

DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN TEJIDO ANIMAL MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Gualpa Jaramillo, Fernando^{a,b*}; Rendón Morán, Michael^c

^aWorld Survey Services Ecuador, Avenida de las Américas y Plaza Dañin 1608, Guayaquil, Ecuador

^bUniversidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Químicas, Ciudadela Universitaria, Guayaquil, Ecuador

^cEscuela Superior Politécnica del Litoral, ESPOL, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Campus Gustavo Galindo Km 30,5 Vía Perimetral, Guayaquil, Ecuador

Ingresado: 02/06/2015

Aceptado: 17/09/2015

Resumen

Un método multiresiduos, para la determinación simultánea de antibióticos de Fluoroquinolonas en tejido animal ha sido desarrollado. Seis Fluoroquinolonas correspondientes a Quinolonas ácidas y básicas fueron analizadas en tejido animal fortificado (camarón, pescado, pollo, pavo) a niveles de 10 a 200 ngg⁻¹ mediante Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas Tandem. Recuperaciones para Ciprofloxacina (CIP), Sarafloxacina (SAR), Enrofloxacin (ENR), Danofloxacin (DAN), Ácido Oxolínico (OXO) y Flumequina (FLU) fueron en el orden del 93 a 108%. Los límites de detección fueron establecidos en 5,0 ngg⁻¹ para cada quinolona en tejido animal. El método desarrollado es lo suficientemente robusto para ser aplicado a otros tipos de tejido animal con límites de cuantificación de 10,0 ngg⁻¹. La participación en Pruebas de Aptitud Interlaboratorio (matriz músculo de pavo) permitió evaluar la robustez del método alcanzando en la prueba un valor de Z-score de -0,35 para Enrofloxacin. Para las otras quinolonas el valor reportado fue menor al límite de cuantificación, lo cual fue confirmado por el Organizador de la Prueba en su reporte final.

Palabras clave: Espectrometría de Masas, Fluoroquinolonas, Prueba de Aptitud, Z-score.

DETERMINATION OF FLUOROQUINOLONES IN ANIMAL TISSUE BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY

Abstract

An efficient multiresidue method for determination of fluoroquinolone antibiotics in animal tissue has been developed. Six fluoroquinolone corresponding to acid and basic quinolone were analyzed in fortified animal tissue (shrimp, fish, chicken, turkey, etc) at levels of 10–200 ngg⁻¹ by Liquid Chromatography Spectrometry Mass. Recoveries for Ciprofloxacin, Sarafloxacin, Enrofloxacin, Danofloxacin, Oxolinic Acid and Flumequine were generally in the range from 93–108%. The limits of detection were 5,0 ngg⁻¹ for each quinolone in animal tissue. The method was found to be applicable to the analysis of different animal tissue, with limits of quantitation ranging from 10ngg⁻¹. Inter-laboratory Proficiency test participation (turkey muscle) has let to evaluate the hardness of the method. Z-score of -0,35 was obtained for Enrofloxacin. For the others quinolones the value was reported as less than limit of quantitation, which was confirmed by the Organizer in his final report.

Keywords: Mass Spectrometry, Fluoroquinolone, Proficiency test, Z-score.

I. INTRODUCCIÓN

Las Fluoroquinolonas FQs son antibióticos bactericidas, de penetración intracelular [1]. El tratamiento animal con

*Correspondencia a: Fernando Gualpa, World Survey Services Ecuador, Avenida de las Américas y Plaza Dañin 1608, Guayaquil, Ecuador. Teléfono: ++593 989624201. E-mail: fgualpa@wss.ec

FQs representa un potencial peligro a la salud de consumidores debido a la persistencia de estos antibióticos en los tejidos.

Las quinolonas de primera y segunda generación son activas frente a microorganismos gramnegativos, con excepción de *Pseudomonas* spp. y otros bacilos gramnegativos no fermentadores [2, 3].

Las de tercera y cuarta generación mantienen similar actividad que las de segunda generación, pero presentan mejor actividad frente a grampositivos, anaerobios y patógenos "atípicos".

