

Análise de macrolídeos em carne de porco usando dSPE Bond Elut QuEChERS EMR—Lipídios e Poroshell 120

Nota de aplicação

Testes de alimentos e agricultura

Autores

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

Resumo

Esta nota de aplicação descreve o uso de uma abordagem de preparo de amostras rápida, fácil, de baixo custo, efetiva, robusta e segura (QuEChERS) para a extração e a limpeza de sete resíduos de macrolídeos em carne de porco. Analisamos resíduos de espiramicina, tilmicosina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, roxitromicina e josamicina. Os analitos foram extraídos com a remoção de matrizes otimizada—Lipídios dSPE Agilent Bond Elut QuEChERS e separados em uma coluna de HPLC Agilent Poroshell 120 EC-C18. A quantificação foi obtida por cromatografia líquida associada à espectrometria de massas tandem de ionização de eletrospray (LC/MS/MS) operada no modo de monitoramento de reações múltiplas de íon positivo. O método proporcionou limites baixos de detecção para todos os macrolídeos em carne de porco. As faixas lineares de calibração para esses compostos foram obtidas de 5 a 250 µg/kg. As recuperações gerais variaram de 63,9 a 98,4%, com valores de RSD entre 3,8 e 10,3%.



Agilent Technologies

Introdução

O uso de antibióticos na produção de alimentos de origem animal gerou benefícios em todo o setor alimentício. No entanto, o uso dessas substâncias causou preocupações em relação à saúde de animais e humanos. Os macrolídeos são um grupo de antibióticos amplamente utilizados para tratar infecções respiratórias e entéricas em animais. Espiramicina, tilmicosina, oleandomicina, eritromicina, tilosina, roxitromicina e josamicina são alguns dos macrolídeos utilizados com mais frequência.

Agências nacionais e órgãos internacionais determinaram limites regulatórios em relação às concentrações de resíduos de antibióticos em alimentos de origem animal [1,2]. Os limites de resíduos permitidos variam de 0 a 15 mg/kg. Uma aplicação foi desenvolvida anteriormente para a análise de macrolídeos em nível de traços no mel [3]. O método usou o Agilent Bond Elut Plexa para o preparo de amostras e uma coluna Agilent Poroshell 120 EC-C18 para a separação. A recuperação e os resultados de reprodutibilidade com base em padrões com adição de matriz foram aceitáveis para a determinação de resíduos de macrolídeos no mel de acordo com a norma.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método multirresíduos simples e rápido para a análise regulatória de rotina de resíduos de macrolídeos em carne de porco. A remoção de matrizes otimizada—Lípidios dSPE Agilent Bond Elut QuEChERS, um novo material sorbente, remove de forma seletiva os principais componentes lipídicos de matrizes com alto teor de gordura, como a carne de porco, sem a indesejada perda de analitos. A remoção de interferências lipídicas de matrizes complexas tem muitas vantagens, como a redução do efeito de matriz e o aumento da massa de resposta, além de ajudar a prolongar a vida útil das colunas de LC. A coluna com partícula superficialmente porosa de HPLC Poroshell 120 fornece alta velocidade e eficiência com baixa contraressão.

A Tabela 1 mostra detalhes dos macrolídeos.

Tabela 1. Compostos de macrolídeo usados nesse estudo (continua na próxima página).

