

# Analyse de macrolides dans du porc avec Bond Elut QuEChERS dSPE EMR - Lipid et Poroshell 120

## Note d'application

Agriculture et analyse alimentaire

### Auteurs

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

### Extrait

Cette note d'application décrit l'utilisation d'une approche de préparation des échantillons rapide, facile, bon marché, efficace, robuste et sûre (QuEChERS) pour l'extraction de sept résidus de macrolides dans du porc. Nous avons analysé des résidus de spiramycine, tilmicosine, oléandomycine, érythromycine, tylosine, roxithromycine et josamycine. Les composés ont été extraits avec Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE EMR - Lipid (élimination améliorée de la matrice lipidique), et séparés sur une colonne HPLC Agilent Poroshell 120 EC-C18. La quantification a été obtenue par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem avec source d'ionisation electrospray (LC/MS/MS) effectuée en mode MRM (multiple reaction monitoring) positif. La méthode présente des limites de détection basses pour tous les macrolides présents dans le porc. Les plages d'étalonnage dynamique pour ces composés étaient de 5 à 250 µg/kg. Le rendement global allait de 63,9 à 98,4 %, avec des valeurs de RSD comprises entre 3,8 et 10,3 %.



**Agilent Technologies**

## Introduction

L'utilisation d'antibiotiques dans la production d'aliments d'origine animale présente des avantages pour l'industrie agroalimentaire. Cependant, leur utilisation donne lieu à certaines préoccupations en termes de sécurité sanitaire chez l'homme et l'animal.

Les macrolides sont un groupe d'antibiotiques qui ont été utilisés pour traiter de nombreuses infections respiratoires et entériques d'origine bactérienne chez l'animal. Parmi les macrolides communément utilisés, on compte la spiramycine, la tilmicosine, l'oléandomycine, l'érythromycine, la tylosine, la roxithromycine et la josamycine.

Les agences nationales et les organisations internationales ont établi des limites réglementaires concernant la concentration de résidus d'antibiotiques dans les aliments d'origine animale [1,2]. Les limites de résidus réglementaires varient de zéro à 15 mg/kg. Une application a déjà été développée pour analyser la présence de traces de macrolides dans le miel [3]. La méthode utilisait des cartouches Agilent Bond Elut Plexa pour la préparation des échantillons et une colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 pour la séparation. Le rendement et la reproductibilité obtenus pour des échantillons de matrice enrichie avec des étalons étaient en conformité avec la réglementation pour la détermination des résidus de macrolides dans du miel.

Le but de ce travail était de développer une méthode d'analyse multi-résidus qui serait simple et rapide pour l'analyse réglementaire de routine de résidus de macrolides dans du porc. Le nouveau support, Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE EMR - Lipid, élimine sélectivement les principaux lipides des matrices grasses, telles que le porc, sans perte indésirable des composés d'intérêt. L'élimination des interférences lipidiques dans les matrices complexes présente de nombreux avantages, allant de la réduction de l'effet-matrice à l'augmentation de la réponse en spectrométrie de masse en passant par la prolongation de la durée de vie des colonnes LC. La colonne HPLC Poroshell 120 à particules superficiellement poreuses offre une grande rapidité et une haute efficacité avec une faible contre-pression.

Le tableau 1 fournit des informations détaillées sur les macrolides.

Tableau 1. Macrolides utilisés dans cette étude (suite page suivante).

