

# Analisi di macrolidi in carne di maiale tramite Bond Elut QuEChERS dSPE EMR-Lipid e Poroshell 120

## Nota applicativa

Analisi alimentare e agricoltura

### Autori

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

### Abstract

La presente nota applicativa descrive l'uso di un approccio rapido, semplice, economico, efficace, solido e sicuro alla preparazione del campione (QuEChERS) per l'estrazione e la purificazione di sette residui di macrolidi in carne di maiale. Sono stati analizzati i residui di spiramicina, tilmicosina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, roxitromicina e josamicina. L'estrazione degli analiti è stata eseguita tramite Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal-Lipid e la separazione su una colonna per HPLC Agilent Poroshell 120 EC-C18. La quantificazione è stata effettuata tramite cromatografia liquida accoppiata a spettrometria di massa tandem con ionizzazione elettrospray (LC/MS/MS) in ionizzazione positiva e modalità MRM (Multiple Reaction Monitoring). Il metodo ha permesso di ottenere bassi limiti di rivelazione per tutti i macrolidi nella carne di maiale. Gli intervalli di calibrazione dinamici ottenuti per i composti in analisi sono compresi tra 5 e 250 µg/kg. I recuperi complessivi variano tra 63,9 e 98,4%, con valori RSD compresi tra 3,8 e 10,3%.



**Agilent Technologies**

## Introduzione

L'impiego di antibiotici nell'industria alimentare animale si è tradotto in una serie di vantaggi per l'intero settore alimentare. Al tempo stesso, il loro uso ha sollevato timori in merito alla sicurezza per la salute degli animali e dell'uomo. I macrolidi sono una classe di antibiotici ampiamente utilizzati per trattare svariate infezioni batteriche enteriche e respiratorie negli animali. I macrolidi utilizzati con maggiore frequenza includono la spiramicina, la tilmicosina, l'oleandomicina, l'eritromicina, la tilosina, la roxitromicina e la josamicina.

Agenzie nazionali e organizzazioni internazionali hanno fissato limiti normativi relativi alle concentrazioni di residui di antibiotici negli alimenti di origine animale [1,2]. I limiti previsti dalle normative variano tra zero e 15 mg/kg. In precedenza era già stata sviluppata un'applicazione per l'analisi a livello di tracce di residui di macrolidi nel miele [3]. Tale metodo impiegava il prodotto Agilent Bond Elut Plexa per la preparazione del campione e una colonna Agilent Poroshell 120 EC-C18 per la separazione. I risultati in termini di recupero e riproducibilità in base a standard di matrici arricchite erano accettabili per la determinazione di residui di macrolidi nel miele ai sensi delle normative vigenti.

L'obiettivo di questo lavoro consisteva nello sviluppo di un metodo multiresiduale sufficientemente rapido e semplice per le analisi di routine di residui di macrolidi soggetti a normativa nella carne di maiale. L'innovativo materiale adsorbente Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal-Lipid rimuove in modo selettivo i principali componenti lipidici da matrici ad alto contenuto di grassi, come la carne di maiale, senza perdita indesiderata di analiti. La rimozione delle interferenze lipidiche da matrici complesse presenta numerosi vantaggi, dalla riduzione dell'effetto matrice all'aumento della risposta di massa, oltre a prolungare la durata utile delle colonne per LC. La colonna per HPLC Poroshell 120 con particelle porose in superficie permette di ottenere velocità ed efficienza elevate a bassi valori di contropressione.

In Tabella 1 sono riportate informazioni dettagliate sui macrolidi.

Tabella 1. Macrolidi utilizzati nel presente studio (continua alla pagina successiva).