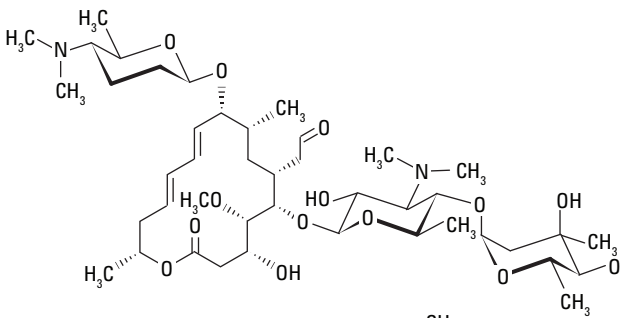
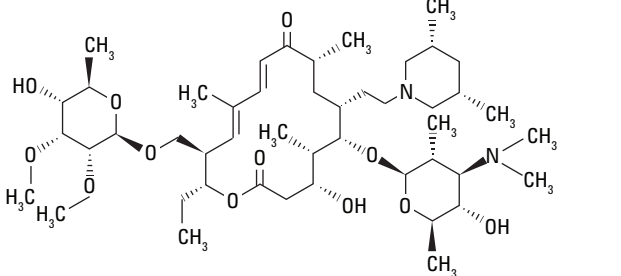
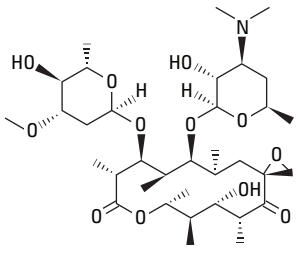
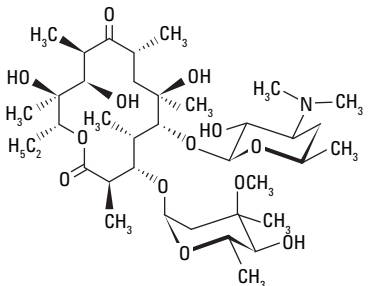
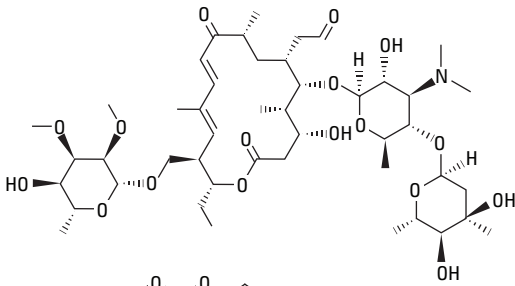
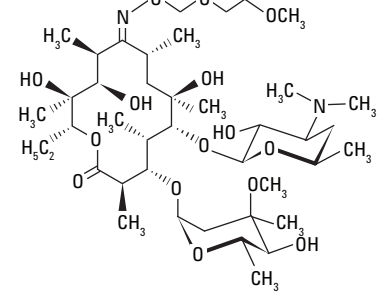
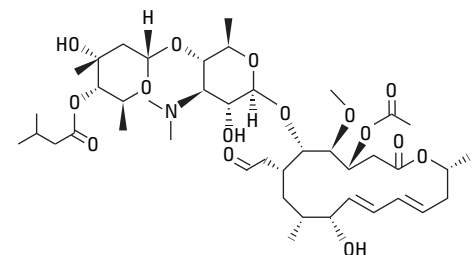
Composto	CAS No.	Estrutura
Espiramicina	8025-81-8	 The chemical structure of Spiramicin is a complex macrolide. It features a central 14-membered macrolide ring with a methyl group at C-12 and a methyl ester at C-13. Attached to the ring are a 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxy-4-hydroxymethyl-1,3-dioxane ring at C-14, a 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxy-4-hydroxymethyl-1,3-dioxane ring at C-15, and a 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxy-4-hydroxymethyl-1,3-dioxane ring at C-16. The structure is highly symmetrical and contains multiple hydroxyl and methyl groups.
Tilmicosina	108050-54-0	 The chemical structure of Tilmicosin is a complex macrolide. It features a central 14-membered macrolide ring with a methyl group at C-12 and a methyl ester at C-13. Attached to the ring are a 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxy-4-hydroxymethyl-1,3-dioxane ring at C-14, a 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxy-4-hydroxymethyl-1,3-dioxane ring at C-15, and a 2,6-dimethyl-3,5-dihydroxy-4-hydroxymethyl-1,3-dioxane ring at C-16. The structure is highly symmetrical and contains multiple hydroxyl and methyl groups.

Tabela 1. Compostos de macrolídeo usados nesse estudo.

Composto	CAS No.	Estrutura
Oleandomicina	3922-90-5	 <p>The structure of Oleandomycin is a 14-membered macrolide ring with a methylamino group at C14, a methyl group at C13, and a methyl group at C12. It features a complex side chain at C6 consisting of a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C2 and a methylamino group at C3, and a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C4 and a methylamino group at C5. The molecule also has a methyl group at C8 and a methyl group at C9.</p>
Eritromicina	114-07-8	 <p>The structure of Erythromycin is a 14-membered macrolide ring with a methylamino group at C14, a methyl group at C13, and a methyl group at C12. It features a complex side chain at C6 consisting of a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C2 and a methylamino group at C3, and a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C4 and a methylamino group at C5. The molecule also has a methyl group at C8 and a methyl group at C9.</p>
Tilosina	1401-69-0	 <p>The structure of Tilosin is a 14-membered macrolide ring with a methylamino group at C14, a methyl group at C13, and a methyl group at C12. It features a complex side chain at C6 consisting of a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C2 and a methylamino group at C3, and a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C4 and a methylamino group at C5. The molecule also has a methyl group at C8 and a methyl group at C9.</p>
Roxitromicina	80214-83-1	 <p>The structure of Roxithromycin is a 14-membered macrolide ring with a methylamino group at C14, a methyl group at C13, and a methyl group at C12. It features a complex side chain at C6 consisting of a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C2 and a methylamino group at C3, and a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C4 and a methylamino group at C5. The molecule also has a methyl group at C8 and a methyl group at C9.</p>
Josamicina	16846-24-5	 <p>The structure of Josamycin is a 14-membered macrolide ring with a methylamino group at C14, a methyl group at C13, and a methyl group at C12. It features a complex side chain at C6 consisting of a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C2 and a methylamino group at C3, and a 1,3-dioxane ring with a methyl group at C4 and a methylamino group at C5. The molecule also has a methyl group at C8 and a methyl group at C9.</p>

