoca ed alla determinazione quantitativa di tali molecole; in tal senso la spettrometria di massa tandem accoppiata alla cromatografia liquida (LC-MS/MS) risulta la tecnica più adatta per la rivelazione di composti con caratteristiche di media polarità come i farmaci suddetti. Nel presente studio viene descritto un metodo multiresiduo per la determinazione simultanea mediante LC-MS/MS di alcuni sulfamidici [sulfadiazina (SFD), sulfatiazolo (SFT), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMT), sulfametossipiridazina (SMPZ), sulfametossazolo (SMS), sulfadimetossina (SDMT), sulfachinossalina (SFCH)] e del trimetoprim (TMP) in prodotti di origine animale (muscolo di pollo, muscolo di pesce, uova). Il metodo prevede l'estrazione di questi farmaci dalle matrici con una miscela composta da metilene cloruro/acetone e la successiva purificazione tramite estrazione in fase solida (SPE) su colonnine a scambio cationico, seguita dall'identificazione degli analiti mediante LC-MS/MS condotta in uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo equipaggiato con sorgente ionica TurboIonSpray<sup>TEM</sup> operando in modalità ioni positivi. La separazione cromatografica è effettuata su una colonna C<sub>18</sub> con l'impiego di una fase mobile composta da metanolo/acqua contenente acetato di ammonio ed acido formico, in gradiente. L'identificazione e la quantificazione in MS/MS sono state condotte in accordo con le linee-guida stabilite dall'UE, ovvero adottando l'approccio Multiple Reaction Monitoring MRM mediante il monitoraggio di tre ioni diagnostici specifici per ogni analita preso in considerazione (un «precursor ion» e due «product ions»). I limiti di rivelazione (LR), calcolati considerando un rapporto segnale/rumore 3:1, variano in un intervallo da 0,1 a 1,7 µg/Kg, mentre i recuperi oscillano tra il 69,5% e il 94,2%, a seconda dell'analita e della matrice. Per il trimetoprim, invece, gli LR e i recuperi variano, rispettivamente da 0,2 a 0,4 µg/Kg e da 51,9 a 52,8%, a seconda della matrice. La semplicità della procedura di preparazione del campione e la specificità e selettività della rivelazione mediante spettrometria di massa rendono il metodo proposto affidabile ed utile per l'analisi qualitativa e quantitativa dei farmaci in oggetto negli alimenti di origine animale considerati. Successivamente, l'applicazione del metodo è stata estesa con successo ad altri sulfamidici, come Sulfaguanidina, Sulfapiridina, Sulfamossolo e Sulfametizolo.*

## PAROLE CHIAVE

Muscolo di pollo - LC-MS/MS - Pesce - SPE - Sulfamidici - Trimetoprim - Uova

## Introduzione

I sulfamidici, N-derivati della 4-ammino-benzensulfonammide, costituiscono una vasta classe di antibatterici di sintesi comunemente utilizzati, insieme al trimetoprim, nell'allevamento aviario ed in acquacoltura; sono inoltre riportate in letteratura evidenze sperimentali riguardanti la loro azione come promotori di crescita (12).

Tali farmaci, caratterizzati da una potenziale attività cancerogena, sono stati inseriti nel gruppo B

della Direttiva 96/23/CE (5), che comprende i principi attivi per i quali l'Unione Europea ha fissato un Limite Massimo di Residui (LMR); in particolare, i valori stabiliti per i farmaci in questione sono pari a 100 µg/Kg per i sulfamidici ed a 50-100 µg/Kg per il trimetoprim, a seconda della matrice considerata.

La necessità di rivelare quantità talmente esigue di farmaci negli alimenti rende indispensabile lo sviluppo di

## DETERMINATION OF SOME SULFONAMIDES AND TRIMETHOPRIM IN CHICKEN, FISH MUSCLE AND EGGS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY

### Summary

Sulfonamides represent a wide range of synthetic compounds commonly used in veterinary therapy for the treatment of several bacterial and protozoan infections in cattle, swine and poultry. Trimethoprim is another antibacterial

metodiche analitiche dotate di adeguata sensibilità e specificità (9).

Le tecnologie analitiche più in uso per la determinazione di tali farmaci negli alimenti sono i test immunologici (es. ELISA, CHARM TEST) (4,14) ed i metodi cromatografici (es. HPLC con rivelazione UV, a fotodiodi e fluorimetria) (11). La Decisione della Commissione Europea 2002/657/CE (6) prescrive l'uso della spettrometria di massa accoppiata all'analisi cromatografica per l'identificazione inequivocabile degli xenobiotici negli alimenti e la combinazione cromatografia liquida/spettrometria di massa (LC-MS) costituisce la tecnica di elezione per la determinazione di composti polari non-volatili come i sulfamidici (1, 2, 3, 7, 8, 10, 13, 15, 16).

Alla luce delle suddette considerazioni è sorta l'esigenza di ottimizzare un metodo multiresiduo per la contemporanea determinazione di alcuni sulfamidici e del trimetoprim in prodotti di origine animale.

Le fasi analitiche del metodo proposto comprendono:

- omogeneizzazione dei campioni;
- estrazione mediante miscela costituita da metilene cloruro e acetone in presenza di sodio cloruro;
- purificazione attraverso estrazione in fase solida (SPE) su fase stazionaria a scambio cationico;
- identificazione e determinazione degli analiti in cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) mediante monitoraggio di tre ioni diagnostici specifici (ione pseudo-molecolare e due frammenti da esso derivanti).

## **Materiali e metodi**

### **Reagenti e prodotti**

Tutti i reagenti (ammonio acetato, cloruro di sodio,

ammoniaca, acido acetico, acido formico) ed i solventi impiegati (acetone, alcool metilico, metilene cloruro) sono di grado analitico o HPLC (J.T. Baker, Deventer, Holland e Carlo Erba, Milano, Italia).

Gli standards di riferimento di sulfadiazina, sulfatiazolo, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametossazolo, sulfametossipiridazina, sulfadimetossina, sulfachinossalina, sulfamonometossina (standard interno) e trimetoprim sono stati tutti acquistati dalla Sigma (Milano, Italia).

### **Soluzioni standard**

Sono state preparate soluzioni madre da 1 mg/ml di ciascun sulfamidico considerato e del trimetoprim, sciogliendo 100 mg in 100 ml di metanolo (MeOH).

Al momento dell'uso, dalle singole soluzioni madre è stata preparata una prima miscela standard di tutti i farmaci considerati da 10 µg/ml e da questa una seconda miscela da 1 µg/ml, sempre in MeOH.

Tutte le soluzioni sono state conservate al buio a +4°C.

### **Preparazione, estrazione e purificazione del campione**

10 g di campione adeguatamente omogeneizzato sono stati estratti con 50 ml di una miscela di metilene cloruro/acetone (1:1 v/v) in Ultra-Turrax e successivamente in ultrasuoni.

Dopo aggiunta di sodio cloruro e sodio solfato per favorire la separazione delle fasi e successiva centrifugazione (5 min, 1280 g), 5 ml di estratto sono stati addizionati di 0,25 ml di acido acetico glaciale e purificati su colonna SPE solfonica (3 ml, 500 mg, J.T. Baker) già condizionata con 10 ml di una miscela di metilene cloruro/acetone/acido acetico (47,5:47,5:5 v/v/v). Dopo un lavaggio con 5 ml di acqua e 5 ml di MeOH, gli analiti sono stati

agent mainly used in fish culture and often combined with sulfonamides in commercial preparations. Residues of these drugs in foodstuffs are of concern because of their potential carcinogenic character. Consequently, the European Union (EU) and United States Food and Drug Administration set maximum residue limits for both sulfonamides (100 µg/kg either as a single molecule or as a sum of all detected compounds within the class) and trimethoprim (TMP) (50 µg and 100 µg/kg, according to the matrix) in chicken, fish muscle and eggs. On the other hand, these limits have made of concern the development of confirmatory methods for the analysis of these molecules. LC-MS/MS technique, in particular, resulted fit for the detection of these medium polarity compounds.