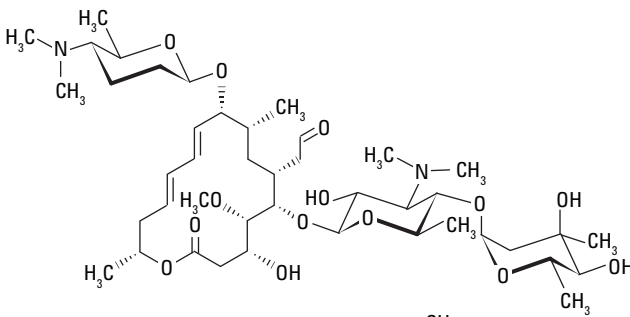
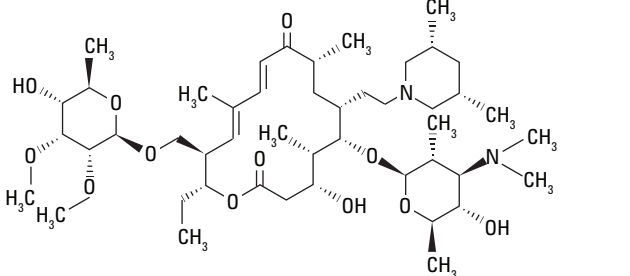
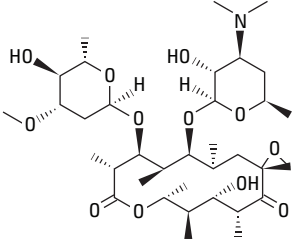
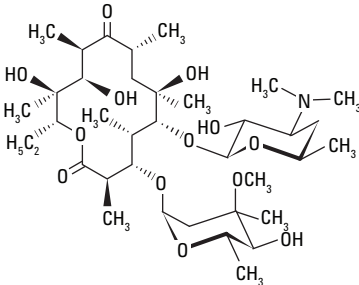
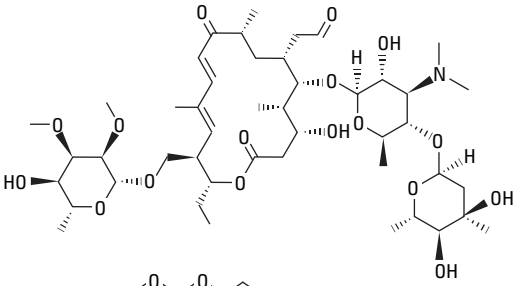
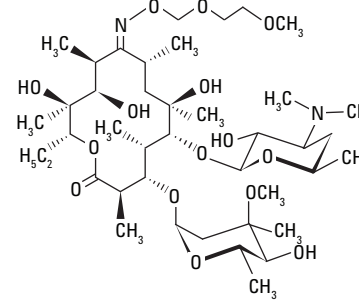
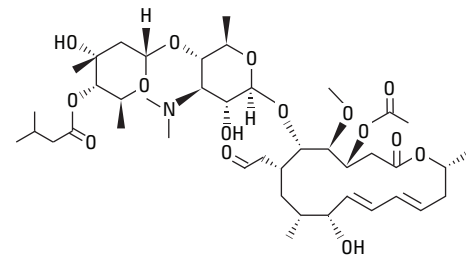
Composto	N. CAS	Struttura
Spiramicina	8025-81-8	
Tilmicosina	108050-54-0	

Tabella 1. Macrolidi utilizzati nel presente studio.

Composto	N. CAS	Struttura
Oleandomicina	3922-90-5	 The structure of Oleandomycin features a 14-membered macrolide ring with a 16-membered ketone ring fused to it. It has a dimethylamino group and a methyl group on the macrolide ring, and a methyl group on the ketone ring. Two glucose units are attached to the macrolide ring via glycosidic bonds.
Eritromicina	114-07-8	 The structure of Erythromycin consists of a 14-membered macrolide ring and a 14-membered ketone ring. It has a dimethylamino group and a methyl group on the macrolide ring, and a methyl group on the ketone ring. Two glucose units are attached to the macrolide ring via glycosidic bonds.
Tilosina	1401-69-0	 The structure of Tilosin features a 14-membered macrolide ring and a 16-membered ketone ring. It has a dimethylamino group and a methyl group on the macrolide ring, and a methyl group on the ketone ring. Two glucose units are attached to the macrolide ring via glycosidic bonds.
Roxitromicina	80214-83-1	 The structure of Roxithromycin is similar to Erythromycin, with a 14-membered macrolide ring and a 14-membered ketone ring. It has a dimethylamino group and a methyl group on the macrolide ring, and a methyl group on the ketone ring. Two glucose units are attached to the macrolide ring via glycosidic bonds.
Josamicina	16846-24-5	 The structure of Josamycin features a 14-membered macrolide ring and a 16-membered ketone ring. It has a dimethylamino group and a methyl group on the macrolide ring, and a methyl group on the ketone ring. Two glucose units are attached to the macrolide ring via glycosidic bonds.