Todas las fluoroquinolonas tienen un prolongado efecto postantibiótico contra la mayoría de gramnegativos. El efecto post antibiótico se refiere a la inhibición del crecimiento bacteriano, después de una breve exposición a un antibiótico, cuando ya las concentraciones del fármaco no son eficaces. La magnitud del efecto postantibiótico influye en el diseño de los regímenes posológicos.

El uso de antibióticos empleados en el mejoramiento de la producción animal demanda la necesidad de un control adecuado de estas sustancias, a fin de garantizar no solo el cumplimiento de la calidad de productos acorde a las exigencias del mercado Internacional, sino también el de proveer un producto libre de contaminantes al consumidor local. Ante ello se ha desarrollado un método analítico selectivo y robusto que permite monitorear en conjunto las fluoroquinolonas en diversos tipos de matrices cárnicas garantizando el consumo de alimentos no contaminados.

Muchos métodos basados en cromatografía líquida se han desarrollado a nivel mundial para análisis de fluoroquinolonas en tejidos, desde la utilización de equipos con detectores sencillos como el DAD [4] y detector fluorescencia [5] hasta detectores de espectrometría de masas [6,7,8,9].

Los límites máximos residuales de FQs establecidos por la Unión Europea para tejidos están en 100 μgkg^{-1} para la suma de Enrofloxacin y Ciprofloxacin, 10 μgkg^{-1} para sarafloxacin, 200 μgkg^{-1} para Danofloxacin y Flumequina y 100 μgkg^{-1} para el Ácido Oxonílico [10].

II. METODOLOGÍA

Reactivos y materiales: Acetonitrilo y metanol empleados durante el desarrollo de la técnica fueron grado HPLC (Merck). Eluentes y soluciones estándares fueron preparados con agua de alta pureza desde un sistema de purificación de agua Milli-Q. Los solventes fueron filtrados a través de una membrana PVDF 47 mm de diámetro y 0,22 μm . Los extractos fueron filtrados a través de un filtro de membrana en PDVF de 13 mm, de 0,22 μm Millipore.

Equipos: Una centrifuga Thermoline fue usada para la separación de las fases sólida-líquida empleada para la extracción de quinolonas. La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna Waters UPLC BEH C18 de 50 x 2,1 mm; 1,7 μm , manteniendo el horno de columna a 45°C [11]. La fase móvil consistió en una solución A: 10mM Acetato de Amonio: Agua al 1% de Ácido Fórmico y B: Acetonitrilo al 2% de Ácido Fórmico, cuyo programa de gradiente es descrito en la Tabla I.

Tabla I. Gradiente de separación

Tiempo (min)	Solución A (%) 1% Ác. Fórmico, 10 mM Acetato amónico en agua	Solución B (%) 2% Ác. Fórmico en ACN
0,00	90	10
0,59	90	10
1,69	10	90
2,00	10	90
2,10	90	10
3,00	90	10

El flujo fue establecido en 0,45 mLmin⁻¹. El método fue llevado a cabo usando un sistema de cromatografía líquida UPLC Binary Solvent Manager (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas (Waters) Xevo TQ. Se realizó un proceso de optimización de parámetros de control a nivel del espectrómetro de masas para la obtención de iones moleculares y productos iónicos de cada fluoroquinolona [12]. Los

Tabla II. Condiciones del espectrómetro de masas para la identificación de quinolonas

Analito	Ión Molecular	Producto Iónico	Voltaje: Cono	Energía Colisión	Dwell (s)
Ciprofloxacin	332,58	231,23 288,41	30	38 18	0,017
Sarafloxacin	386,66	299,37 343,48	30	26 18	0,018
Enrofloxacin	360,68	245,28 316,47	28	26 18	0,017
Danofloxacin	358,66	96,09 314,49	34	22 18	0,020
Ácido Oxonílico	262,46	216,13 172,32	24	28 36	0,055
Flumequina	262,45	202,11 174,09	22	32 38	0,100

Tabla III. Datos de regresión lineal y coeficientes de correlación cuadrados para las curvas de calibración de las seis quinolonas estudiadas.

