

- Ghezzi M., R. Acerbi, M. Ballerio, J. Rebagliati, M. Díaz, P. Bergonzelli, D. Civit, E. Rodriguez, J. Passucci, R. Cepeda, M. Sañudo, M. Copello, J. Scorzielo, M. Caló, E. Camussi J. Bertoli, M. Aba. 2008. Evaluación de las prácticas relacionadas con el transporte terrestre de hacienda que causan perjuicios económicos en la cadena de ganados y carnes. IPCVA, Cuadernillo técnico N°5, Mayo.
- Gracey, J.G., D.S Collins and R.J Huey. 1999. Meat Hygiene. 10th ed. London: Balliere Tindall.
- Grandin T. 1996. El bienestar animal en las plantas de faena, American Assoc Bovine Pract, Proceedings, 22 – 26.
- Herrera C.A. 2008. Análisis descriptivo de factores asociados a la presentación de contusiones y pH elevado en canales de bovinos de distinta procedencia geográfica. Tesis médico veterinario. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Austral de Chile. Chile. p9 y 19.
- Rebagliati, J.E., M. Ballerio, R. Acerbi, M. Díaz, M.M Alvarez, F. Bigatti, J.A. Cruz Mascitelli L., P. Bergonzelli, C. Gonzalez, D. Civit, M.D. Ghezzi. 2006. Evaluación de las prácticas ganaderas en bovinos que causan perjuicios económicos en plantas frigoríficas de la República Argentina. IPCVA Cuadernillo Técnico N° 3. Búsqueda en Internet <http://www.ipcva.com.ar>
- Strappini, A.C., J. Metz, C. Gallo, B. Kemp. 2009. Origin and assessment of bruises in beef cattle at slaughter. Animal 3(5):728-736.

Development and optimization of a Multiresidue Method for the Analysis of Antibiotics in Milk.

Desarrollo y Optimización de un Método Multiresiduo para el Análisis de Antibióticos en Leche.

Andrea del Pilar Mojica C.¹; Diego A. Ahumada F.²; Adriana Mireya Zamudio S.³

¹ Química, M.Sc, Laboratorio de Inocuidad Química, Centro de Bio-Sistemas, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería, Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Cajicá (Cundinamarca), Colombia. AA 140196

² Químico, M.Sc, Subdirección de Metrología Química y Biomedicina, Instituto Nacional de Metrología de Colombia, Colombia AA 111321.

³ Química, Laboratorio de Inocuidad Química, Centro de Bio-Sistemas, Facultad de Ciencias Naturales e Ingeniería Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, Cajicá (Cundinamarca), Colombia. adriana.zamudio@utadeo.edu.co

Resumen. La presencia de antibióticos en alimentos se ha convertido en una de las principales preocupaciones de los consumidores, esto ha llevado a que los laboratorios tengan que desarrollar métodos analíticos específicos que permitan analizar un mayor número de antibióticos, en el menor tiempo posible y con alta confiabilidad. En este sentido, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y optimizar un método para la determinación de residuos de antibióticos en leche. Para esto, se empleó el método QuEChERS en la extracción de las muestras y cromatografía líquida ultra rápida acoplada a espectrometría de masas (UFLC-MS). Las condiciones de operación del UFLC-MS, fueron optimizadas a través del uso de diferentes diseños experimentales. Los factores estandarizados correspondieron a: composición de la fase móvil, voltaje del capilar, temperatura de la línea de desolvatación, temperatura del bloque de calentamiento, flujo de los gases de secado y nebulización. Finalmente, el método optimizado se evaluó con muestras de leche fortificadas y

se encontró que los niveles de detección del método son inferiores a los límites máximos de residuos para la mayoría de antibióticos.

Palabras clave: cromatografía, QuEChERS, medicamentos veterinarios.

Abstract. The antibiotics residues in milk has become a major concern for consumers, for this reason nowadays laboratories are tasked to screen samples for as many antibiotics as possible in a single analysis within an appropriate timescale and cost. The aim of this work was develop and optimize a reliable method for the determination of antibiotic residues in milk. For this purpose, the sample analysis was achieved with a QuEChERS method for extraction followed by ultra fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UFLC-MS). The operating conditions of UFLC-MS were optimized by different experimental designs. The factors analyzed included mobile phase composition, capillary voltage, desolvation

temperature, block temperature, drying and nebulizing gas flow rate. Finally, the optimized method was evaluated on fortified milk samples. It was found that the method detection levels are below the maximum residue limits for the most of the antibiotics.

Key words: chromatography, QuEChERS, veterinary drugs.

INTRODUCCIÓN.