## Materiali e metodi

### Reagenti e sostanze chimiche

Tutti i reagenti erano di grado MS, HPLC o analitico. Acetonitrile e acqua sono stati acquistati da Honeywell International, Inc. Gli standard sono stati acquistati presso il Dott. Ehrenstorfer (Augsburg, Germania). La carne di maiale è stata acquistata presso un supermercato locale. Le soluzioni degli standard (1,0 mg/mL) sono state preparate separatamente in metanolo e stoccate a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . È stata preparata una soluzione di lavoro combinata in acetonitrile:acqua (20:80), stoccata a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le soluzioni arricchite sono state quindi preparate ogni giorno diluendo in misura opportuna con acqua la soluzione di lavoro combinata.

### Apparecchiature e materiali

- Sistema LC Agilent 1290 Infinity
- Sistema LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 con ionizzazione elettrospray
- Kit di estrazione Agilent Bond Elut QuEChERS EN (codice 5982-5650)
- Agilent Bond Elut QuEChERS dSPE Enhanced Matrix Removal-Lipid (codice 5982-1010)
- Agilent Bond Elut QuEChERS Final Polish for Enhanced Matrix Removal-Lipid (codice 5982-0101)
- Colonna Agilent Poroshell 120 EC-C18,  $3,0 \times 100\text{ mm}$ ,  $2,7\text{ }\mu\text{m}$  (codice 695975-302)
- Centrifuga Eppendorf 5810 R (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA)
- Miscelatore vortex digitale (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, USA)

### Preparazione del campione

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

1. Pesare 2,5 g ( $\pm 0,1\text{ g}$ ) di carne di maiale omogeneizzata in un tubo per centrifuga da 50 mL.
2. Aggiungere 8 mL di acqua e agitare in vortex per 1 min.
3. Aggiungere 10 mL di acetonitrile.
4. Aggiungere i sali del metodo del kit di estrazione QuEChERS EN.
5. Miscelare il campione agitando per 1 min.
6. Centrifugare a 4.000 giri/min per 5 min.
7. Aggiungere 5 mL di acqua a un tubo dSPE EMR-Lipid da 15 mL.
8. Trasferire 5 mL di soprannatante al tubo dSPE EMR-Lipid.
9. Agitare in vortex immediatamente per disperdere il campione, quindi agitare in vortex per 1 min.
10. Centrifugare a 4.000 giri/min per 3 min.
11. Trasferire 5 mL di soprannatante in un tubo di purificazione per EMR-Lipid da 15 mL contenente 2 g di sali ( $1:4\text{ NaCl:MgSO}_4$ ) e agitare in vortex per 1 min.
12. Centrifugare a 4.000 giri/min per 3 min.
13. Aggiungere 200  $\mu\text{L}$  di strato superiore di acetonitrile a 800  $\mu\text{L}$  di acqua in un vial da 2 mL e agitare in vortex.

### Condizioni dell'HPLC

Colonna:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, $3,0 \times 100\text{ mm}$ , $2,7\text{ }\mu\text{m}$ (codice 695975-302)	
Fase mobile:	A: acetato di ammonio 10 mM e acido formico 0,1% in acqua B: acetonitrile	
Volume di iniezione:	2 $\mu\text{L}$	
Flusso:	0,5 mL/min	
Gradiente:	Tempo (min)	%B
	0	20
	5	65
	6	65
	8	20
Temperatura:	30 $^{\circ}\text{C}$	

### Condizioni MS

Il monitoraggio dei macrolidi è stato eseguito in modalità positiva. In Tabella 2 sono riportate informazioni dettagliate sui parametri MRM.

### Parametri della sorgente MS

Temperatura del gas:	300 $^{\circ}\text{C}$
Flusso di gas:	5 L/min
Nebulizzatore:	45 psi
Temperatura dello sheath gas:	400 $^{\circ}\text{C}$
Flusso dello sheath gas:	11 L/min
Tensione ugello:	Positiva, 0 V
Capillare:	Positiva, 4.000 V

Tabella 2. Masse monitorate in MRM (Multiple Reaction Monitoring).

Composto	Ione precursore	Ione prodotto	Fragmentor (V)	Energia di collisione (V)	Tempo di ritenzione (min)
Spiramicina	843,4	540,0	270	35	2,178
Spiramicina	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

## Risultati e discussione

### Linearità e limite di rivelazione

Le soluzioni utilizzate per generare le curve di calibrazione esterna sono state preparate a partire da una soluzione di lavoro combinata per arricchire matrici in bianco (5, 10, 20, 50 e 250 µg/kg). Le matrici in bianco sono state ottenute sottoponendo la carne di maiale all'intera procedura, inclusi il pretrattamento e le procedure QuEChERS. I dati relativi ai limiti di rivelazione (LOD) sono stati calcolati con un valore del rapporto segnale-rumore (S/N) pari a 3, iniettando la matrice di carne di maiale post-aricchita a 0,1 µg/kg. Tutti i rapporti S/N sono risultati superiori a 3:1. Pertanto, tutti i valori LOD per i composti in analisi sono risultati inferiori a 0,1 µg/kg e conformi al metodo regolamentato. In Tabella 3 sono riportati i risultati per le curve di calibrazione.