An effective multi-residue method is presented for the simultaneous determination of certain sulfonamides (sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxypyridazine, sulfamethoxazole, sulfadimethoxine and sulfaquinoxaline) and TMP in products of animal origin (chicken muscle, fish muscle and eggs) by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) at levels in compliance with the legislation in force.

The drugs were extracted with a mixture of dichloromethane/acetone (1:1, v/v) and clean-up was carried out by solid phase extraction (SPE) on a sulfonic acid column after addition of acetic acid to the extract, so as to allow for ion-exchange. Sulfonamides and TMP were then eluted from the SPE column using a solution of ammonia in methanol. The chromatographic separation was performed on a C<sub>18</sub> column by using a mobile phase of methanol/5 mM aqueous ammonium acetate and 0.1% formic acid in gradient, and the LC-MS/MS analysis was performed in a triple-quadrupole mass spectrometer equipped with a TurbolonSpray™ source and operated in positive ion mode.

The Multiple Reaction Monitoring (MRM) approach was adopted for the identification and quantification of the molecules of concern and was applied by selecting three specific diagnostic ions (one precursor ion and two product ions) for each analyte, so as to meet the criteria set by the EU both for the minimum required number of identification points

eluiti con 5 ml di una miscela costituita da ammoniaca al 2,5% in MeOH. L'eluato è stato portato a secco sotto flusso di azoto a +50°C ed il residuo ripreso con 100 µl di MeOH e 100 µl di ammonio acetato 5 mM contenente lo 0,1% di acido formico. Dopo centrifugazione (5 min, 1280 g), tale soluzione è stata analizzata in LC-MS/MS.

#### **Analisi LC-MS/MS**

L'analisi cromatografica è stata effettuata con l'impiego di una pompa HPLC binaria PE Serie 200 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) corredata di un autocampionatore PE Serie 200.

La separazione cromatografica è stata condotta su una colonna C<sub>18</sub> LUNA ODS (2) (75 x 4,6 mm i.d., 3 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) termostata a +40°C. Come fase mobile è stata impiegata una miscela costituita da MeOH (A) e acqua, contenente ammonio acetato 5 mM acidificato con lo 0,1% di acido formico (B), con una composizione (A/B, v/v) iniziale di 20:80, gradiente lineare in 40 min fino a 90:10, ritorno a 20:80 in 2 min e riequilibrio per ulteriori 5 min. Il flusso della fase mobile è stato di 750 ml/min, con un rapporto di splittaggio 1:5 post-colonna prima dell'introduzione in massa, mentre il volume di iniezione è stato di 10 µl.

La rivelazione degli analiti è stata realizzata con uno spettrometro di massa a triplo-quadrupolo API2000 (Sciex, Toronto, Canada) equipaggiato con una sorgente di ionizzazione TurboIonSpray™, in modalità ioni positivi.

Come «curtain gas» e gas di collisione è stato utilizzato azoto ultrapuro, mentre come gas di nebulizzazione e gas ausiliare è stata impiegata aria compressa essiccata (H<sub>2</sub>O < 500 ppm). La

temperatura della sorgente e' stata ottimizzata a +500°C.

Il voltaggio del capillare è stato impostato a 5,5 kV, mentre il potenziale dell'orifizio, l'energia di collisione (Tabella 1) e gli altri parametri di trasmissione sono stati ottimizzati per ciascuna molecola.

La calibrazione strumentale è stata condotta mediante infusione di una soluzione 10<sup>-4</sup> M di glicole propilenico (PPG) al flusso di 5 µl/min per il controllo della risoluzione, la cui condizione di accettabilità è stata fissata, per ogni massa, in 0,7 ± 0,1 amu, misurata a metà altezza (Full Width Half Height: FWHH).

Gli spettri MS e MS-MS dei farmaci considerati sono stati ottenuti mediante infusione in IonSpray di soluzioni da 10 µg/ml di ciascuno standard in MeOH/ammonio acetato 5 mM + acido formico 0,1% (50:50 v/v) ad una velocità di flusso di 5 µl/min.

Per ciascun analita gli ioni frammento diagnostici sono stati ottenuti mediante dissociazione collisione-indotta (CID) in sorgente della molecola protonata [M+H]<sup>+</sup>, previo idoneo aggiustamento del voltaggio dell'orifizio.

Per l'identificazione e quantificazione degli analiti è stato adottato l'approccio «Multiple Reaction Monitoring» (MRM), selezionando le due transizioni ioniche più intense per ciascun composto (1 ione precursore e 2 ioni frammento).

Le transizioni ione pseudo-molecolare ■■■■ frammento ottenute per ciascun farmaco ed utilizzate per la caratterizzazione ed il dosaggio degli stessi sono riportate nella Tabella 1.

and for the ion intensity ratio tolerances.

Calculated detection limits for sulfonamides (signal/noise ratio 3:1) ranged from 0.1 µg to 1.7 µg/kg, whereas the recovery rates varied between 69.5% and 94.2% throughout the different compounds and matrices. The corresponding values for TMP ranged from 0.2 µg to 0.4 µg/kg and between 51.9% and 52.8%, according to the matrix.

The easy sample preparation procedure and the specific and selective mass spectrometric detection make the present method reliable and suitable for the unambiguous identification and quantitation of the analytes taken into account in chicken, fish muscle and eggs. Moreover, method application has successfully extended to other sulfonamides, such as sulfaguanidine, sulfapyridine, sulfamoxole and sulfamethizole.

#### **Keywords**

Chicken, fish muscle and eggs – LC-MS/MS – SPE – Sulfonamides – Trimethoprim.

#### **Introduction**

Sulfonamides, N-derivatives of 4-amino-benzensulfonamide, represent a wide range of synthetic antibacterial compounds commonly used in conjunction with TMP, in poultry farming and fish culture. Experimental evidence of their action as growth promoters is available in literature (12).

These molecules, supposed to have potential carcinogenic properties, were included in the Group B of Commission (EC) Directive 96/23/EC (5), comprising those drugs for which the European Union (EU) set maximum residue limits (MRLs) in foodstuffs. These permitted levels are 100 µg/kg for sulfonamides and 50-100 µg/kg for TMP, depending on the item.

The need to detect even small quantities of these drugs in food has made of main concern the development of analytical methods with a suitable sensitivity and specificity (9).

The analytical techniques commonly used for the research of such drugs in food include immunochemical tests (e.g. ELISA, CHARM test) (4, 14) and chromatographic methods (e.g. high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet, diode array and fluorimetric detection (11). Commission Deci-



## Validazione del metodo

### Preparazione dei campioni fortificati

In sede di validazione del metodo sono stati presi in considerazione i seguenti parametri: specificità, linearità di risposta strumentale, limite di rivelazione, precisione (ripetibilità) e accuratezza (stimata attraverso la valutazione della percentuale di recupero).

La specificità è stata valutata analizzando 20 campioni di muscolo di pollo, muscolo di pesce, uova e verificando l'assenza di picchi interferenti con gli analiti in esame.

La linearità di risposta del rivelatore a massa è stata stabilita mediante la costruzione di rette di calibrazione su quattro punti a concentrazioni comprese tra 25 e 200 µg/l, per tutti gli analiti considerati. I limiti di rivelazione per tutte le molecole sono stati determinati sulla base di campioni fortificati, prendendo in considerazione un rapporto segnale/rumore utile pari a 3:1.

