

Análisis de macrólidos en carne de cerdo con el kit Bond Elut QuEChERS dSPE EMR—Lipid y una columna Poroshell 120

Nota de aplicación

Agricultura y análisis alimentario

Autores

Rong-jie Fu y Chen-Hao (Andy) Zhai
Agilent Technologies Shanghai Co. Ltd.

Resumen

En esta nota de aplicación se describe el uso de un método de preparación de muestras rápido, sencillo, económico, eficaz, sólido y seguro (QuEChERS, por el acrónimo de “Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe”) para la extracción y la purificación de residuos de siete macrólidos en carne de cerdo. En concreto, se analizaron residuos de espiramicina, tilmicosina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, roxitromicina y josamicina. Los analitos se extrajeron con el kit Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE para extracción mejorada de matriz en lípidos (EMR—Lipid) y se separaron con una columna HPLC Agilent Poroshell 120 EC-C18. La cuantificación se realizó mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC/MS/MS) con ionización por electrospray, con los instrumentos configurados en el modo de monitorización de reacciones múltiples de iones positivos. El método ofrece unos límites de detección bajos para todos los macrólidos en carne de cerdo. Se obtuvieron rangos de calibración dinámica entre 5 y 250 µg/kg para estos compuestos. Las recuperaciones totales variaron entre el 63,9 y el 98,4 %, con valores de desviación estándar relativa (DER) entre el 3,8 y el 10,3 %.



Agilent Technologies

Introducción

El uso de antibióticos en la producción de animales para consumo ha generado beneficios para toda la industria alimentaria. Sin embargo, su uso ha despertado preocupaciones en relación con su seguridad para la salud humana y de los animales. Los macrólidos son un grupo de antibióticos muy usados para tratar muchas infecciones respiratorias e intestinales de origen bacteriano que sufren los animales. Entre los macrólidos de uso más común se incluyen los siguientes: espiramicina, tilmicosina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, roxitromicina y josamicina.

Las agencias nacionales y los organismos internacionales han establecido límites legales sobre las concentraciones de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal [1,2]. Los límites legales de estos residuos varían entre 0 y 15 mg/kg. Previamente, ya se desarrolló una aplicación para el análisis de residuos de macrólidos a nivel de trazas en miel [3]. En dicho método se utilizaron un producto de preparación de muestras Agilent Bond Elut Plexa y una columna de separación Agilent Poroshell 120 EC-C18. Los resultados de recuperación y reproducibilidad obtenidos con patrones enriquecidos en matriz fueron aceptables para la determinación de residuos de macrólidos en miel según la normativa vigente.

El objetivo de este trabajo era desarrollar un método de análisis multiresiduo que resultara sencillo y rápido para el análisis legal rutinario de residuos de macrólidos en carne de cerdo. Un nuevo material absorbente, denominado Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE para extracción mejorada de matriz en lípidos (EMR—Lipid), permite extraer de forma selectiva los principales componentes lipídicos de las matrices de alto contenido en grasa, como la carne de cerdo, sin que ello conlleve pérdidas indeseadas de analitos. La extracción de interferencias lipídicas de matrices complejas ofrece muchas ventajas, como la reducción de los efectos de la matriz (que mejora la respuesta de masas) y la prolongación de la vida útil de las columnas para LC. La columna HPLC Poroshell 120 de partículas superficialmente porosas aporta gran velocidad y eficiencia, así como una baja retropresión.

En la tabla 1 se incluye información sobre los macrólidos.

Tabla 1. Macrólidos utilizados en este estudio (continúa en la página siguiente).