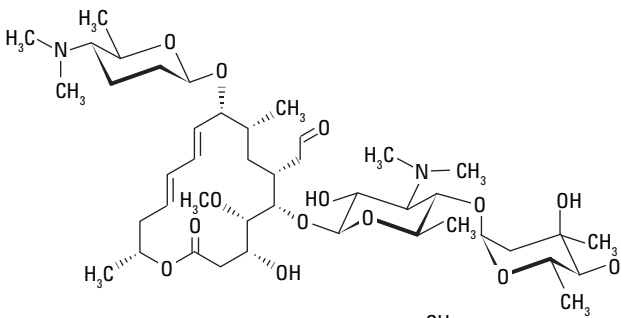
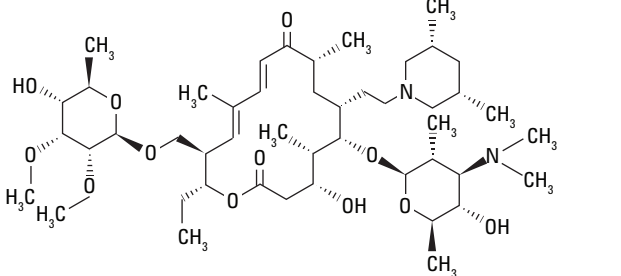
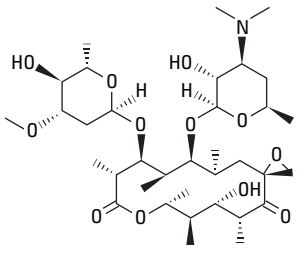
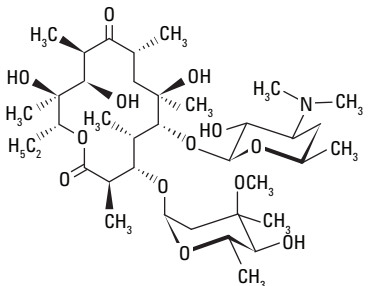
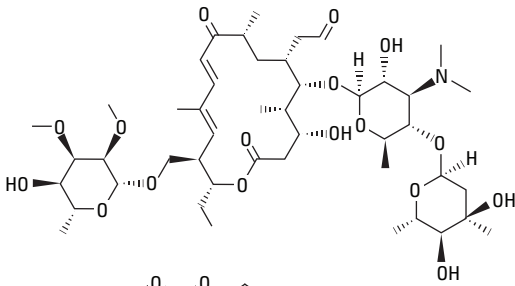
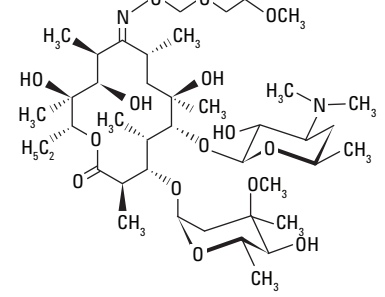
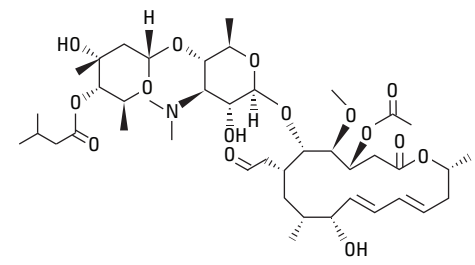
Composé	N° CAS	Structure
Spiramycine	8025-81-8	 The chemical structure of Spiramycin is a complex macrolide. It features a central 14-membered macrolide ring with a double bond and a methyl group. Attached to this ring are several side chains: a trimethylammonium group, a methyl group, a methoxy group, a hydroxyl group, and a complex sugar moiety consisting of a glucose unit linked to a rhamnose unit, which is further substituted with a trimethylammonium group and a methyl group.
Tilmicosine	108050-54-0	 The chemical structure of Tilmicosin is a 14-membered macrolide. It has a central ring with a double bond and a methyl group. The structure is highly substituted with multiple methyl groups, hydroxyl groups, and a trimethylammonium group. It also features a complex sugar moiety with a glucose unit and a rhamnose unit, both substituted with methyl groups.

Tableau 1. Macrolides utilisés dans cette étude.

Composé	N° CAS	Structure
Oléandomycine	3922-90-5	
Érythromycine	114-07-8	
Tylosine	1401-69-0	
Roxithromycine	80214-83-1	
Josamycine	16846-24-5	

## Équipements et méthodes

### Réactifs et composés chimiques

Tous les réactifs sont de grade MS, HPLC ou analytique. L'acétonitrile et l'eau provenaient de Honeywell International, Inc. Les étalons ont été achetés auprès du Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Allemagne). Le porc a été acheté dans un supermarché local. Les solutions étalons mères (1,0 mg/mL) ont été élaborées individuellement dans du méthanol puis conservées à -20 °C. Une solution d'étalons combinés a été élaborée dans de l'acétonitrile:eau (20:80) et a également été conservée à -20 °C. Les solutions étalons ont ensuite été élaborées chaque jour par dilution appropriée de la solution combinée avec de l'eau.

### Équipements et matériaux

- LC Agilent 1290 Infinity
- Système LC/MS Agilent 6460 triple quadripôle à ionisation électrospray
- Kit d'extraction Agilent Bond Elut QuEChERS EN (Réf. 5982-5650)
- Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE EMR - Lipid (Réf. 5982-1010)
- Agilent Bond Elut QuEChERS Final Polish EMR - Lipid (Réf. 5982-0101)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 mm, 2,7 µm (Réf. 695975-302)
- Centrifugeuse Eppendorf 5810 R (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Mélangeur vortex numérique (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvanie, USA)

### Préparation d'échantillons

La procédure finale de préparation d'échantillons est optimisée avec les étapes suivantes :