Gli altri parametri sono stati determinati eseguendo prove di fortificazione a differenti livelli su campioni di muscolo di pollo, pesce ed uova negativi per i farmaci considerati, secondo lo schema riportato nelle Tabelle 4 e 5.

La sulfamonometossina è stata

scelta come standard interno (IS) per le prove di validazione e nelle analisi di routine.

## Risultati

In Figura 1 è riportato il cromatogramma in acquisizione MRM di una miscela standard degli analiti in esame, alla concentrazione di 100 µg/l. La Figura 2 riporta i cromatogrammi LC-MS/MS registrati in modalità «Multiple Reaction Monitoring» (MRM) relativi a campioni negativi per le sostanze in esame; tali tracciati evidenziano la specificità dell'analisi eseguita, in quanto ai tempi di eluizione dei sulfamidici e del trimetoprim non si riscontrano interferenze da matrice.

Inoltre, poiché l'identificazione dei suddetti analiti è stata condotta su tre ioni diagnostici (ione pseudomolecolare e due frammenti), ciò ha consentito di conseguire un numero totale di punti di identificazione (IPs) pari a quattro (uno per lo ione pseudomolecolare e tre per i due ioni frammento), rispetto ai tre richiesti dalla Decisione 2002/657/CE per le sostanze del gruppo B, di cui fanno parte sia i sulfamidici che il trimetoprim.

In accordo con le linee-guida definite dal suddetto documento,

sion 2002/657/EC (6) prescribes the use of mass spectrometry coupled to the chromatographic analysis for the unambiguous identification of xenobiotics in food. The combination liquid chromatography/mass spectrometry (LC-MS) is the most suitable technique for the determination of non-volatile polar compounds such as sulfonamides (1, 2, 3, 7, 8, 10, 13, 15, 16).

This evidence brought to the development of a multi-residue method for the simultaneous analysis of several sulfonamides and TMP in products of animal origin.

The analytical steps of the proposed method included:

- sample homogenisation;
- extraction with a mixture of dichloromethane/acetone in presence of sodium chloride;
- clean-up by solid phase extraction (SPE) on an ion-exchange stationary phase;
- identification and determination of the analytes by LC-MS/MS through the monitoring of three specific diagnostic ions (pseudo-molecular ion and two fragments).

## Materials and methods

### Reagents and products

All reagents (ammonium acetate, sodium chloride, ammonia, acetic acid, formic acid) and solvents (acetone, methanol and dichloromethane) were of analytical or HPLC grade (J.T. Baker, Deventer, Holland) and Carlo Erba (Milan, Italy).

The standards of sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxazole, sulfamethoxypyridazine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline, sulfamonomethoxine (SMM) (internal standard) and TMP were all purchased from Sigma (Milan, Italy).

### Standard solutions

Stock solutions of all sulfonamides and TMP were prepared at a concentration of 1 mg/ml by diluting 100 mg of powder as free base in 100 ml of methanol.

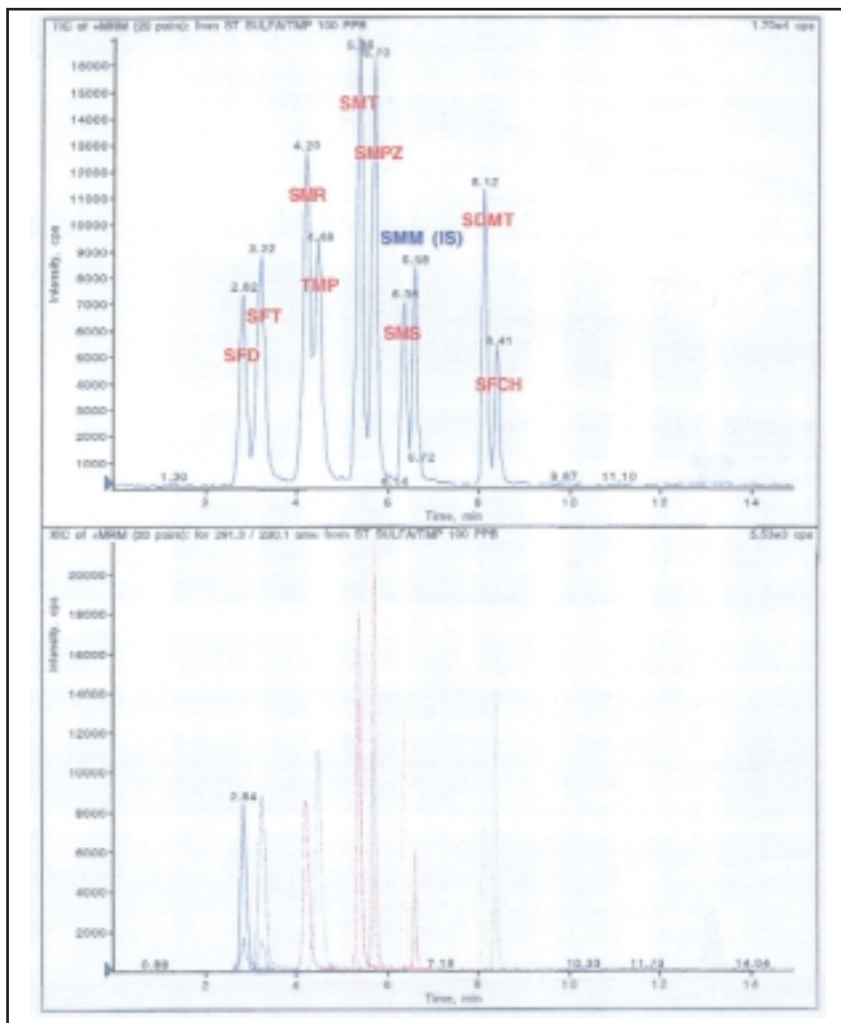
At the moment of use a first mixture containing all drugs at a concentration of 10 µg/ml was prepared from the single stock solutions, followed by a second ten-fold dilution in methanol (1 µg/ml).

All solutions were stored in the dark at +4°C.

**Tabella 1:** Ioni diagnostici selezionati e principali parametri strumentali per l'analisi MRM di sulfamidici e trimetoprim.

**Table 1:** Selected diagnostic ions and main instrumental parameters for the MRM analysis of sulfonamides and trimethoprim.

Analita Analyte	Ione precursore Precursor ion (m/z)	Frammento Fragment (m/z)	Potenziale orifizio Cone voltage (V)	Energia collisione Collision energy (eV)
Sulfadiazine	251.1	156.0; 92.1	20	-21
Sulfathiazole	256.0	156.0; 108.1	21	-21
Sulfamerazine	265.1	108.1; 92.1	16	-32
Sulfamethazine	279.3	186.1; 124.0	21	-30
Sulfamethoxypyridazine	281.2	156.0; 108.1	21	-25
Sulfamonomethoxine (IS)	281.2	156.0; 108.0	20	-32
Sulfamethoxazole	254.1	92.2; 156.0	21	-27
Sulfadimethoxine	311.3	108.2; 156.0	16	-29
Sulfaquinoxaline	301.3	156.0; 108.0	20	-27
Trimethoprim	291.3	230.1; 261.1	30	-39



**Figura 1:** Cromatogramma MRM di una miscela standard (100...) contenente i i sulfamidici considerati ed il trimetoprim.

**Figure 1:** MRM chromatogram of a standard mixture (100...) containing the sulfonamides of concern and trimethoprim.

le positività riscontrate in alcuni campioni incogniti (Figura 3) per sulfamidici e trimetoprim sono state confermate mediante verifica dei rapporti di intensità ionica (o intensità ioniche relative), espressi come percentuale, fra le due transizioni precursore/ione prodotto (meno intensa) e ione precursore/ione prodotto (più intensa) relative ai farmaci rinvenuti nei campioni. I dati relativi a tale tipo di conferma sono riportati in Tabella 2.