Tabella 3. Linearità delle rette di calibrazione dei macrolidi in carne di maiale.

Composto	Equazione di regressione	R <sup>2</sup>
Spiramicina	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

### Recupero e riproducibilità

Recupero e riproducibilità del metodo sono stati determinati su campioni di carne di maiale a tre livelli di arricchimento con concentrazioni pari rispettivamente a 10, 20 e 100 µg/kg e sei repliche per ciascun livello. In Tabella 4 sono riportati i dati relativi a recupero e riproducibilità. In Figura 1 sono mostrati i cromatogrammi di estratti di carne di maiale al livello di arricchimento di 20 µg/kg.

Tabella 4. Recupero e riproducibilità dei macrolidi in carne di maiale (n = 6).

Composto	Livello di arricchimento (µg/kg)	Recupero (%)	RSD (%)
Spiramicina	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

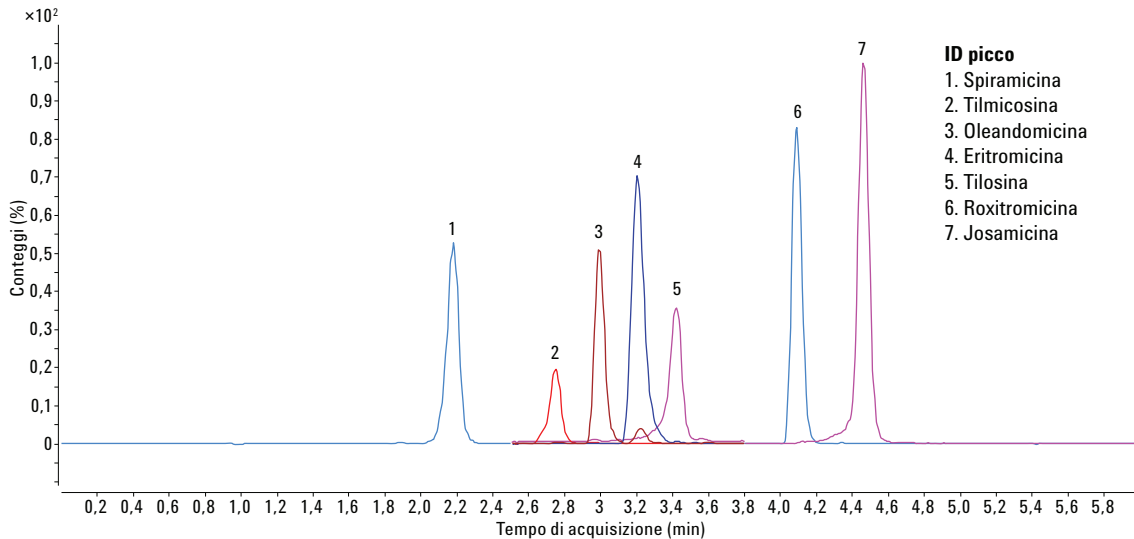


Figura 1. Cromatogramma di un estratto di un campione di carne di maiale arricchito a 20 µg/kg.

## Conclusioni

Il metodo descritto nella presente nota applicativa è affidabile, rapido ed efficace ai fini di una conferma e quantificazione di macrolidi in carne di maiale. Il prodotto EMR-Lipid and Polish offre una purificazione della matrice superiore e rimuove la maggior quantità di interferenti, in particolare i lipidi, senza alterare in modo significativo il recupero degli analiti. La colonna Agilent Poroshell 120 EC-C18 permette la separazione rapida di più macrolidi garantendo al tempo stesso simmetria dei picchi e alta sensibilità.

## Bibliografia

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, Pechino, Cina.
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, Pechino, Cina.
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**.

## Ulteriori informazioni

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

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

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

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

© Agilent Technologies, Inc., 2015  
Stampato negli Stati Uniti  
12 novembre 2015  
5991-6442ITE



**Agilent Technologies**