Analito	Rango Linealidad μgkg^{-1}	Pendiente promedio	Intercepto promedio	Coefficiente de determinación r^2 promedio
Ciprofloxacina	5,0 a 400,00	124,46145	-9,73013	0,99887
Sarafloxacina	5,0 a 400,00	94,98375	-29,06591	0,99900
Enrofloxacin	5,0 a 400,00	586,70439	-381,40799	0,99954
Danofloxacin	5,0 a 400,00	101,60081	-27,12727	0,99833
Ácido Oxolínico	5,0 a 400,00	218,16780	-224,43267	0,99798
Flumequina	5,0 a 400,00	1949,94030	2652,20726	0,99774

valores de voltaje, energía de colisión y dwell se muestran en la Tabla II.

Soluciones estándares: Estándares certificados de Ciprofloxacina, Sarafloxacina, Enrofloxacin, Danofloxacin, Ácido Oxolínico y Flumequina marca Dr. Ehrenstorfer fueron adquiridos desde Alemania. Soluciones stock de 1000 mgL^{-1} de quinolonas fueron inicialmente disueltas en dos mililitros de una solución $0,02 \text{ M}$ de hidróxido de amonio y posteriormente aforadas a 10 mL con Metanol HPLC. Curva de calibración para la cuantificación de las muestras en tejido animal fueron realizadas en tejido de camarón mediante fortificación a niveles de $5,0; 10,0; 30,0; 50,0; 100,0; 200,0; 400,0 \mu\text{gKg}^{-1}$ (Figura 1).

Cinco microlitros de extracto de cada nivel del punto de calibración de la curva preparado, así como de los extractos de las muestras fueron inyectados de manera automática al Cromatógrafo.

Preparación de la muestra: Tres gramos de muestra de tejido animal fueron inicialmente dispersados con dos mililitros de agua grado HPLC, se fortificó las muestras blanco matriz para realización de la curva de calibración; agitar y dejar en reposo por 15 minutos en la

obscuridad. Agregar ocho mililitros de Acetonitrilo, homogeneizar por 10 minutos mediante vortex y centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos. Una porción del extracto fue filtrado a un vial de 2 mL de capacidad, mediante un filtro de membrana en PVDF de 13 mm de $0,22 \mu\text{m}$ Millipore. Finalmente, cinco microlitros del extracto fueron inyectados en el sistema cromatográfico. La función de calibración fue analizada mediante fortificación de blanco matriz para verificar que la concentración más baja elegida de $5,0 \mu\text{gkg}^{-1}$ cumpla los criterios del LOD. Los resultados obtenidos se indican en Tabla III.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos de validación se muestran en Tabla IV. Recuperaciones satisfactorias (93 a 108%) en muestras fortificadas fueron obtenidas para la determinación simultánea de CIP, SAR, ENR, DAN, OXO y FLU, datos comparables con los trabajos realizados por Wagil, 2014 [7]. Adicionalmente, los datos de precisión (repetibilidad) fueron obtenidos con valores de coeficientes de variación (CV) $<15\%$. El límite de detección (LOD) fue estimado sobre la base del