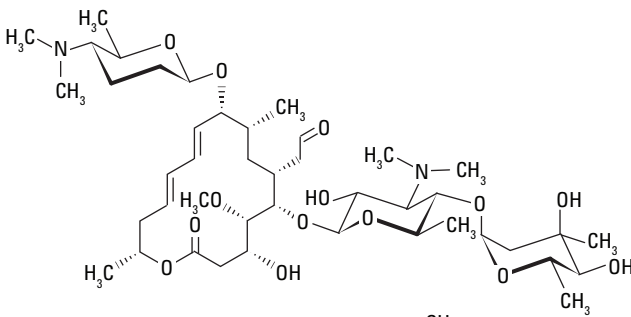
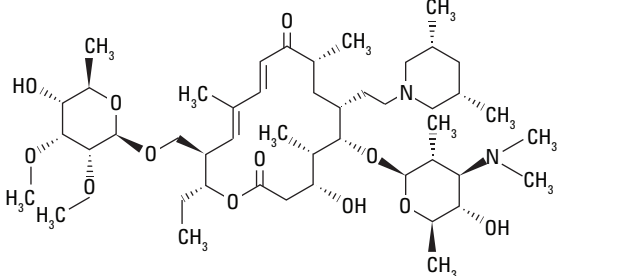
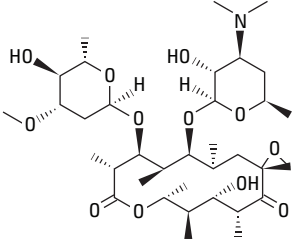
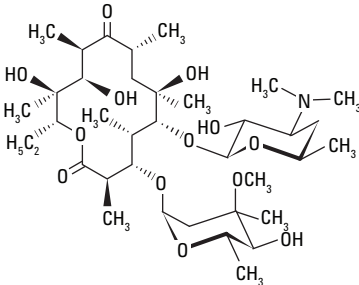
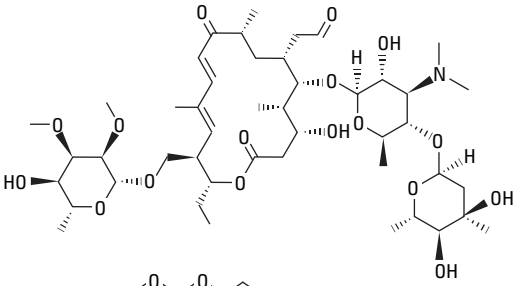
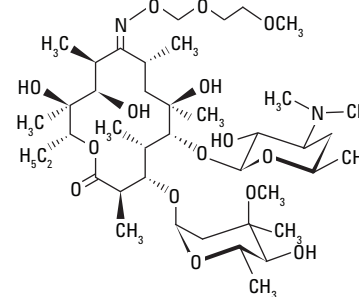
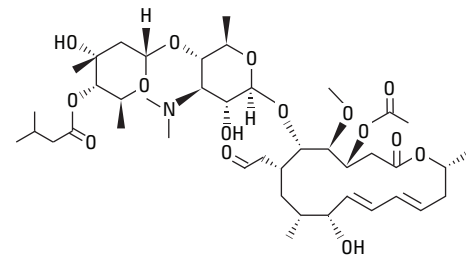
Compuesto	N.º CAS	Estructura
Espiramicina	8025-81-8	
Tilmicosina	108050-54-0	

Tabla 1. Macrólidos utilizados en este estudio.

Compuesto	N.º CAS	Estructura
Oleandomicina	3922-90-5	 <p>The structure of Oleandomycin consists of a 14-membered macrolide ring with a 16-membered ketide ring fused to it. It features a dimethylamino group, a methyl group, and several hydroxyl groups on the macrolide ring, and a methyl group, a hydroxyl group, and a methyl ketide group on the ketide ring.</p>
Eritromicina	114-07-8	 <p>The structure of Erythromycin features a 14-membered macrolide ring with a 13-membered ketide ring. It has a dimethylamino group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a methyl group, a hydroxyl group, and a methyl ketide group on the ketide ring.</p>
Tilosina	1401-69-0	 <p>The structure of Tilosin consists of a 14-membered macrolide ring with a 16-membered ketide ring. It features a dimethylamino group, a methyl group, and several hydroxyl groups on the macrolide ring, and a methyl group, a hydroxyl group, and a methyl ketide group on the ketide ring.</p>
Roxitromicina	80214-83-1	 <p>The structure of Roxithromycin features a 14-membered macrolide ring with a 13-membered ketide ring. It has a dimethylamino group, a methyl group, and a hydroxyl group on the macrolide ring, and a methyl group, a hydroxyl group, and a methyl ketide group on the ketide ring.</p>
Josamicina	16846-24-5	 <p>The structure of Josamycin consists of a 14-membered macrolide ring with a 16-membered ketide ring. It features a dimethylamino group, a methyl group, and several hydroxyl groups on the macrolide ring, and a methyl group, a hydroxyl group, and a methyl ketide group on the ketide ring.</p>