Per quanto riguarda la linearità di risposta, i coefficienti di correlazione ( $R^2$ ) delle rette di calibrazione sono sempre risultati

superiori a 0,990.

I valori dei limiti di rivelazione variano a seconda della molecola, da  $0,1 \div 1,2 \mu\text{g/Kg}$  per i tessuti muscolari e da  $0,3 \div 1,7 \mu\text{g/Kg}$  per le uova (Tabella 3). L'accuratezza (espressa come recupero) e la precisione (deviazione standard relativa, RSD) stimate per ciascun analita sono riportate nelle Tabelle 4 e 5.

I recuperi medi percentuali dei sulfamidici ottenuti dal muscolo di pollo, variano, a seconda della molecola, in un intervallo da 74,2 a 94,2%, con una deviazione standard relativa (RSD) compresa tra 5,4 e 14,8, mentre quelli ottenuti dalle uova variano da

### Sample preparation, extraction and clean-up

10 g of homogenised sample were extracted with 50 ml of a dichloromethane/acetone mixture (1:1 v/v) in Ultra-Turrax and then in an ultrasonic bath.

After addition of 10 g of sodium chloride and sodium sulphate to enhance the separation of the phases and centrifugation (5 min, 1280 g), 5 ml of extract were added of 0.25 ml of acetic acid and purified on a SPE sulfonic acid column (3 ml, 500 mg, J.T. Baker) already conditioned with 10 ml of a mixture containing dichloromethane/acetone/acetic acid (47.5:47.5:5, v/v/v). After washing with 5 ml of water and 5 of methanol, analytes were eluted with 5 ml of a mixture containing ammonia 2.5% in methanol. The eluate was evaporated to dryness under a stream of nitrogen at  $+50^\circ\text{C}$  and the remainder was dissolved in 100  $\mu\text{l}$  of methanol and 100  $\mu\text{l}$  of 5 mM ammonium acetate containing 0.1% of formic acid. After centrifugation (5 min, 1280 g) this solution was injected into LC-MS/MS.

### Instrumental analysis

The chromatographic analysis was performed by using a PE Series 200 binary pump HPLC provided with a PE Series 200 autosampler (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA).

The chromatographic separation was carried out on a  $\text{C}_{18}$  LUNA ODS(2) column (75 x 4.6 mm id, 3  $\mu\text{m}$ ) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) kept at the temperature of  $+40^\circ\text{C}$ . The mobile phase consisted of a mixture of methanol (A) and water containing 5 mM ammonium acetate and 0.1% of formic acid (B). The starting composition of the gradient was methanol/aqueous phase 20:80 (A/B, v/v), then up to 90:10 in 40 min, back to 20:80 in 2 min and further 5 min of equilibration. The flow rate was 750  $\mu\text{l}/\text{min}$ , with a split ratio of 1:5. The injection volume was 10  $\mu\text{l}$ .

Analytes were detected in a triple-quadrupole API2000 mass spectrometer (Sciex, Toronto, Canada) equipped with a TurbolonSpray™ source operated in positive ion mode.

Ultrapure nitrogen was used as curtain and collision gas, whereas dry air (water <500 ppm) was used as nebulizer and auxiliary gas. Source temperature was optimised at  $+50^\circ\text{C}$ .

Capillary potential was set at 5,5 kV

69,5 a 88,9% (RSD da 11,5 a 23,2).

Per il trimetoprim sono stati ottenuti recuperi pari al 51,9 % (RSD 10,8) per il muscolo di pesce ed al 52,8% (RSD 12,3) per le uova.

Il metodo descritto è risultato inoltre applicabile ad altri sulfamidici come sulfaguanidina (SFG), sulfapiridina (SFP), sulfamoxolo (SMX) e sulfametizolo (SMTZ). Nella Figura 4 è rappresentata una separazione cromatografica LC-MS/MS in acquisizione MRM di

una miscela standard da 100 µg/l (1 ng/10 ml iniettati) di dette molecole ottenuta nelle stesse condizioni strumentali applicate agli altri farmaci oggetto di questo studio.

Gli ioni diagnostici (pseudomolecolare e frammenti) ottimizzati e presi in considerazione per l'analisi LC-MS/MS di tali sulfamidici sono stati i seguenti: SFG (m/z 215,1 → 156,0); SFP (m/z 250,2 → 156,0); SMX (m/z 268,3 → 156,0);

while cone voltage, collision energy and the other transmission parameters were optimised for each molecule (Table 1).

The instrumental calibration was carried out by infusing a 10<sup>-4</sup> M solution of polypropylene glycol at a flow rate of 5 µl/min in order to control resolution. The acceptance conditions were set at 0.7 ± 0.1 amu for each mass (full width at half height).

The MS and MS-MS spectra of the drugs into account were registered via infusion of 10 mg/ml solutions of each standard in a mixture of methanol/5 mM ammonium acetate and 0.1% formic acid in water (50:50 v/v).

The diagnostic ions for each analyte

**Tabella 2:** Conferma di alcuni campioni positivi per sulfamidici e trimetoprim mediante calcolo dei rapporti di intensità ionica tra le transizioni considerate.

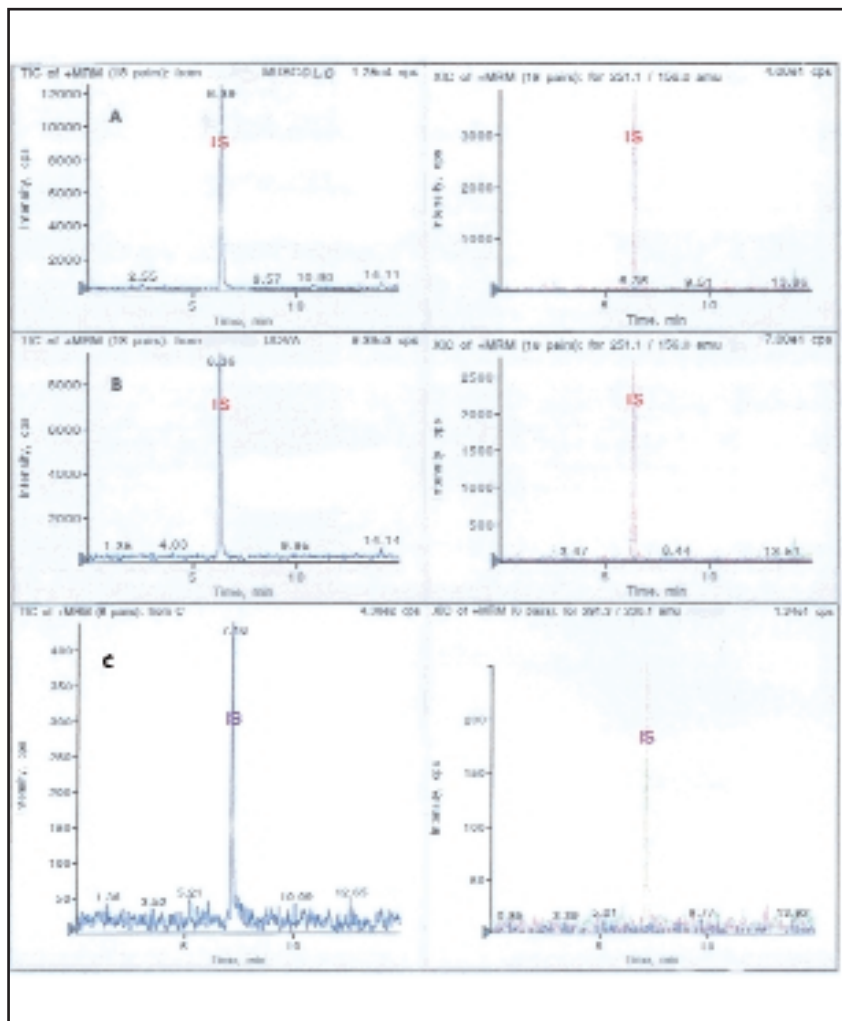
**Table 2:** Confirmation of incurred samples for sulfonamides and trimethoprim through the calculation of the ion intensity ratios between the transitions considered.

