

Rivelazione, conferma e quantificazione di cloramfenicolo nel miele

Utilizzando il sistema LC Agilent 1260 Infinity II abbinato a LC/TQ Ultivo Agilent

Autore

Vikrant Goel
Agilent Technologies, Inc.

Abstract

Questa Nota applicativa dimostra l'utilizzo del sistema LC Agilent 1260 Infinity II abbinato a LC/TQ Ultivo Agilent per ottenere quantità a livello di picogrammi di cloramfenicolo (CAP) in campioni di miele. Il metodo è stato sviluppato con un sistema LC/TQ Ultivo Agilent, che fornisce risultati ineccepibili nonostante le dimensioni estremamente ridotte. La presente applicazione è ideale per analisi di routine nel settore alimentare durante la produzione, lavorazione e test commerciali di campioni di miele o per scopi accademici. Utilizzando la semplice preparazione del campione basata sull'estrazione liquido-liquido (LLE), è possibile ottenere con successo un limite di quantificazione (LOQ) di 50 ppt nella matrice.

Introduzione

Il CAP è un antibiotico ad ampio spettro che inibisce la sintesi delle proteine. Un'esposizione prolungata causa una rara ma grave malattia del sangue (anemia aplastica) e danni al midollo osseo. Dal momento che il CAP ha manifestato significativi effetti tossicologici sull'uomo, la sua presenza negli alimenti è totalmente vietata a livelli al di sopra del limite minimo di rendimento richiesto (LMRR) di 0,3 ppb.^{1,2}

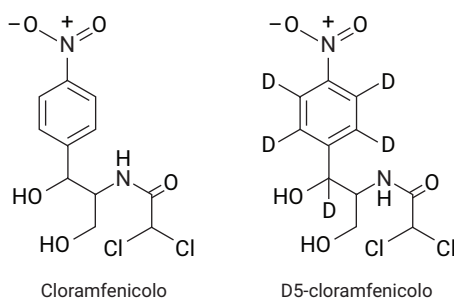


Figura 1. CAP e CAP deuterato.

Il sistema LC/MS a triplo quadrupolo costituisce lo standard di riferimento per le linee guida di USA, UE, FSSAI e altri paesi per la conferma di CAP nel miele. Nella presente applicazione è stato utilizzato uno strumento LC/TQ Ultivo, il sistema LC/MS Ultivo a triplo quadrupolo di più recente evoluzione. La sensibilità ottenuta sul sistema LC/TQ Ultivo supera i LMRR stabiliti dalle normative UE per gli alimenti.

Il presente flusso di lavoro ha utilizzato solo l'estrazione LLE, mentre i metodi tradizionali usano una combinazione di LLE e l'estrazione in fase solida (SPE). L'eliminazione del passaggio SPE fornisce una soluzione semplice, conveniente e con risparmi di tempo (Figura 2).^{3,4,5}

Usando CAP-d₅ come standard interno strutturalmente simile per ridurre le variazioni, la soluzione proposta utilizzando il sistema LC/TQ Ultivo ha dimostrato risultati specifici, lineari, robusti e affidabili.

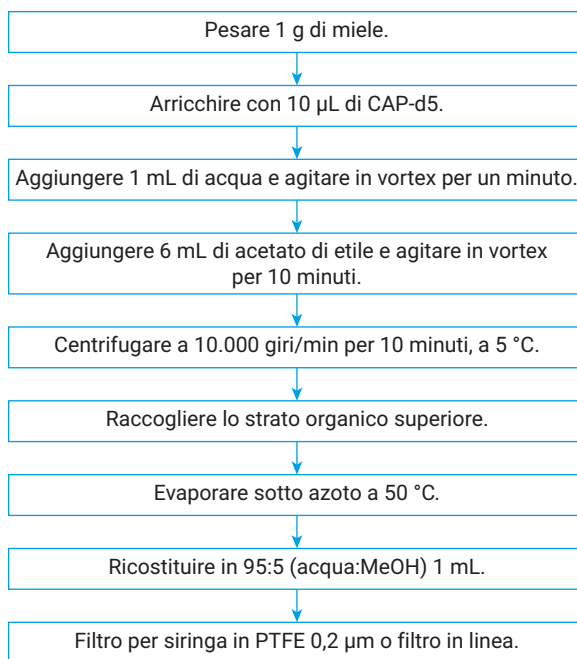


Figura 2. Preparazione del campione basata sull'estrazione LLE.