Materiales y métodos

Reactivos y sustancias químicas

Todos los reactivos y disolventes fueron de calidad MS, HPLC o analítica. El acetonitrilo y el agua utilizados fueron de Honeywell International, Inc. Los patrones se adquirieron a Dr. Ehrenstorfer (Augsburgo, Alemania). La carne de cerdo se compró en un supermercado local. Las disoluciones patrón (1,0 mg/ml) se prepararon individualmente en metanol y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se preparó una disolución de trabajo combinada en acetonitrilo y agua (en proporción 20:80), que también se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las disoluciones enriquecidas se prepararon a diario mediante la correspondiente dilución con agua de la disolución de trabajo combinada.

Equipo y materiales

- Sistema LC Agilent 1290 Infinity.
- Sistema LC/MS Agilent 6460 de triple cuadrupolo con ionización por electrospray.
- Kit de extracción Agilent Bond Elut QuEChERS, método EN (ref. 5982-5650).
- Kit Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE para extracción mejorada de matriz en lípidos (EMR—Lipid) (ref. 5982-1010).
- Kit de pulido final Agilent Bond Elut QuEChERS para extracción mejorada de matriz en lípidos (EMR—Lipid) (ref. 5982-0101).
- Columna Agilent Poroshell 120 EC-C18, $3,0 \times 100\text{ mm}$, $2,7\text{ }\mu\text{m}$ (ref. 695975-302).
- Centrifuga Eppendorf 5810 R (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EE. UU.).
- Mezclador vórtex digital (VWR International, LLC, Radnor, Pensilvania, EE. UU.).

Preparación de muestras

El procedimiento final de preparación de muestras se optimizó con las siguientes etapas.

1. Pesaje de 2,5 g ($\pm 0,1\text{ g}$) de carne de cerdo homogénea en un tubo de centrifuga de 50 ml.
2. Adición de 8 ml de agua y agitación de la mezcla en el mezclador vórtex durante 1 min.
3. Adición de 10 ml de acetonitrilo.
4. Adición de las sales del kit de extracción QuEChERS, método EN.
5. Mezcla de la muestra mediante agitación durante 1 min.
6. Centrifugación a 4.000 rpm durante 5 min.
7. Adición de 5 ml de agua a un tubo de dSPE EMR—Lipid de 15 ml.
8. Transferencia de 5 ml de sobrenadante a un tubo de dSPE EMR—Lipid.
9. Agitación inmediata de la muestra en el mezclador vórtex para su dispersión; a continuación, agitación en el mezclador vórtex durante 1 min.
10. Centrifugación a 4.000 rpm durante 3 min.
11. Transferencia de 5 ml de sobrenadante a un tubo de pulido final EMR—Lipid de 15 ml que contenga 2 g de sales (NaCl y MgSO_4 , en proporción 1:4), y agitación en el mezclador vórtex durante 1 min.
12. Centrifugación a 4.000 rpm durante 3 min.
13. Combinación de 200 μl de la capa sobrenadante de ACN con 800 μl de agua en un vial de muestras de 2 ml y agitación en el mezclador vórtex.

Condiciones del HPLC

Columna:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, $3,0 \times 100\text{ mm}$, $2,7\text{ }\mu\text{m}$ (ref. 695975-302)
Fase móvil:	A: acetato de amonio 10 mM y ácido fórmico al 0,1 % en agua B: acetonitrilo
Vol. iny.:	2 μl
Flujo:	0,5 ml/min
Gradiente:	Tiempo (min) % B
	0 20
	5 65
	6 65
	8 20
Temperatura:	30 $^{\circ}\text{C}$

Condiciones del MS

Los macrólidos se monitorizaron en modo positivo. En la tabla 2 se muestran los datos de la monitorización de reacciones múltiples.