Materiais e métodos

Reagentes e produtos químicos

Todos os reagentes usados apresentam MS, HPLC ou grau analítico. A acetonitrila e a água usadas era da Honeywell International, Inc. Os padrões foram comprados da Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanha). A carne de porco foi comprada em um supermercado local. Soluções padrão (1,0 mg/mL) foram feitas em metanol individualmente e armazenadas a -20 °C. Uma solução de trabalho combinada foi feita em acetonitrila:água (20:80) e também armazenada a -20 °C. As soluções fortificadas foram feitas diariamente ao diluir corretamente a solução de trabalho com água.

Equipamentos e materiais

- LC Agilent 1290 Infinity
- LC/MS triplo quadrupolo Agilent 6460 com ionização de eletrospray
- Kit de extração EN Agilent Bond Elut QuEChERS (p/n 5982-5650)
- Remoção de matrizes otimizada—Lipídios dSPE Agilent Bond Elut QuEChERS (p/n 5982-1010)
- Polimento final Agilent Bond Elut QuEChERS para remoção de matrizes otimizada—Lipídios (p/n 5982-0101)
- Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 mm, 2,7 μm (p/n 695975-302)
- Centrífuga Eppendorf 5810 R (Brinkmann Instruments, Westbury, NY, EUA)
- Agitador vórtex digital (VWR International, LLC, Radnor, Pennsylvania, EUA)

Preparo de amostras

O procedimento final do preparo de amostras foi otimizado com as seguintes etapas:

1. Pesar 2,5 g (±0,1 g) de carne de porco homogeneizada em tubos de centrífuga de 50 mL.
2. Adicionar 8 mL de água, agitar em vórtex por 1 min.
3. Adicionar 10 mL de acetonitrila.
4. Adicionar sais no método EN do kit de extração QuEChERS.
5. Misturar a amostra agitando por 1 min.
6. Centrifugar a 4.000 rpm por 5 min.
7. Adicionar 5 mL de água em um tubo de EMR—Lipídios dSPE de 15 mL.
8. Transferir 5 mL de sobrenadante para um tubo de EMR—Lipídios.
9. Agitar em vórtex imediatamente para dispersar a amostra e depois por mais 1 min.
10. Centrifugar a 4.000 rpm por 3 min.
11. Transferir 5 mL de sobrenadante para um tubo de polimento de EMR—Lipídios de 15 mL com 2 g de sais (1:4 NaCl:MgSO₄) e agitar em vórtex por 1 min.
12. Centrifugar a 4.000 rpm por 3 min.
13. Juntar 200 μL da camada superior de ACN e 800 μL de água em um vial de amostra de 2 mL e agitar em vórtex.

Condições de HPLC

Coluna:	Agilent Poroshell 120 EC-C18, 3,0 × 100 mm, 2,7 μm (p/n 695975-302)
Fase móvel:	A: acetato de amônia 10 mM e ácido fórmico 0,1% em água B: acetonitrila
Vol. da inj.:	2 μL
Taxa de fluxo:	0,5 mL/min
Gradiente:	Tempo (min) %B 0 20 5 65 6 65 8 20
Temp:	30 °C

Condições de MS

Os macrolídeos foram monitorados no modo positivo. A Tabela 2 mostra os detalhes do monitoramento de reações múltiplas.

Parâmetros da fonte de MS

Temp. do gás:	300 °C
Fluxo de gás:	5 L/min
Nebulizador:	45 psi
Temp. do gás de impulsão:	400 °C
Fluxo do gás de impulsão:	11 L/min
Tensão do nozzle:	Positivo, 0 V
Capilar:	Positivo, 4.000 V

Tabela 2. Massas monitoradas por monitoramento de reações múltiplas.