Condizioni sperimentali

Sono stati utilizzati i seguenti solventi: acetonitrile (Honeywell, LC/MS, codice 34967); metanolo (Honeywell, LC/MS, codice 34966); acqua (Millipore, Milli-Q); acetato di etile (Grado AR, Rankem); e cloramfenicolo (Agilent Technologies, codice 5091-0591). Tutte le diluizioni di lavoro di CAP sono state preparate in metanolo 100%.

Strumentazione

- Pompa flessibile Agilent 1260 Infinity II (G7104C)
- Campionatore di vial Agilent 1260 Infinity II (G7129C)
- Termostato multicolonna Agilent 1260 Infinity II (G7116A)
- Sistema LC/TQ Ultivo Agilent con sorgente ionica AJS (G6465A)

Tabella 1. Metodo del gradiente HPLC.

Parametro	Valore		
Colonna	InfinityLab Poroshell Agilent 120 EC-C18, 2,1 × 100 mm, 2,7 µm (codice 685775-922)		
Fase mobile	A) Acqua B) Metanolo; 500 µL/min		
Volume di iniezione	25 µL		
Temperatura della colonna	50 °C		
Gradiente	Tempo (Min)	Acqua (100%)	Metanolo (100%)
	0,0	95	5
	2,5	2	98
	3,0	2	98
	3,5	95	5
	5,0	95	5

Risultati e discussione

Considerando che il limite LMRR desiderato è definito a 300 ppt, un livello generalizzato di 100 ppt è stabilito come LOQ di routine nella maggior parte dei laboratori analitici. Il metodo suggerito ha un limite di rivelazione (LOD) di 25 ppt. Tuttavia, a causa della natura diversa delle fonti di miele, si raccomanda un LOQ di 50 ppt. Il cromatogramma MRM mostrato in Figura 3 mostra bianco, LOD e LOQ in solvente. In aggiunta, un profilo di eluizione riproducibile è stato ottenuto iniettando varie concentrazioni di CAP nel diluente, come mostrato in Figura 4. La Tabella 2 mostra i dati di coefficiente di variazione (%CV) del CAP per una concentrazione calcolata su sei replicati.

Tabella 2. Condizioni del sistema LC/TQ Ultivo Agilent.

Parametro	Impostazione	
Modalità di ionizzazione	AJS (negativo)	
Gas nebulizzatore	35 psi	
Drying gas	10 L/min a 350 °C	
Sheath gas	12 L/min a 400 °C	
Tensione capillare	2.000 V	
Tensione ugello	1.500 V	
Voltaggio del fragmentor	90 V	
CAV	9 V	
Dwell time	50 ms	
Risoluzione	Unità/Unità	
Analita	Transizione MRM	CE (V)
CAP	321/151,9	9
CAP	321/257,1	2
CAP	321/194,0	3
CAP-d ₅	326/157,0	9

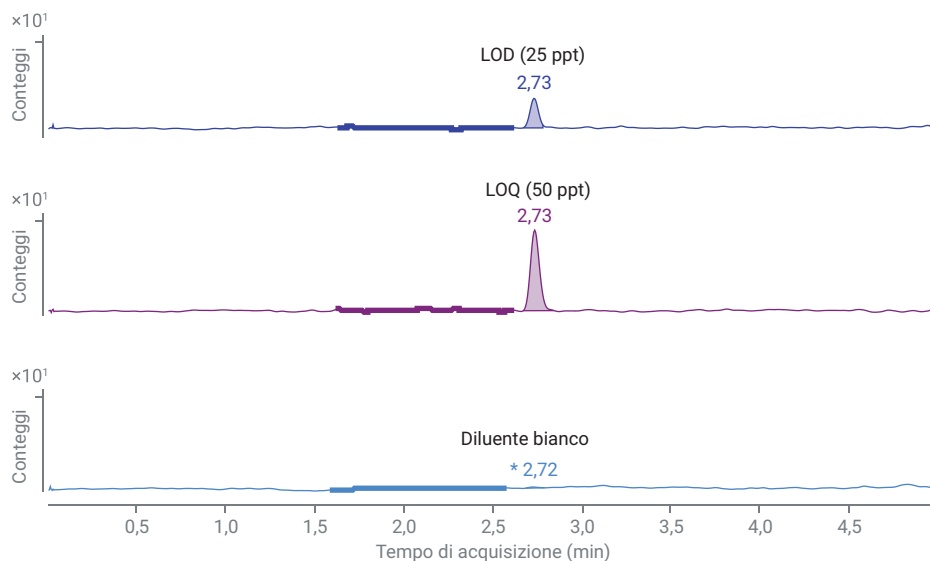


Figura 3. Sensibilità di CAP sul sistema LC/TQ Ultivo Agilent.