1. Peser 2,5 g ( $\pm 0,1$  g) de porc homogénéisé dans un tube à centrifugeuse de 50 mL.
2. Ajouter 8 mL d'eau, agiter au vortex pendant 1 min.
3. Ajouter 10 mL d'acétonitrile.
4. Ajouter les sels du kit d'extraction QuEChERS EN.
5. Mélanger l'échantillon en agitant pendant 1 min.
6. Centrifuger à 4 000 rpm pendant 5 minutes.
7. Ajouter 5 mL d'eau à un tube dSPE EMR - Lipid de 15 mL.
8. Transférer 5 mL de surnageant au tube dSPE EMR - Lipid.
9. Agiter au vortex immédiatement pour disperser l'échantillon, puis agiter au vortex pendant 1 min.
10. Centrifuger à 4 000 rpm pendant 3 minutes.
11. Transférer 5 mL de surnageant dans un tube Final Polish EMR - Lipid de 15 mL contenant 2 g de sels (1:4, NaCl:MgSO<sub>4</sub>) et agiter au vortex pendant 1 min.
12. Centrifuger à 4 000 rpm pendant 3 minutes.
13. Mélanger 200 µL de surnageant et 800 µL d'eau dans un flacon d'échantillon de 2 mL et agiter au vortex.

### Conditions HPLC

Colonne :	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 mm, 2,7 µm (Réf. 695975-302)
Phase mobile :	A : acétate d'ammonium 10 mM et acide formique à 0,1 % dans de l'eau B : acétonitrile
Volume d'injection :	2 µL
Débit :	0,5 mL/min
Gradient :	Temps (min) %B
	0 20
	5 65
	6 65
	8 20
Temp. :	30 °C

### Conditions MS

Les macrolides ont été détectés en mode positif. Le tableau 2 montre les données détaillées en MRM.

### Paramètres de la source MS

Température de gaz :	300 °C
Débit du gaz :	5 L/min
Nébuliseur :	45 psi
Température du gaz de gainage :	400 °C
Débit de gaz de gainage :	11 L/min
Tension de la buse :	Positive, 0 V
Capillaire :	Positive, 4 000 V

Tableau 2. Masses détectées en MRM.

Composé	Ion précurseur	Ion fils	Fragmenteur (V)	Énergie de collision (V)	Temps de rétention
Spiramycine	843,4	540,0	270	35	2,178
Spiramycine	843,4	174,1	270	40	2,178
Tilmicosine	869,5	696,4	320	44	2,749
Tilmicosine	869,5	174,1	320	49	2,749
Oléandomycine	688,3	544,3	170	15	2,99
Oléandomycine	688,3	158,2	170	25	2,99
Érythromycine	734,4	576,3	180	14	3,204
Érythromycine	734,4	158,2	180	30	3,204
Tylosine	916,4	772,4	280	30	3,421
Tylosine	916,4	174,2	280	40	3,421
Roxithromycine	837,4	679,3	200	16	4,087
Roxithromycine	837,4	158,1	200	34	4,087
Josamycine	828,4	174,1	250	35	4,461
Josamycine	828,4	109,1	250	46	4,461

## Résultats et discussion

### Linéarité et limite de détection

Les solutions utilisées pour construire les courbes d'étalonnage externes ont été obtenues à partir de blancs de matrice enrichis à l'aide d'une solution d'étalons combinés (à hauteur de 5, 10, 20, 50 et 250 µg/kg). Les blancs de matrice ont été obtenus en faisant passer les échantillons de porc par toute la procédure, y compris le pré-traitement et les procédures QuEChERS. Les données de limite de détection (LDD) ont été calculées avec un rapport signal/bruit (S/B) de 3 en injectant la matrice de porc post-dopée à 0,1 µg/kg. Tous les rapports S/B étaient supérieurs à 3:1. Par conséquent, toutes les LDD pour ces composés étaient inférieures à 0,1 µg/kg et conformes à la méthode réglementaire. Le tableau 3 montre les résultats des courbes d'étalonnage.

Table 3. Linéarité des macrolides dans le porc.

Composé	Equation de régression	R <sup>2</sup>
Spiramycine	Y = 386,144x + 19,317	0,9994
Tilmicosine	Y = 133,272x + 8,018	0,9999
Oléandomycine	Y = 317,284x + 43,963	0,9998
Érythromycine	Y = 848,506x + 119,918	0,9996
Tylosine	Y = 274,158x + 22,703	0,9997
Roxithromycine	Y = 477,739x + 53,019	0,9997
Josamycine	Y = 625,922x + 58,918	0,9998

### Rendement et reproductibilité

Le rendement et la reproductibilité de la méthode ont été déterminés pour trois concentrations d'échantillons de porc dopés, à 10, 20 et 100 µg/kg, avec six répliques par concentration. Le tableau 4 montre les données de rendement et de reproductibilité. La figure 1 montre les chromatogrammes d'extraits de porc dopés à hauteur de 20 µg/kg.