Parámetros de la fuente MS

Temp. gas:	300 $^{\circ}\text{C}$
Flujo de gas:	5 l/min
Nebulizador:	45 psi
Temp. del gas de focalización:	400 $^{\circ}\text{C}$
Flujo de gas de focalización:	11 l/min
Tensión de la boquilla:	Positiva, 0 V
Capilar:	Positiva, 4.000 V

Tabla 2. Masas controladas mediante la monitorización de reacciones múltiples.

Compuesto	Ión precursor	Ión producto	Fragmentador (V)	Energía de colisión (V)	Tiempo de retención (min)
Espiramicina	843,4	540,0	270	35	2,178
Espiramicina	843,4	174,1	270	40	2,178
Tilmicosina	869,5	696,4	320	44	2,749
Tilmicosina	869,5	174,1	320	49	2,749
Oleandomicina	688,3	544,3	170	15	2,99
Oleandomicina	688,3	158,2	170	25	2,99
Eritromicina	734,4	576,3	180	14	3,204
Eritromicina	734,4	158,2	180	30	3,204
Tilosina	916,4	772,4	280	30	3,421
Tilosina	916,4	174,2	280	40	3,421
Roxitromicina	837,4	679,3	200	16	4,087
Roxitromicina	837,4	158,1	200	34	4,087
Josamicina	828,4	174,1	250	35	4,461
Josamicina	828,4	109,1	250	46	4,461

Resultados y comentarios

Linealidad y límite de detección

Las disoluciones utilizadas para crear curvas de calibración externas se prepararon a partir de una disolución de trabajo combinada para conseguir blancos de matriz enriquecidos (5, 10, 20, 50 y 250 µg/kg). Los blancos de matriz se obtuvieron haciendo pasar la carne de cerdo por el procedimiento completo, incluidas las etapas de pretratamiento y preparación con el kit QuEChERS. Los datos de los límites de detección (LOD) se calcularon con una relación señal-ruido (S/N) igual a 3 mediante la inyección de la matriz de carne de cerdo enriquecida con una concentración de 0,1 µg/kg. La proporción de todas las relaciones S/N fue superior a 3:1. Por lo tanto, todos los límites de detección de estos compuestos fueron inferiores a 0,1 µg/kg y cumplieron los requisitos del método legal. En la tabla 3 se muestran los resultados de las curvas de calibración.

Tabla 3. Datos de linealidad de macrólidos en carne de cerdo.

Compuesto	Ecuación de regresión	R ²
Espiramicina	Y = 386,144x + 19,317	0,9994
Tilmicosina	Y = 133,272x + 8,018	0,9999
Oleandomicina	Y = 317,284x + 43,963	0,9998
Eritromicina	Y = 848,506x + 119,918	0,9996
Tilosina	Y = 274,158x + 22,703	0,9997
Roxitromicina	Y = 477,739x + 53,019	0,9997
Josamicina	Y = 625,922x + 58,918	0,9998

Recuperación y reproducibilidad

La recuperación y la reproducibilidad del método se determinaron con tres niveles de enriquecimiento de las muestras de carne de cerdo a concentraciones de 10, 20 y 100 µg/kg, con seis réplicas en cada nivel. En la tabla 4 se muestran los datos de recuperación y reproducibilidad. Asimismo, en la figura 1 se muestran los cromatogramas de los extractos de carne de cerdo enriquecidos de 20 µg/kg.

Tabla 4. Recuperaciones y reproducibilidad del análisis de macrólidos en carne de cerdo (n = 6).