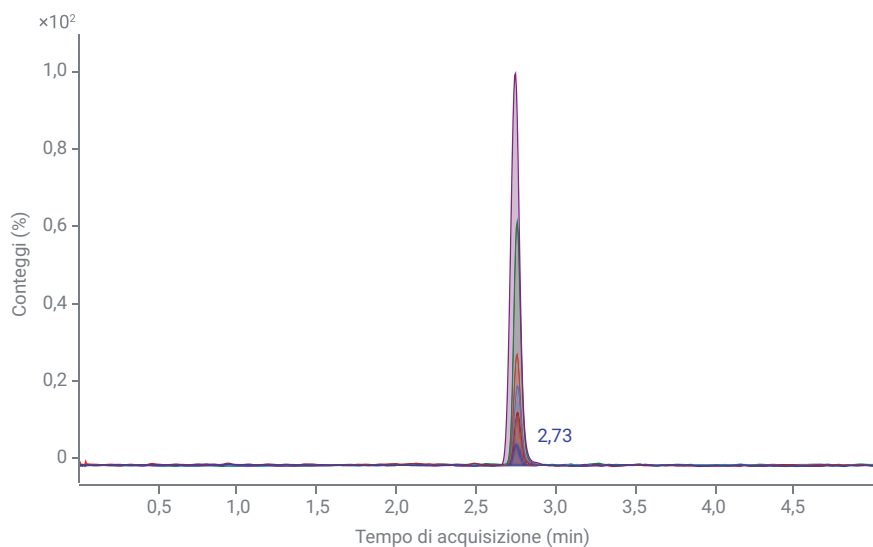


Figura 4. Sovrapposizione di diverse concentrazioni di CAP.

Calibrazione e linearità

Un grafico della linearità della calibrazione è stato generato per la risposta relativa (rapporto area CAP rispetto CAP-d₅) lungo i livelli di concentrazione da 50 a 600 ppt (Figura 5). Per dati rigorosi, per ogni livello di concentrazione sono stati analizzati tre replicati; inoltre al livello di LOQ, sono stati analizzati sei replicati. In Figura 6 è riportata una schermata della tabella di calibrazione con un quantificatore, due qualificatori e il rapporto MRM, in accordo con le normative.

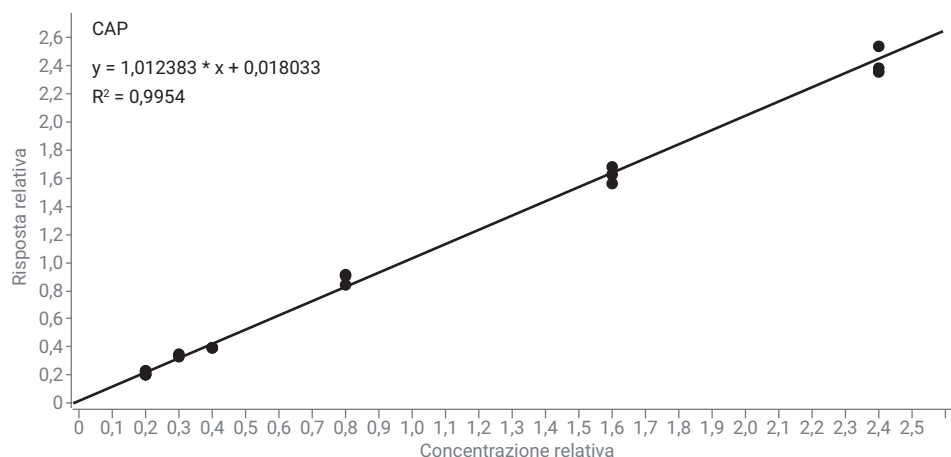


Figura 5. Grafico di linearità da 50 a 600 ppt ($R^2 = 0,9953$).

Quantificazione nei campioni di miele

Il metodo suggerito è stato esteso a campioni di miele commerciale. Il miele è stato acquistato in negozi locali (brand 1, brand 2 e brand G) e venditori ambulanti (local e local 2) di Delhi, India. Tutti i campioni sono stati inviati in tre aliquote. La Figura 7 mostra come i risultati indicano che CAP è a un livello inferiore del livello LMRR-UE di 300 ppt.