#### 2A: Sulfadiazina e sulfachinosalina/Sulfadiazine and sulfaquinoxaline

Prove Tests	Sulfadiazina/Sulfadiazine Prima transizione 251,1 → 156 1st transition 251.1 → 156 Seconda transizione 251.1 → 92.1 2nd transition 251.1 → 92.1		Sulfachinosalina/Sulfadiazine Prima transizione 301.3 → 156 1st transition 301.3 → 156 Seconda transizione 301.3 → 108 2nd transition 301.3 → 108			
	Valore trovato Measured Value (µg/kg)	Intensità Ioniche Relative Ion intensity ratios	Valore trovato (µg/kg)	Intensità Ioniche Relative Measured value Ion intensity ratios		
		Trovata (%) Detected (%)	Range tolleranza Tolerance range (%)	Trovata (%) Detected (%)	Range tolleranza Tolerance range (%)	
Standard Rette Calibrazione Standard calibration straight lines		13,4	9,4÷17,5	25,7	19,3÷32,1	
Campioni fortificati Fortified samples		13,9	9,7÷18,1	27,6	20,7÷34,5	
Muscolo pesce Fish muscle	19,1	16,6	Confermato Confirmed	8,0	30,9	Confermato Confirmed
Uova Eggs	7,1	12,9	Confermato Confirmed			

#### 2B: Sulfametossipiridazina e trimetoprim/Sulfamethoxypridazine and trimethoprim.

Prove Tests	Sulfametossipiridazina/Sulfamethoxypridazine Prima transizione 281,2 → 156 1st transition 281.2 → 156 Seconda transizione 281.2 → 108.1 2nd transition 281.2 → 108.1		Trimetoprim/Trimethoprim Prima transizione 291.3 → 230,1 1st transition 291.3 → 230,1 Seconda transizione 291.3 → 261,1 2nd transition 291.3 → 261,1			
	Valore trovato Measured Value (µg/kg)	Intensità Ioniche Relative Ion intensity ratios	Valore trovato Measured value (µg/kg)	Intensità Ioniche Relative Ion intensity ratios		
		Trovata (%) Detected (%)	Range tolleranza Tolerance range (%)	Trovata (%) Detected (%)	Range tolleranza Tolerance range (%)	
Standard Rette Calibrazione Standard calibration straight lines		27,0	20,3÷33,8	98,1	78,5÷117,7	
Campioni fortificati Fortified samples		27,5	20,6÷34,4	88,9	71,1÷106,7	
Muscolo pesce Fish muscle				1,5	90,1	Confermato Confirmed
Uova Eggs	151,7	26,3	Confermato Confirmed	191,5	92,9	Confermato Confirmed



**Figura 2:** Cromatogrammi MRM di campioni di muscolo di pollo (A), uova (B) e muscolo di pesce (C) negativi per sulfamidici e trimetoprim.

**Figure 2:** MRM chromatograms of samples of chicken muscle (A), eggs (B) and fish muscle (C) negative for sulfonamides and trimethoprim.

SMTZ ( $m/z$  271,1  $\blacksquare$  155,9  $\blacksquare$  108,1).

L'applicabilità del metodo a tali molecole è stata valutata fortificando un campione di tessuto muscolare di orata a tre livelli di concentrazione (12,5-25-50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) per un totale di nove prove per ogni farmaco.

I valori di recupero e RSD ottenuti sono stati i seguenti: SFG 68,0% (RSD 3,6%), SFP 93,7% (RSD 3,7%), SMX 97,9% (RSD 13,6%) e SMTZ 77,0% (RSD 6,9).

## Discussione

L'identificazione delle molecole mediante LC-MS/MS è basata sulla verifica della loro

struttura chimica e di conseguenza tale tecnica è classificata come metodo di conferma dalla Decisione 2002/657/CE. I criteri adottati per la identificazione/conferma degli analiti sono stati quelli previsti dalla sopra menzionata Decisione che, accanto alla valutazione dei rapporti di intensità ionica già prevista dalla precedente normativa, introduce il sistema dei punti di identificazione (IPs). Nel presente lavoro, in particolare, l'approccio adottato si è basato sul monitoraggio contemporaneo di tre ioni specifici per ciascun farmaco strutturati in due transizioni (MRM), per un totale di quattro IPs.

were obtained by collision-induced dissociation (CID) from the corresponding pseudomolecular ion  $[M+H]^+$ , after an adequate adjustment of the orifice voltage.

The Multiple Reaction Monitoring approach was adopted for the identification and quantitation of molecules by selecting the two most intense ion transitions for each compound (1 precursor ion and 2 fragments).

The transitions (parent ion  $\blacksquare$  daughter ion) selected for each drug and used for identification and determination purposes are presented in Table 1.

### Method validation-preparation of fortified samples

The following parameters were taken into account in the validation process: specificity, linearity of instrumental response, detection limit, precision (repeatability) and trueness (expressed as recovery rates).

Specificity was evaluated by analysing 20 samples of chicken muscle, fish muscle and eggs and by verifying the absence of interfering peaks at the retention time of each molecule of interest.

The linearity of response for the mass spectrometer was established by drawing four points calibration curves with concentrations ranging between 25  $\mu\text{g}$  and 200  $\mu\text{g}/\text{l}$  for all compounds.

Detection limits for all molecules were determined in spiked samples by taking into account a signal/noise ratio of 3:1. Other parameters were determined by spiking blank samples of chicken, fish and eggs according to the scheme described in Tables 4 and 5. Sulfamonomethoxine (SMM) was adopted as internal standard (IS) both for validation and routine analyses.

## Results

Figure 1 shows the MRM chromatogram of a standard mixture containing all analytes at a concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{l}$ . MRM chromatograms for representative blank samples are given in Figure 2. These profiles highlight the specificity of the method, since no interferences from the matrices were revealed at the retention times of sulfonamides and TMP.

Moreover, since the identification of the aforesaid analytes was performed by monitoring three diagnostic ions (pseudomolecular ion and two fragments), it



Nelle analisi di routine, le intensità relative delle transizioni ioniche nei campioni risultati positivi sono state confrontate con quelle degli standards delle curve di calibrazione e dei campioni fortificati, a concentrazioni paragonabili,

allowed to obtain even four identification points (IPs) (one for the parent ion and three for the daughter ions) instead of the three required by Commission Decision 2002/657/EC for the substances included in Group B of Directive 96/23/EC, such as sulfonamides and TMP.

In accordance with these guidelines, some incurred samples (Fig. 3) were confirmed by verifying the compliance of ion intensity ratios (less intense versus more intense) for the drugs found in the samples. Some applications of these confirmation criteria are given in Table 2.

Regarding response linearity, the correlation coefficients of the calibration curves were always higher than 0.990.

Calculated detection limits varied through the compounds from 0.1 to 1.2 µg/kg for muscle and between 0.3 and 1.7 µg/kg for eggs (Table 3).

Trueness (expressed as recovery rates) and precision (relative standard deviation) estimated for each analyte are given in Tables 4 and 5.