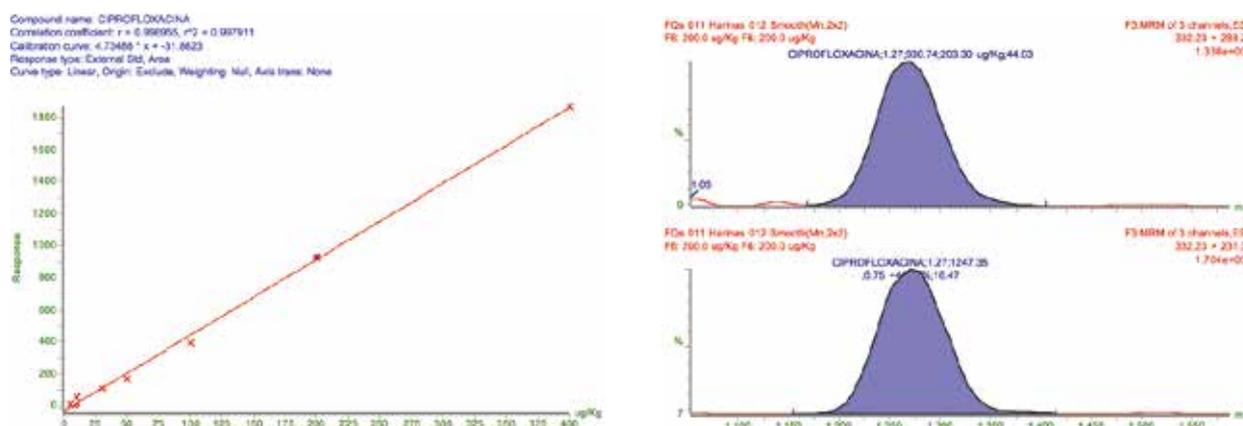


Figura 1. Curva de Calibración en músculo de tejido animal (camarón) fortificado Ciprofloxacina Rango de Linealidad: 5.0 a $400 \mu\text{gKg}^{-1}$

Tabla IV. Porcentaje de recuperación promedio de la validación (pruebas intralaboratorio) de seis quinolonas en cinco niveles de concentración en matriz fortificada, μgkg^{-1} .

Analito	10 (n = 18) ^a	30 (n = 18) ^a	50 (n = 18) ^a	100 (n = 18) ^a	200 (n = 18) ^a	LOD	LOQ
Ciprofloxacina	99,88	102,83	98,23	96,83	98,61	5,0	10,00
Sarafloxacina	101,09	96,77	93,07	96,77	93,68	5,0	10,00
Enrofloxacina	105,33	103,62	99,12	101,76	99,49	5,0	10,00
Danofloxacina	103,06	102,98	93,03	93,65	93,14	5,0	10,00
Ácido Oxolínico	100,12	107,98	93,22	98,74	97,79	5,0	10,00
Flumequina	95,12	106,97	101,34	106,98	103,66	5,0	10,00

^a Programa de Validación: Tres días, tres analistas, cinco niveles de concentración, seis repeticiones por analista y nivel de concentración

resultado de cinco réplicas de tejido animal fortificado a un nivel de $5.0 \mu\text{gkg}^{-1}$ donde la señal del pico cromatográfico cumple una relación señal-ruído superior a 3:1 (Figura 2). El límite de Cuantificación LOQ en tejido animal fue tomado como la concentración de analito más pequeña la cual fue medida con un grado de precisión definida. La precisión fue considerada aceptable, cuando sus valores de CV fueron menores al 15%, por tanto el LOQ del método analítico fue de $10 \mu\text{gkg}^{-1}$ para todas las quinolonas estudiadas. Estos resultados de validación se detallan junto con otras

metodologías similares en varias matrices, de acuerdo a la Tabla V. Finalmente se ha demostrado que el método propuesto es aplicable para la determinación de quinolonas en varios tipos de tejido animal como pollo, vacuno, pescado; matrices también evaluadas durante el desarrollo con resultados similares a los presentados en el presente estudio. Los resultados obtenidos con el método desarrollado mediante la participación del Laboratorio en Pruebas de Aptitud adquiridas a TestVeritas: (matriz músculo de pavo) permitieron evaluar la robustez del método. El valor de Z-score

**Figura 2.** Cromatograma y Espectro de masas para Fluoroquinolonas; SAR, ENR, DAN, CIP, OXO, FLU en matriz de músculo de camarón fortificado a $5 \mu\text{gkg}^{-1}$.

Tabla V. Detalle de datos de validación obtenidos por diferentes autores en la determinación de fluoroquinolonas.