Compuesto	Concentración (µg/kg)	Recuperación (%)	DER (%)
Espiramicina	10	89,7	10,3
	20	94,0	8,3
	100	95,2	3,8
Tilmicosina	10	98,4	9,5
	20	90,0	9,7
	100	95,3	7,1
Oleandomicina	10	92,4	5,7
	20	96,4	7,1
	100	97,5	6,2
Eritromicina	10	64,5	8,8
	20	63,9	8,1
	100	68,7	5,1
Tilosina	10	84,1	10,2
	20	93,3	7,4
	100	94,6	5,5
Roxitromicina	10	89,9	9,8
	20	91,6	7,7
	100	92,6	5,1
Josamicina	10	87,9	7,4
	20	92,4	5,6
	100	93,2	4,9

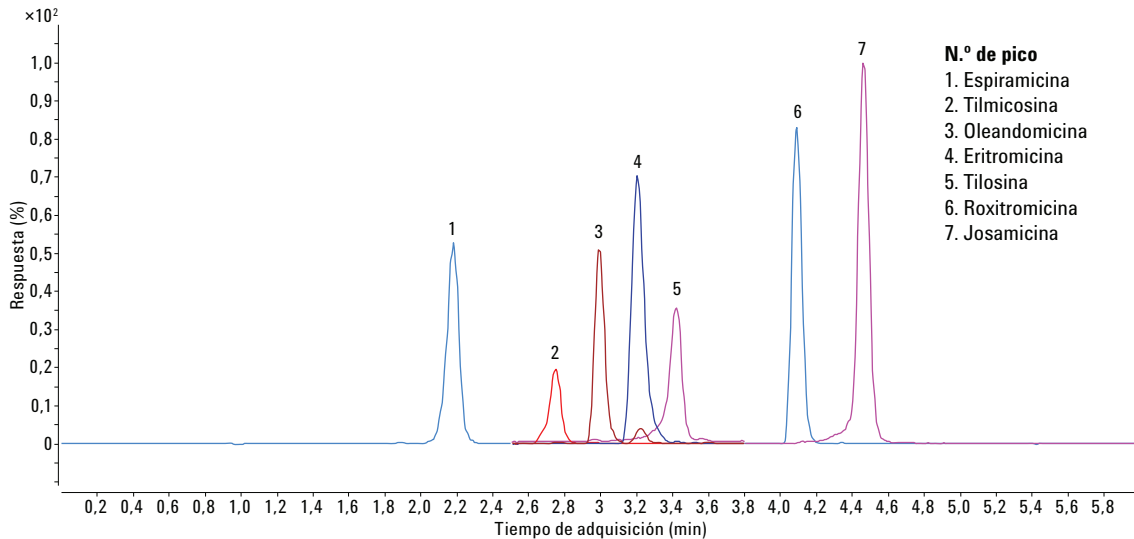


Figura 1. Cromatogramas de extractos de carne de cerdo enriquecidos con una concentración de 20 µg/kg.

Conclusiones

El método descrito en esta nota de aplicación es fiable, rápido y robusto para realizar la cuantificación y la confirmación simultáneas de macrólidos en carne de cerdo. Los kits EMR—Lipid y de pulido final consiguen una excelente limpieza de la matriz y permiten extraer la mayor parte de esta (sobre todo lípidos) sin que eso afecte de forma importante a la recuperación de analitos. La columna Agilent Poroshell 120 EC-C18 ofrece una separación rápida de varios macrólidos con formas simétricas de los picos y una alta sensibilidad.

Referencias

1. Anón. GB/T 23408-2009. *Determination of macrolides residues in honey – LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.
2. SN/T 1777.2-2007. *Determination of macrolide antibiotic residues in animal-derived food – part 2: LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Beijing, China.
3. Chen-Hao Zhai y Rong-jie Fu. *Macrolides in Honey Using Agilent Bond Elut Plexa SPE, Poroshell 120, and LC/MS/MS*. Application note, Agilent Technologies, Inc. Publication number 5991-3190EN, 2013.

Más información

Estos datos representan resultados típicos. Si desea obtener más información sobre nuestros productos y servicios, visite nuestra página web www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

Agilent no se hace responsable de ningún error incluido en este documento ni de ningún daño incidental o consecuencial relacionado con la distribución, la aplicación o el uso de este material.

La información, las descripciones y las especificaciones de esta publicación están sujetas a modificación sin previo aviso.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
 Impreso en EE. UU.
 12 de noviembre de 2015
 5991-6442ES



Agilent Technologies