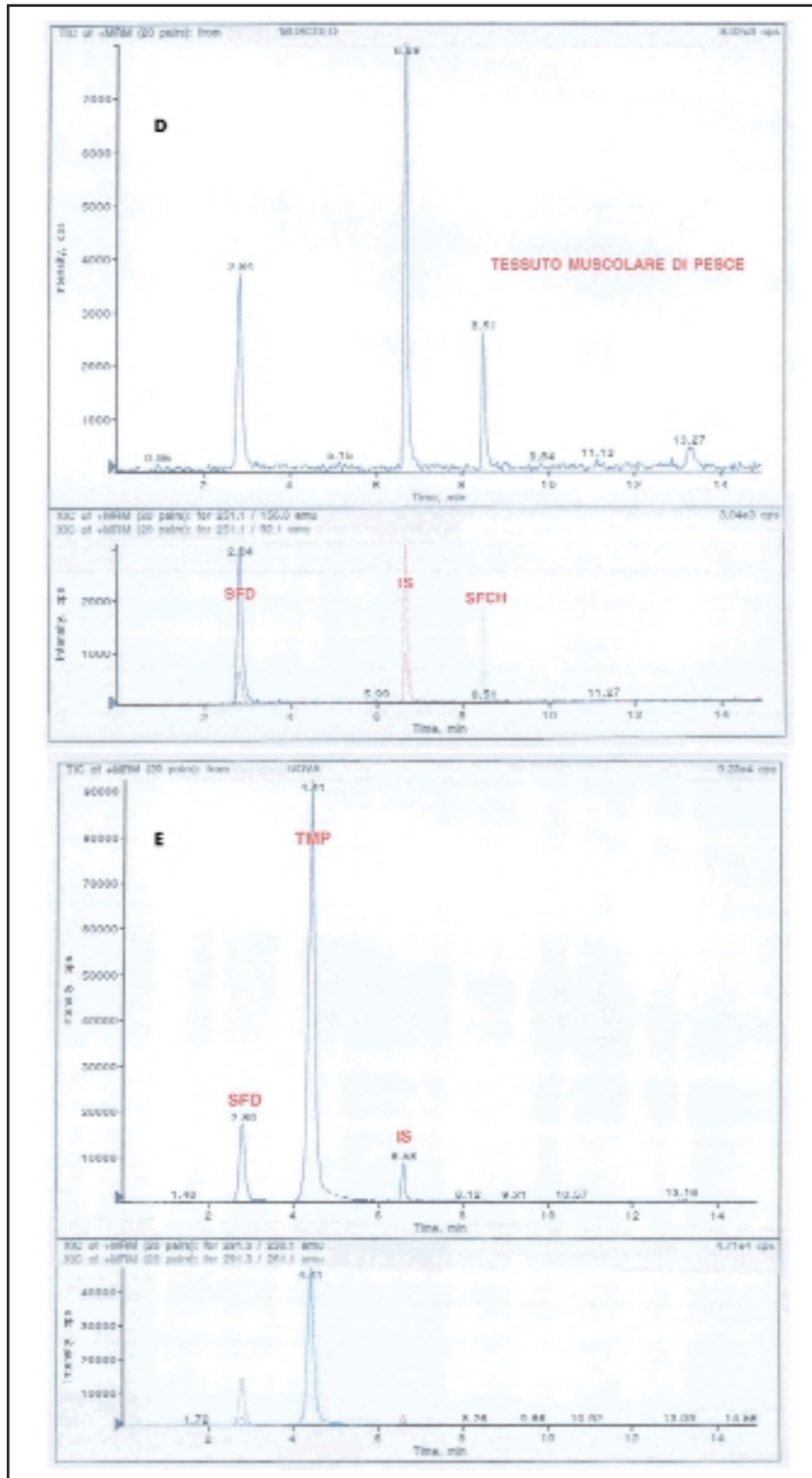
The mean recovery rates for sulfonamides in chicken muscle were between 74.2% and 94.2% according to the molecule with a relative standard deviation (RSD) ranging from 5.4% to 14.8% whereas the same values for eggs varied between 69.5% and 88.9% (RSD from 11.5% to 23.2%).

The recovery rates for TMP in fish muscle and eggs were 51.9 % and 52.8% (RSD: 10.8% and 12.3%).

**Tabella 3:** Limiti di Rivelazione (LR) calcolati per tessuti muscolari e uova.

**Table 3:** Detection limits calculated for muscle tissues and eggs.

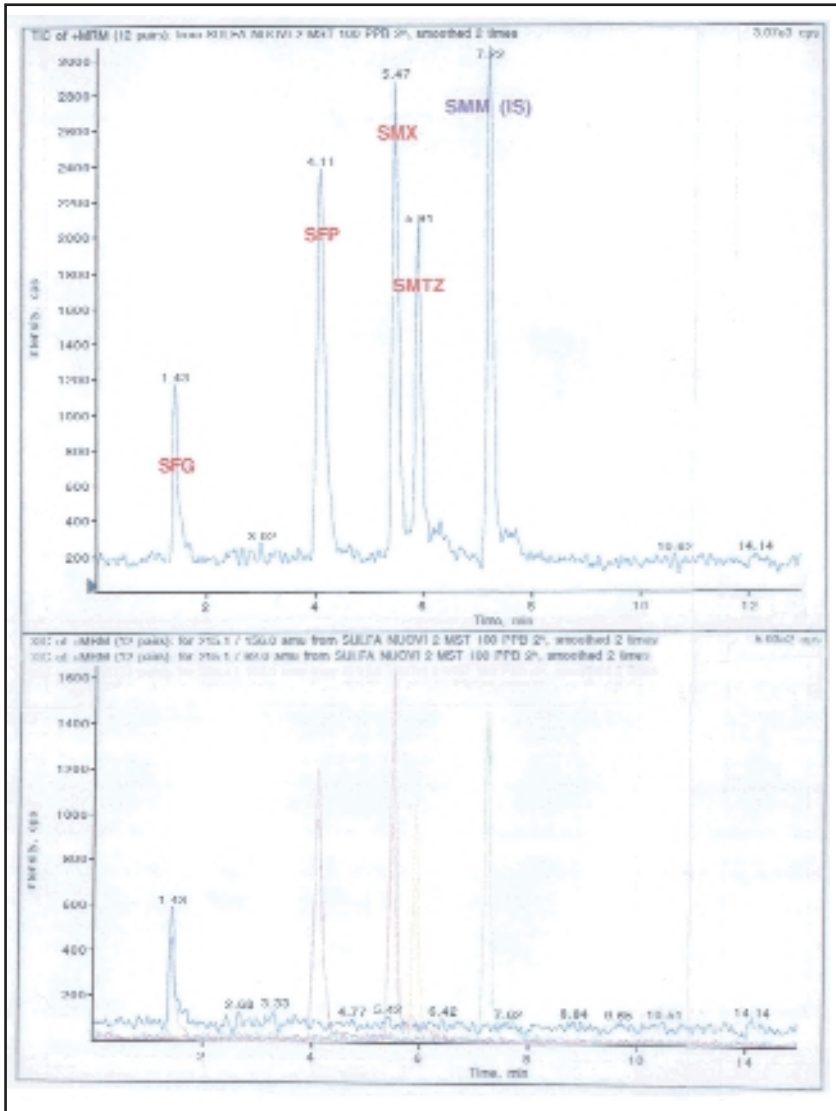
Analyte	LR	LR
	Muscolo pollo/pesce µg/Kg Chicken/fish muscle	Uova µg/Kg Eggs
Sulfadiazina <i>Sulfadiazine</i>	0,4	0,4
Sulfatiazolo <i>Sulfathiazole</i>	0,6	0,9
Sulfamerazina <i>Sulfamerazine</i>	1,2	1,7
Sulfametazina <i>Sulfamethazine</i>	0,3	0,7
Sulfametossipiridazina <i>Sulfamethoxypridazine</i>	1,2	0,5
Sulfametossazolo <i>Sulfamethoxazole</i>	0,5	1,1
Sulfadimetossina <i>Sulfadimethoxine</i>	0,1	0,3
Sulfachinossalina <i>Sulfachinoxaline</i>	0,2	0,3
Trimetoprim	0,2	0,4



**Figura 3:** Cromatogrammi MRM relativi ad un muscolo di pollo positivo per sulfadiazina (19.1 µg/kg) e sulfachinossalina (8.0 µg/kg) (D) ed ad un campione di uova positivo per sulfadiazina (7.1 µg/kg) e trimetoprim (19.15 µg/kg) (E).