Composto	Íon precursor	Íon produto	Fragmentador (V)	Energia de colisão (V)	Tempo de retenção (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 e discussão

Linearidade e limite de detecção

As soluções usadas para criar curvas de calibração externas foram preparadas a partir de uma solução de trabalho para fortificar amostras em branco (5, 10, 20, 50 e 250 µg/kg). As matrizes em branco foram criadas ao submeter a carne de porco ao procedimento completo, inclusive ao pré-tratamento e aos procedimentos QuEChERS. Os dados dos limites de detecção (LODs) foram calculados com uma razão sinal-ruído (S/N) de 3 ao injetar a matriz de carne de porco pós-adicionada a 0,1 µg/kg. Toda a S/N foi maior que 3:1. Portanto, todos os LODs desses compostos ficaram abaixo de 0,1 µg/kg, de acordo com o método regulamentado. A Tabela 3 exhibe os resultados das curvas de calibração.

Tabela 3. Linearidade de macrolídeos em carne de porco.

Composto	Equação de regressão	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

Recuperação e reprodutibilidade

A recuperação e a reprodutibilidade do método foram determinadas em três níveis de amostra de carne de porco adicionada em concentrações de 10, 20 e 100 µg/kg, com seis replicações em cada nível. A Tabela 4 exhibe os dados de recuperação e reprodutibilidade. A Figura 1 mostra os cromatogramas de extratos de carne de porco adicionados de 20 µg/kg.

Tabela 4. Recuperações e reprodutibilidade de macrolídeos em carne de porco (n = 6).

Composto	Nível adicionado (µg/kg)	Recuperação (%)	RSD (%)
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

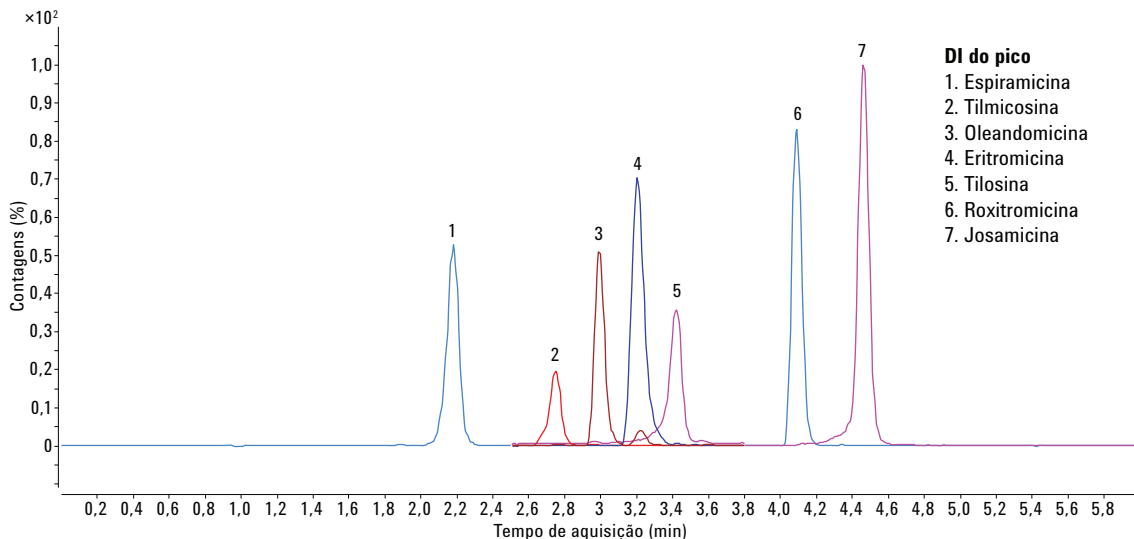


Figura 1. Cromatograma de extrato de amostra de carne de porco adicionada a 20 µg/kg.

Conclusões

O método descrito nessa nota de aplicação é confiável, seguro e robusto para a quantificação e confirmação simultâneas de macrolídeos em carne de porco. A EMR—Lípidios e o polimento proporcionam limpeza superior e removem grande parte da matriz, principalmente lípidios, sem afetar de forma significativa a recuperação de analitos. A coluna Agilent Poroshell 120 EC-C18 oferece separação rápida de diversos macrolídeos com formatos de pico simétricos e alta sensibilidade.

Referências

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, 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, 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.

Mais informações

Estes dados representam os resultados típicos. Para obter mais informações sobre nossos produtos e serviços, acesse o site www.agilent.com/chem.

www.agilent.com/chem

A Agilent Technologies não será responsável por erros contidos neste documento ou por danos incidentais ou consequenciais em relação ao fornecimento, desempenho ou uso deste material.

As informações, descrições e especificações nesta publicação estão sujeitas a mudanças sem aviso prévio.

© Agilent Technologies, Inc., 2015
 Impresso nos EUA
 12 de novembro de 2015
 5991-6442PTBR



Agilent Technologies