Sample			CAP Met..	CAP Results				Qualifier..	Qualifier..	CAP-IS (ISTD) R..
Type	Level	Acq. Date-Time (Inst.)	Exp. Conc.	RT	Calc. Conc.	Accuracy	ISTD Resp. Ratio	Ratio	Ratio	RT
Blank		8/24/2018 4:18 AM		2.59	0.00		0.0061		208.3	2.72
Cal	1	8/24/2018 1:54 AM	50.00	2.73	43.47	86.9	0.2061	87.3	47.7	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:06 AM	50.00	2.73	42.73	85.5	0.2031	110.6	44.4	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:12 AM	50.00	2.73	48.06	96.1	0.2244	92.0	38.5	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:18 AM	50.00	2.73	48.88	97.8	0.2277	84.6	40.7	2.72
Cal	1	8/24/2018 2:24 AM	50.00	2.73	49.16	98.3	0.2288	104.3	47.7	2.73
Cal	1	8/24/2018 2:30 AM	50.00	2.73	42.17	84.3	0.2008	80.7	39.1	2.73
Cal	2	8/24/2018 2:42 AM	75.00	2.73	86.21	114.9	0.3768	88.0	41.5	2.72
Cal	2	8/24/2018 2:48 AM	75.00	2.73	82.51	110.0	0.3621	105.0	43.3	2.73
Cal	2	8/24/2018 2:54 AM	75.00	2.73	81.06	108.1	0.3563	87.4	47.4	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:06 AM	100.00	2.73	89.71	89.7	0.3908	96.7	48.9	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:12 AM	100.00	2.73	89.93	89.9	0.3917	100.9	39.7	2.72
Cal	3	8/24/2018 3:18 AM	100.00	2.73	91.81	91.8	0.3992	90.0	38.6	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:24 AM	200.00	2.73	219.27	109.6	0.9086	103.6	47.5	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:36 AM	200.00	2.73	217.76	108.9	0.9025	104.5	46.3	2.72
Cal	4	8/24/2018 3:42 AM	200.00	2.73	205.06	102.5	0.8518	109.8	46.2	2.72
Cal	5	8/24/2018 3:48 AM	400.00	2.72	399.33	99.8	1.6281	90.5	43.9	2.71
Cal	5	8/24/2018 3:54 AM	400.00	2.72	380.87	95.2	1.5543	95.3	46.6	2.71
Cal	5	8/24/2018 4:00 AM	400.00	2.71	412.19	103.0	1.6795	94.3	43.7	2.71
Cal	6	8/24/2018 11:48 AM	600.00	2.73	583.31	97.2	2.3633	94.6	42.2	2.72
Cal	6	8/24/2018 11:54 AM	600.00	2.72	584.87	97.5	2.3696	98.3	43.3	2.71
Cal	6	8/24/2018 12:00 PM	600.00	2.71	626.66	104.4	2.5366	95.1	41.4	2.71

Figura 6. Tabella di calibrazione per CAP da 50 a 600 ppt.

Recupero nei campioni di miele

Un campione senza un picco cromatografico RT di 2,73 ±0,1 minuti e un rapporto tra gli ioni superiore alle linee guida UE sono considerati campioni negativi.⁶ Il campione brand-G presenta livelli di CAP al di sopra del valore LOD e il campione local-2 livelli di CAP sopra il valore LOQ. Inoltre, è stato condotto un esperimento di arricchimento aggiungendo 50 ppt di CAP ai campioni di miele, mostrato in Figura 7. Nello studio di arricchimento mostrato nella Tabella 3, un buon recupero (da 80 a 120%) è stato riportato in tutti e cinque i campioni, confermando che il metodo suggerito è adatto per analisi di routine su CAP nel miele.

Conclusione

Il LOQ è 1/6 del LMRR-UE. Il metodo LC offre separazione UHPLC a bassa pressione utilizzando una colonna InfinityLab Poroshell Agilent 120, 2,7 µm. La preparazione del campione basata sull'estrazione LLE utilizza passaggi semplici e con risparmio di tempo. Campioni di miele veri sono stati analizzati con successo per la presenza di CAP, secondo le normative UE.