	Gualpa-Rendón	Shen et al [13]	Guto et al [14]	Van Hoof et al [14]	Dufresne et al [16]
Método	LC-ESI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS	LC-ESI-MS/MS
Matriz	Tejido animal ^a	Aviar	Aviar	Bovino	Camarón
Rango (μgkg^{-1})	10 - 200	1,0 - 20,0	5 - 100	15 - 600	--
Recuperación (%)	93 - 108	55 - 110	79 - 109	93 - 110	57 - 96
CV (%)	< 15	< 18	4,2 - 8,9	< 17	< 18
LOD (μgkg^{-1})	5	0,3	--	--	0,4
LOQ (μgkg^{-1})	10	1	0,2 - 1,4	--	--

^a Músculo de pavo y camarón

alcanzado para Enrofloxacin fue -0,35. Las otras quinolonas fueron reportadas como menor al límite de cuantificación ($<10 \mu\text{gkg}^{-1}$) lo cual fue confirmado en el informe final del Organizador: Test Veritas Progetto Trieste: Laboratory Proficiency Testing for Food analysis.

IV. CONCLUSIONES

El método descrito provee una determinación simultánea eficiente con una buena precisión y exactitud. Los límites de cuantificación se encuentran en niveles más bajos a los límites máximos residuales establecidos para estas sustancias. El uso del solvente apropiado (acetónitrilo) para la extracción permite un rápido análisis de residuos de quinolonas, lo cual es un aspecto importante para los análisis de rutina del laboratorio.

Agradecimientos

Este documento ha sido autorizado a ser publicado gracias al apoyo del Ing. Luis Serón H; gerente corporativo de la compañía World Survey Services a quien los autores expresan su sincero agradecimiento por su apoyo en todos los aspectos que el estudio conlleva.

Referencias

- [1] F. C. Tenover, J. E. McGowan (1998). "The epidemiology of bacterial resistance to antimicrobial agents. In Bacterial infections of humans", *Springer US*, (pp. 83-93).
- [2] S. Nseir, C. Di Pompeo, S. Soubrier, P. Delour, H. Lenci, M. Roussel-Delvallez, A. Durocher (2005). "First-generation fluoroquinolone use and subsequent emergence of multiple drug-resistant bacteria in the intensive care unit". *Critical care medicine*, 33(2), 283-289.
- [3] J. M. Blondeau (2004). "Fluoroquinolones:

mechanism of action, classification, and development of resistance". *Survey of ophthalmology*, 49(2), S73-S78.

[4] P. Gigosos, P. Revesado, O. Cadahia, C. Fente, B. Vazquez, C. Franco, & A. Cepeda. (2000). Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of chromatography A*, 871(1), 31-36.

[5] I. Jiménez-Díaz, M. Hermo, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, D. Barrón, J. Barbosa, & A. Navalón. (2013). Comparison of three analytical methods for the determination of quinolones in pig muscle samples. *Chromatographia*, 76(11-12), 707-713.

[6] Martins, Magda Targa, et al. (2015). "Determination of quinolones and fluoroquinolones, tetracyclines and sulfonamides in bovine, swine and poultry liver using LC-MS/MS." *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32.3, 333-341.

[7] M. Wagil, et al. (2014). "Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland." *Science of the Total Environment*, 493, 1006-1013.

[8] Rezk, R. Mamdouh, et al. (2015). "Multi-residues determination of antimicrobials in fish tissues by HPLC-ESI-MS/MS method." *Journal of Chromatography B*, 978, 103-110.

[9] Tsai, Chung-Wei, Chan-Shing Lin, and Wei-Hsien Wang. (2012). "Multi-Residue Determination of Sulfonamide and Quinolone Residues in Fish Tissues by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)." *藥物食品分析* 20.3, 674-680.

[10] Regulation, C. (2010). "No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin", *Off. J. Eur. Union L*, 15, 1-72.

[11] K. M. Jenkins, M. S. Young (2004). "LC-MS

determination of fluoroquinolone antibiotics in beef tissue using the Atlantis (R) dC (18) column”, *LC GC EUROPE*, 17(11 A), 53-54.