Table 4. Rendement et reproductibilité des macrolides dans le porc (n = 6).

Composé	Niveau de dopage (µg/kg)	rendement (%)	RSD (%)
Spiramycine	10	89,7	10,3
	20	94,0	8,3
	100	95,2	3,8
Tilmicosine	10	98,4	9,5
	20	90,0	9,7
	100	95,3	7,1
Oléandomycine	10	92,4	5,7
	20	96,4	7,1
	100	97,5	6,2
Érythromycine	10	64,5	8,8
	20	63,9	8,1
	100	68,7	5,1
Tylosine	10	84,1	10,2
	20	93,3	7,4
	100	94,6	5,5
Roxithromycine	10	89,9	9,8
	20	91,6	7,7
	100	92,6	5,1
Josamycine	10	87,9	7,4
	20	92,4	5,6
	100	93,2	4,9

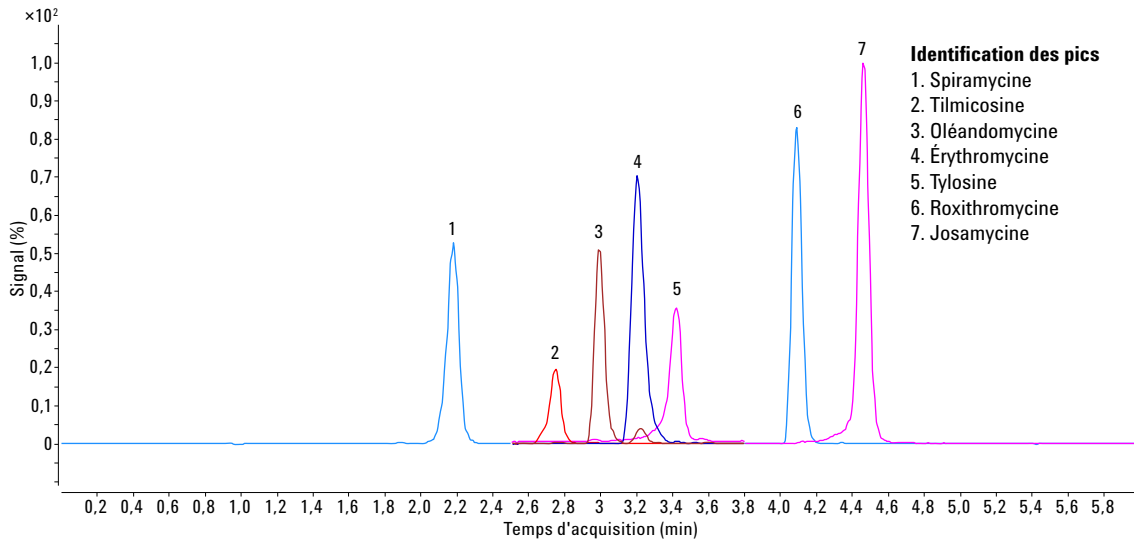


Figure 1. Chromatogramme d'un extrait d'échantillon de porc dopé à 20 µg/kg.

## Conclusions

La méthode décrite dans cette note d'application est fiable, rapide et robuste pour l'identification et la quantification simultanées de macrolides dans du porc. Le traitement par EMR - Lipid permet d'obtenir une meilleure purification de la matrice et d'éliminer la plupart des interférences, en particulier les lipides, sans affecter de manière significative le rendement des composés. La colonne Agilent Poroshell 120 EC-C18 offre une séparation rapide des différents macrolides avec des formes de pics symétriques et une sensibilité élevée.

## Références

1. Anon. GB/T 23408-2009. *Determination of macrolides residues in honey – LC-MS/MS method*. China Standard. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine, Pékin, Chine.
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, Pékin, Chine.
3. Chen-Hao Zhai, 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**.

## Pour plus d'informations

Ces données représentent des résultats types. Pour plus d'informations sur nos produits et services, consultez notre site Internet sur [www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem).

[www.agilent.com/chem](http://www.agilent.com/chem)

Agilent décline toute responsabilité en cas d'erreurs dans le présent document, ainsi qu'en cas de dommages fortuits ou consécutifs à la fourniture, aux performances ou à l'utilisation de ce matériel.

Les informations, descriptions et spécifications de cette publication peuvent être modifiées sans préavis.

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Imprimé aux États-Unis  
le 12 novembre 2015  
5991-6442FR



**Agilent Technologies**