**Figure 3:** MRM chromatograms of a chicken muscle tested positive for sulfadiazine...and of an egg sample tested positive for sulfadiazine (19.1 µg/kg) and sulfaquinossalina (8.0 µg/kg) (D) and a positive egg sample for sulfadiazine (7.1 µg/kg) and trimetoprim (19.15 µg/kg) (E).





**Figura 4:** Cromatogramma LC-MS/MS in acquisizione MRM (TIC e XIC) di una miscela standard (100 µg/l) contenente i nuovi sulfamidici considerati.

**Figure 4:** LC-MS/MS chromatogram in MRM acquisition (TIC and XIC) of a standard mixture (100 µg/l) containing the new sulfonamides studied.

rientrando negli intervalli di accettabilità stabiliti dalla Decisione.

Seguendo le indicazioni delle linee-guida comunitarie è stato scelto come standard interno un composto, la sulfamonometossina (SMM), dotato di caratteristiche strutturali e di un comportamento cromatografico simili a quelli degli analiti presi in considerazione. La scelta della SMM è stata determinata dal fatto che nella nostra esperienza di controllo degli alimenti di origine animale non è mai stata

riscontrata la presenza di tale sostanza.

Tale sostanza è stata impiegata anche ai fini della valutazione quantitativa, ad eccezione del trimetoprim, in quanto quest'ultimo presenta percentuali di recupero significativamente inferiori a quelle della SMM e ciò avrebbe determinato errori nel calcolo delle sue concentrazioni; di conseguenza, il trimetoprim è stato quantificato sulla relativa retta esterna.

Allo scopo di ridurre gli effetti negativi sulla ionizzazione da

The method described resulted also applicable to other sulfonamides like sulfaguanidine (SFG), sulfapyridine [SFP], sulfamoxole (SMX) and sulfamethizole (SMTZ).

Figure 4 represents the MRM spectrum for a standard mixture containing all these molecules at the concentration of 100 µg/l.

The following ion transitions were monitored: SFG ( $m/z$  215.1  $\rightarrow$  156.0; 215.1  $\rightarrow$  92.0); SFP ( $m/z$  250.2  $\rightarrow$  156.0; 250.2  $\rightarrow$  108.0); SMX ( $m/z$  268.3  $\rightarrow$  156.0; 268.3  $\rightarrow$  268.3-113.0); SMTZ ( $m/z$  271.1  $\rightarrow$  155.9; 271.1  $\rightarrow$  108.1).

The suitability of this method to the detection of such molecules was evaluated by fortifying a sample of sea bream muscle at three concentration levels (12.5-25-50 µg/kg) so as to obtain an overall number of nine replicates for each drug.

Trueness (recovery rates) and precision were as follows: SFG 68.0% (RSD 3.6%), SFP 93.7% (RSD 3.7%), SMX 97.9% (RSD 13.6%) and SMTZ 77.0% (RSD 6.9%).

## Discussion

LC-MS/MS allows to identify the analytes of interest on the basis of their chemical structure and consequently it is classified as a confirmatory method by Commission Decision 2002/657/EC. The confirmatory analysis of sulfonamides and TMP was carried out according to the criteria described in this Decision, including the evaluation of ion ratios and the achievement of the minimum required number of identification points (IPs).

In routine activity, ion intensity ratios for suspect positive samples were compared to those deriving either from the standards of the calibration curves or from samples spiked at comparable concentration levels, in order to verify if these values were comprised in the acceptability ranges established by the Decision.

In accordance with the EU guidelines, sulfamonometoxine (SMM) was selected as the internal standard. This compound highlighted chemical properties and a chromatographic behaviour close to those of the analytes taken into account. The choice of SMM was also due to the fact that this substance was never detected in our laboratory activity

parte della matrice è stato adottato un idoneo pre-trattamento dei campioni. L'utilizzo della SPE a scambio cationico si è infatti dimostrato un efficace, rapido e versatile sistema multiresiduale di purificazione di matrici complesse, che ha consentito di ottenere cromatogrammi privi di sostanze co-estratte interferenti con i sulfamidici ed il trimetoprim. Un altro vantaggio della SPE risiede nella possibilità di preconcentrare gli analiti in esame in un volume ridotto con conseguente ottenimento di letture strumentali più accurate dovute alla maggiore concentrazione di picco.

Molecole caratterizzate da un gruppo comune, come nel caso dei sulfamidici (gruppo ammino-benzen-sulfonamide o sulfanilamide), o sulfamidici aventi lo stesso peso molecolare (esempio SMPZ e SMM), nella fase di frammentazione in MS/MS presentano, anche se con diversa intensità, gli stessi ioni frammento (esempio: m/z 156,0; m/z 108,0; m/z 92,0). In questi casi, pur nella specificità delle transizioni molecolari prescelte nell'analisi LC-MS/MS in MRM, si rende necessaria una efficiente separazione cromatografica degli analiti. I metodi basati sulla spettrometria di massa sono infatti da considerarsi come metodi di conferma solo se accoppiati ad un'ideale separazione cromatografica preliminare dei componenti.

La corsa cromatografica in gradiente lineare adottata, in combinazione con l'utilizzo di una colonna analitica C<sub>18</sub> ad alta efficienza separativa, ha consentito di ottenere una soddisfacente separazione di tutti i farmaci considerati e di conseguenza una loro inequivocabile identificazione.

**Tabella 5:** Recuperi percentuali medi e deviazioni standard relative percentuali (RSD%) per sulfamidici e trimetoprim nelle uova.

**Table 5:** Average recovery rates and relative standard deviation percent (RSD%) for sulfonamides and trimethoprim in eggs.

Analita Analyte	Recupero% Recovery%	RSD	Replicati Replicates
Sulfadiazina Sulfadiazine	81,0	16,9	12
Sulfatiazolo Sulfathiazole	84,1	19,0	12
Sulfamerazina Sulfamerazine	79,4	16,5	12
Sulfametazina Sulfamethazine	85,4	13,5	12
Sulfametossipiridazina Sulfamethoxyypyridazine	88,5	11,5	12
Sulfametossazolo Sulfamethoxazole	88,9	23,2	12
Sulfadimetossina Sulfadimethoxine	78,9	17,8	12
Sulfachinossalina Sulfaquinoxaline	69,5	18,7	12
Trimetoprim Trimethoprim	52,8	12,3	9

I recuperi sono stati ottenuti fortificando un campione di uova negativo a quattro livelli di aggiunta (5, 10, 20, 40 µg/kg) per i sulfamidici ed a tre livelli di aggiunta (12,5, 25 e 50 µg/kg) per il trimetoprim.

The recoveries were obtained by fortifying a negative chicken sample at four concentration levels (5, 10, 20 and 40 µg/kg) for sulfonamides and at three concentration levels (12.5, 25 and 50 µg/kg) for trimethoprim.