[12] M. J. Schneider, D. J. Donoghue (2003). “Multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in eggs using liquid chromatography–fluorescence–mass spectrometry n”, *Analytica chimica acta*, 483(1), 39-49.

[13] J. Shen, L. Guo, F. Xu, Q. Rao, X. Xia, X. Li, & S. Ding. (2010). “Simultaneous Determination of Fluoroquinolones, Tetracyclines and Sulfonamides in Chicken Muscle by UPLC–MS–MS”. *Chromatographia*, 71(5-6), 383-388.

[14] W. Guo, Y. Liu, & N. Liu. (2009). “Simultaneous analysis of 7 fluoroquinolone residues in chicken muscle by ultra performance liquid

chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry”. *Chinese journal of chromatography/Zhongguo hua xue hui*, 27(4), 406-411.

[15] N. Van Hoof, K. De Wasch, L. Okerman, W. Reybroeck, S. Poelmans, H. Noppe, & H. De Brabander. (2005). “Validation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products”. *Analytica Chimica Acta*, 529(1), 265-272.

[16] G. Dufresne, A. Fouquet, D. Forsyth, & S. A. Tittlemier, (2007). “Multiresidue determination of quinolone and fluoroquinolone antibiotics in fish and shrimp by liquid chromatography/tandem mass spectrometry”. *Journal of AOAC International*, 90(2), 604-612.

Información Suplementaria

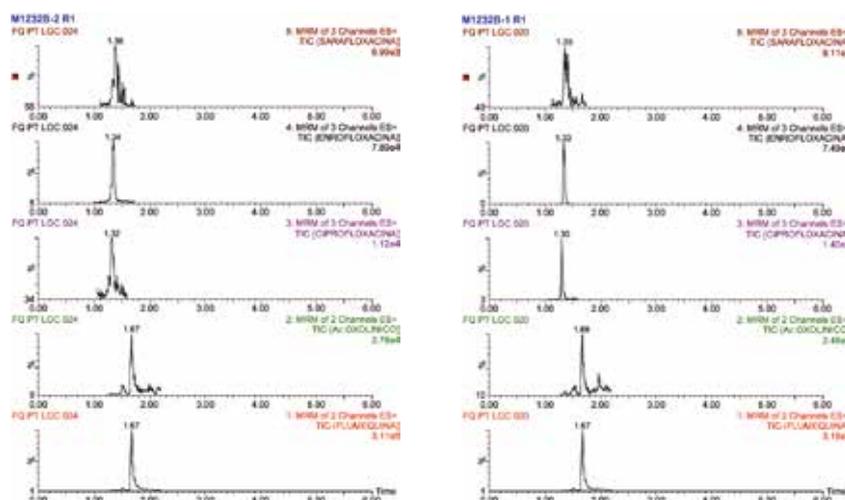


Figura S1. Cromatograma de muestra de tejido animal (músculo de pavo): Prueba Aptitud interlaboratorio: PROGETTO TIRESTE.

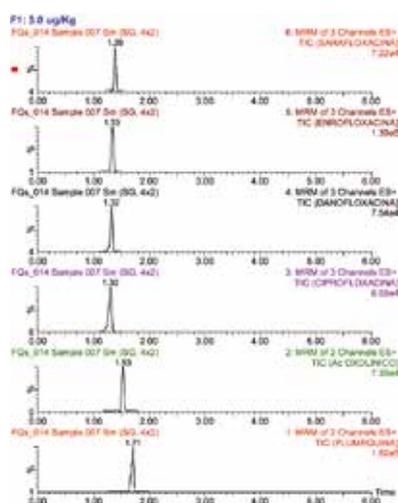


Figura S2. Cromatograma solución mixta de Fluoroquinolonas: 5 µg/L-1 en metanol.