Sample			CAP Results			Qualifi...	Qualifi...	CAP-IS (...)
Name	Type	Acq. Date-Time	RT	MI	Final Conc.	Ratio	Ratio	RT
Brand1	Sample	8/24/2018 12:12 P...	2.973		4.55			2.721
Brand1	Sample	8/24/2018 12:18 P...	2.978		15.36	102.6		2.721
Brand1	Sample	8/24/2018 12:24 P...	2.431		23.49	63.9		2.726
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:30 P...	2.732		40.89	101.6	47.1	2.726
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:36 P...	2.727		41.76	95.4	54.6	2.726
Brand1_Spike	Sample	8/24/2018 12:42 P...	2.732		41.39	77.4	51.9	2.726
Brand2	Sample	8/24/2018 12:48 P...	2.978		89.47	15.6	3.3	2.726
Brand2	Sample	8/24/2018 12:54 P...	2.431		67.75	55.8	146.5	2.726
Brand2	Sample	8/24/2018 1:00 PM	2.983		128.01	15.8	9.6	2.726
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:06 PM	2.732		44.81	93.7	36.4	2.721
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:12 PM	2.732		42.73	87.3	57.8	2.726
Brand2_Spike	Sample	8/24/2018 1:18 PM	2.727		38.41	93.1	49.7	2.726
BrandG	Sample	8/24/2018 1:24 PM	2.727		25.90	100.0	47.1	2.726
BrandG	Sample	8/24/2018 1:30 PM	2.732		30.59	96.2	49.4	2.726
BrandG	Sample	8/24/2018 1:36 PM	2.732		28.61	112.0	57.6	2.726
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:42 PM	2.732		74.66	90.6	49.7	2.720
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:48 PM	2.727		77.49	103.1	51.1	2.721
BrandG_Spi...	Sample	8/24/2018 1:54 PM	2.732		83.27	107.3	42.1	2.726
Local	Sample	8/24/2018 2:00 PM	2.743		0.00	318.5		2.726
Local	Sample	8/24/2018 2:06 PM	2.732		2.10		156.5	2.726
Local	Sample	8/24/2018 2:12 PM	2.620		0.00	390.9	72.5	2.726
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:18 PM	2.732		48.68	77.2	39.2	2.726
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:24 PM	2.732		41.78	113.2	53.8	2.726
Local_Spike	Sample	8/24/2018 2:30 PM	2.732		51.07	75.9	55.6	2.726
Local2	Sample	8/24/2018 2:36 PM	2.732		130.33	95.7	40.3	2.726
Local2	Sample	8/24/2018 2:42 PM	2.732		142.36	99.0	41.4	2.726
Local2	Sample	8/24/2018 2:48 PM	2.727		164.55	88.2	47.4	2.721
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 2:54 PM	2.732		193.57	100.3	44.1	2.726
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 3:00 PM	2.732		207.12	83.0	45.5	2.726
Local2_Spike	Sample	8/24/2018 3:06 PM	2.732		197.05	96.4	44.8	2.726

Figura 7. Campioni di prodotti sul mercato e campioni sul mercato arricchiti al livello LOQ.

Tabella 3. Cloramfenicolo in diversi campioni di miele.

Campione di prodotto sul mercato	Concentrazione pre-aricchimento (a)	Concentrazione post-aricchimento (b)	% recupero = 100(b - a)/50
Brand 1	ND	41,35 ppt	82,69%
Brand 2	ND	41,98 ppt	83,96%
Brand G	28,37 ppt	78,47 ppt	100,20%
Local	ND	47,18 ppt	94,35%
Local 2	145,75 ppt	199,25 ppt	107,0%

Bibliografia

1. Scientific Opinion on Chloramphenicol in Food and Feed. *EFSA Journal* **2014**, 12(11), 3907.
2. Decisione della Commissione 2003/181/CE.
3. Fang, Y. *et al.* Detection, Confirmation, and Quantification of Chloramphenicol in Honey and Shrimp at Regulatory Levels Using Quadrupole and Ion Trap LC/MS Application. *Nota applicativa Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5988-9920EN, **2007**.
4. Zhao, L. *et al.* Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Nota applicativa Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5990-3615EN, **2009**.
5. Jin-Lan, S. *et al.* Screening 36 Veterinary Drugs in Animal Origin Food by LC-MS/MS Combined with Modified QuEChERS Method. *Nota applicativa Agilent Technologies*, codice pubblicazione 5991-0013EN, **2012**.
6. SANTE/11813/2017.

www.agilent.com/chem

Le informazioni fornite possono variare senza preavviso.

© Agilent Technologies, Inc. 2019
Stampato negli Stati Uniti, 6 settembre 2019
5994-1317ITE