**Tabella 4:** Recuperi percentuali medi e deviazioni standard relative percentuali (RSD%) per sulfamidici e trimetoprim nel muscolo di pollo e pesce.

**Table 4:** Average recovery rates and relative standard deviation percent (RSD%) for sulfonamides and trimethoprim in chicken and fish muscle.

Analita Analyte	Recupero% Recovery%	RSD	Replicati Replicates
Sulfadiazina Sulfadiazine	87,0	7,8	9
Sulfatiazolo Sulfathiazole	85,2	11,4	9
Sulfamerazina Sulfamerazine	84,1	5,4	9
Sulfametazina Sulfamethazine	93,1	7,6	9
Sulfametossipiridazina Sulfamethoxyypyridazine	86,6	6,2	9
Sulfametossazolo Sulfamethoxazole	94,2	10,3	9
Sulfadimetossina Sulfadimethoxine	81,6	9,5	9
Sulfachinossalina Sulfaquinoxaline	74,2	14,8	9
Trimetoprim Trimethoprim	51,9	10,8	12

I recuperi sono stati ottenuti, per i sulfamidici, fortificando un muscolo di pollo negativo a 3 livelli di aggiunta (10, 20, 30 µg/kg) e, per il trimetoprim, un muscolo di pesce negativo a 4 livelli di aggiunta (12,5, 20, 25, 50 µg/kg).

The recoveries were obtained, for the sulfonamides, by fortifying a negative chicken muscle at three concentration levels (10, 20 and 30 µg/kg) and for trimethoprim, a negative fish muscle at four concentration levels (12.5, 20, 25 and 50 µg/kg).

Di norma la precisione e l'accuratezza di un metodo sono stabilite mediante ripetute analisi di materiali di riferimento certificati (MRC). Nel presente

of food control.

SMM was also used for quantitative purposes in sulfonamides but not in TMP because of the significant difference in the recovery rates that would lead to inadequate estimations of concentrations. TMP was quantified by

caso, in assenza di specifici MRC, tali parametri sono stati valutati analizzando, in condizioni di ripetibilità, campioni negativi di muscolo di pollo, di muscolo di pesce e di uova fortificati con tutti gli analiti in esame. I valori dei recuperi e delle deviazioni standard relative ottenuti nelle prove di ripetibilità rientrano negli intervalli di accettabilità riportati nella Decisione 2002/657/CE.

### Bibliografia/References

1. Baliz G., Benesch-Girke L., Börner S. & S.A. Hewitt (1994). - Comparison of the determination of four sulfonamides and their N4-acetyl metabolites in swine muscle tissue using liquid chromatography with ultraviolet and mass spectral detection. *J. Chromatogr. B*, **661** (1): 75-84.
2. Bartolucci G., Pieraccini G., Villanelli F., Moneti G. & A. Triolo (2000). - Liquid chromatography tandem mass spectrometric quantitation of sulfamethazine and its metabolites: direct analysis of swine urine by triple quadrupole and by ion trap mass spectrometry. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **14**: 967-973.
3. Bogianni S., Corini R., Di Corcia A., Nazzari M. & M. Sergi (2003). - Confirmatory analysis of sulfonamide antibacterials in bovine liver and kidney: extraction with hot water and liquid chromatography coupled to a single- or triple-quadrupole mass spectrometer. *Rapid Comm. Mass Spectrom.*, **17**: 1146-1156.
4. Cliquet P., Cox E., Haasnoot W., Schacht E. & B.M. Goddeeris (2003). - Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Anal. Chim. Acta*, **494** (1, 2): 21-28.
5. Commissione europea (1996). - Direttiva 96/23/CE del 29 aprile 1996 concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui e che abroga le Direttive 85/358/CEE e 86/469/CEE e le Decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE. *Off. J.*, **L 125**, 23.05.1996, 10-32.
6. Commissione Europea (2002). - Decisione 2002/657/CE del 12.08.2002 che attua la direttiva del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati. *Off. J.*, **L 221**, 17.08.2002, 8-36.
7. Guggisberg B., Mooser A. E. & H. Koch (1992). - Methods for the determination of sulfonamides in meat. *J. Chromatogr. A.*, **624**: 425-437.
8. Ikai Y., Oka H., Kawamura N., Hayakawa J. & M. Yamada (1991). - Improvement of chemical analysis of antibiotics - XVII. Application of an amino cartridge to the determination of residual sulfonamide antibacterials in meat, fish and eggs. *J. Chromatogr. A.*, **541**: 393-400.
9. International Organisation for Standardization (ISO) (1999). - General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. ISO/IEC 17025:1999. ISO, Geneva.
10. Ito Y., Oka H., Ikai Y., Matsumoto H., Miyazaki & H. Nagase (2000). - Simultaneous determination of sulfonamide antibacterials in animal liver and kidney using high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.*, **898** (1): 95-102.
11. Jen J.F., Lee H.L. & B.N. Lee (1998). - Simultaneous determination of seven sulfonamide residues in swine wastewater by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, **793** (2): 378-382.
12. Niessen W.M.A. (1998). - Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, **812**: 53-75.
13. Pleasance S., Blay P. & M. A. Quilliam (1991). - Determination of sulfonamides by liquid chromatography, ultraviolet diode array detection and ion-spray tandem mass spectrometry with application to cultured salmon fresh. *J. Chromatogr. A.*, **558**: 155-173.
14. Strasser A., Dietrich R., Usleber E. & E. Märklbauer (2003). - Immunochemical rapid test for multiresidue analysis of antimicrobial drugs in milk using monoclonal antibodies and hapten-glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta*, **495** (1,2): 11-19.
15. Tarbin J. A., Clarke P. & G. Shearer (1999). - Screening of sulfonamides in eggs using gas chromatography-mass-selective detection and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, **729** (1-2): 127-138.
16. Van Rhijn J. A., Lasaroms J. J. P., Berendsen B. J. A. & U. A. Th. Brinkman (2002). - Liquid chromatography-tandem mass spectrometric determination of selected sulfonamides in milk. *J. Chromatogr. A.*, **960** (1-2): 121-133.

means of an external calibration curve.

Sample pre-treatment permitted to minimise the phenomenon of matrix-induced ion suppression. In particular ion-exchange solid-phase extraction (SPE) proved to be an effective, quick and versatile multi-residue system for the purification of complex matrices, as it avoided the presence of any interference from co-extracts in the chromatographic run of sulfonamides and TMP. Another advantage of SPE is the possibility of pre-concentrating the analytes in a smaller volume with the opportunity of more accurate instrumental detection thanks to the increased peak concentration.

During the acquisition of MS-MS spectra molecules belonging to the same chemical group such as sulfonamides (amino-benzen-sulfonamide or sulfanilamide group), or sulfonamides sharing the same molecular weight (such as sulfamethoxypyridazine and sulfamonomethoxine), can give rise to the same pattern of ions, although with different intensities (e.g. m/z 156, 108, and 92). In this case, apart from the specificity of the MRM approach, an efficient chromatographic separation is necessary for the unambiguous identification of the drugs. Commission Decision 2002/657/EC recognizes mass spectrometry techniques as confirmatory methods only when they are combined with a suitable preliminary chromatographic separation of components.

The chromatographic run in linear gradient, coupled with the use of a high separation efficiency C<sub>18</sub> analytical column, provided an adequate separation of all the drugs into account and consequently their unequivocal identification.

Precision and trueness for a method should be estimated by testing several times a certified reference material (CRM), if available. In this case, because of the lack of specific CRM, these parameters were evaluated by analysing blank samples of chicken muscle, fish muscle and eggs spiked with all the analytes of concern in repeatability conditions. Calculated recovery rates and coefficients of variation resulted compliant with the ranges of acceptability set by Decision 2002/657/EC.