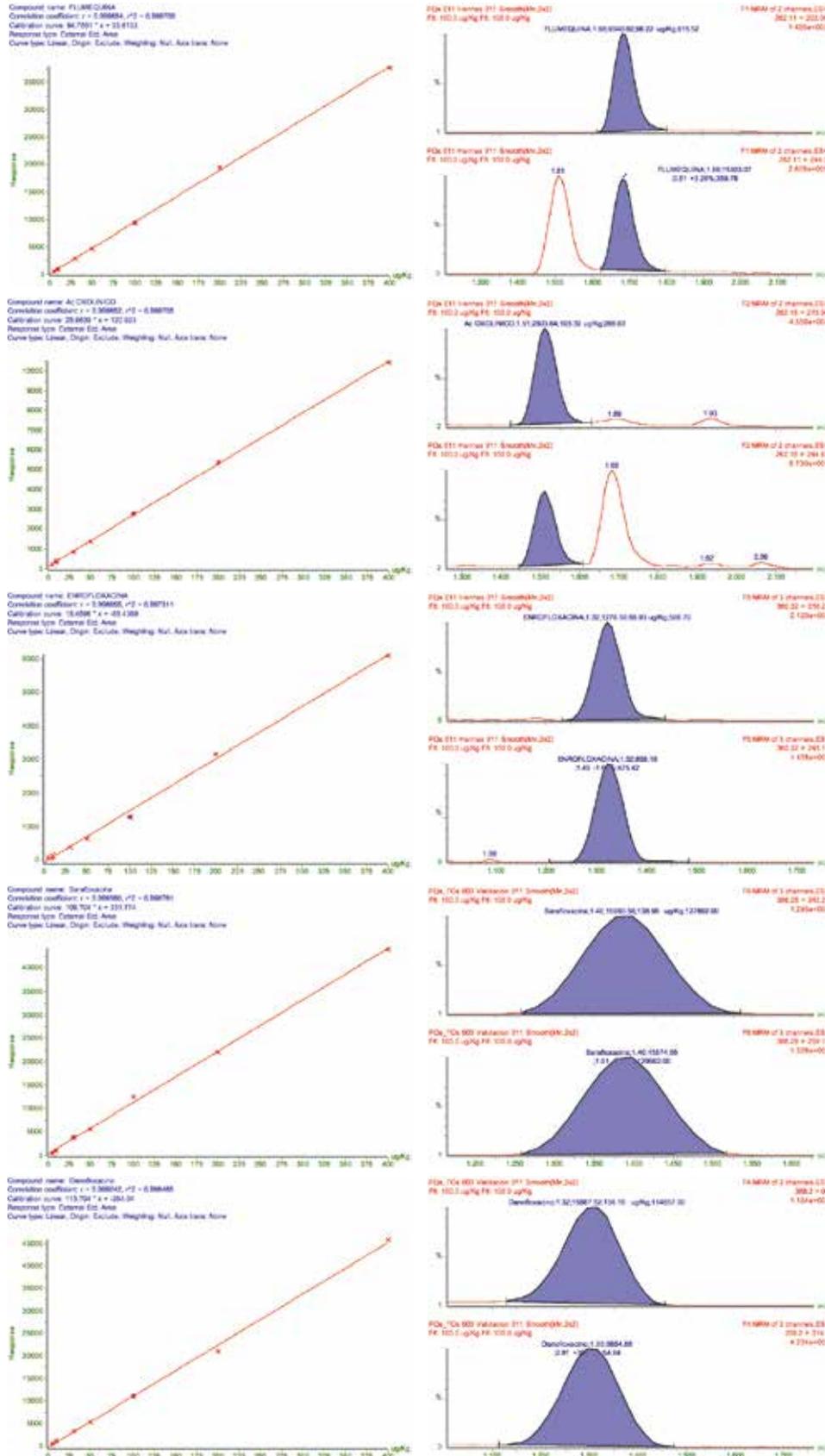


Figura S3. Curvas de calibración en matriz tejido animal (camarón) fortificada: rango de linealidad de 2,5 a 160 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.