En la actualidad, la seguridad alimentaria en el contexto de contaminantes en alimentos, se ha convertido en una de las áreas de mayor interés tanto para las entidades gubernamentales como para los consumidores. Para el caso específico de la leche, la presencia de medicamentos veterinarios como contaminantes viene asociada a la aparición de bacterias resistentes a estos medicamentos, efectos alergénicos, tóxicos, mutagénicos, teratogénicos, carcinogénicos, entre otros que afectan la salud humana (Paige, 1997). En Colombia, el empleo de medicamentos veterinarios, es una actividad que se ha dado principalmente por la necesidad de controlar parásitos y/o infecciones, hecho que se ve reflejado en el número relativamente alto de registros que el ICA tiene para este tipo de medicamentos (ICA,2013). Por ello, con el propósito de asegurar la protección al consumidor, a nivel mundial se ha establecido la necesidad de desarrollar herramientas analíticas que permitan realizar diagnósticos de alta confiabilidad en lo

referente a la presencia de residuos de estos medicamentos en productos alimenticios. En este sentido, el objetivo del presente trabajo es presentar los resultados obtenidos en el desarrollo y optimización de un método multiresiduo para el análisis de antibióticos en leche, mediante UFLC-MS.

MATERIALES Y MÉTODOS.

El análisis fue llevado a cabo en un cromatógrafo líquido ultra rápido Shimadzu Prominence, acoplado a un detector selectivo de masas LCMS-2020. Se empleó un generador de nitrógeno ABN2ZE Peak Scientific. Todos los análisis fueron realizados en modo SIM y en modo ESI. En una columna Shim Pack (6 cm × 2 mm d.i., tamaño de partícula de 2,1 μm y fase estacionaria C18). El volumen de inyección fue de 5 μL, la temperatura de la columna 40°C y el flujo de la fase móvil 0,3 mL/min. Se evaluaron diferentes composiciones de la fase móvil, así como diferentes solventes orgánicos: acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH). La extracción realizó a través del método QuEChERS (Arroyo, 2014). Para el proceso de optimización se emplearon diseños experimentales factoriales y completamente al azar, el nivel de significancia correspondió a 0,05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

El primer paso en la optimización fue el empleo de diferentes fases móviles y composiciones de estas, con el propósito de lograr la mejor separación de los compuestos, hecho

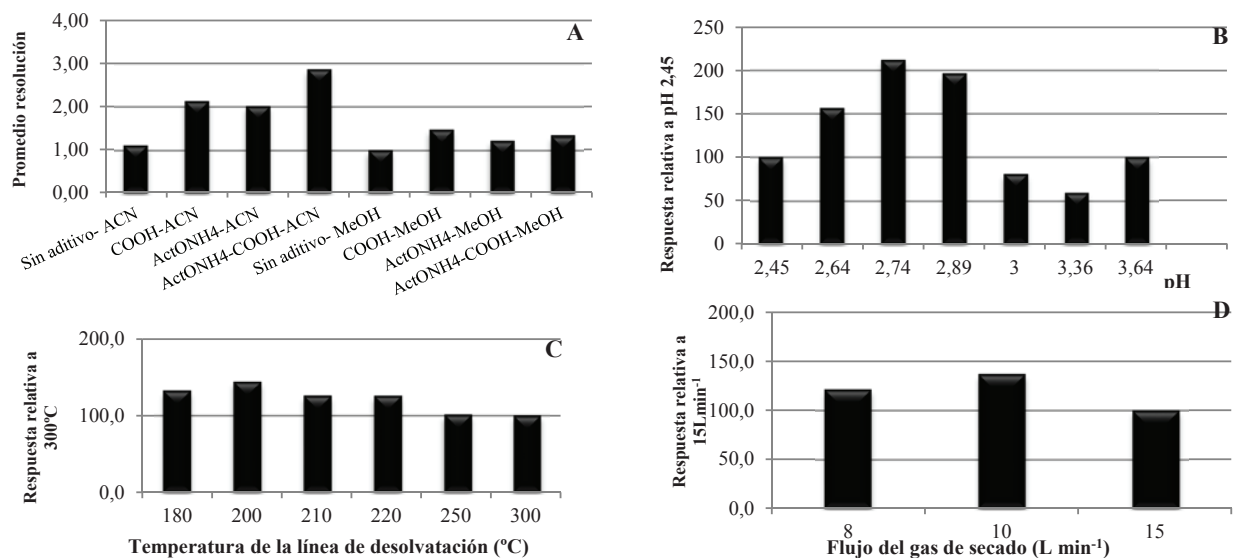


Figura 1. Optimización de las condiciones cromatográficas y de la interfaz. A. Composición del fase móvil. B. pH de la fase acuosa para el sistema AcONH₄-COOH-ACN. C. Temperatura de la línea de desolvatación. D. Flujo de gas de secado.

indispensable para este tipo de analitos (Barcellos, 2014). La Figura 1A muestra el promedio de las resoluciones cromatográficas para los diferentes sistemas estudiados. En esta Figura se observa que el empleo de MeOH en todos los casos ofrece bajas resoluciones, por ello se optó por ACN. La Figura 1A, muestra que el empleo de aditivos mejora la separación cromatográfica, siendo la combinación acetato de amonio-fórmico-acetonitrilo la mejor opción. La Figura 1B, muestra los resultados obtenidos para la optimización del pH de la fase móvil, en esta figura se puede observar que el mejor pH corresponde a 2,74.

La optimización del gas de secado, (Figura 1D) para la interfaz se realizó aplicando un diseño experimental factorial 5 (temperaturas) x 3(flujos) y la ionización de los analitos se optimizó a través de un diseño experimental 5(voltajes) x 2 (Flujos). Las Figuras 1C y 1D, muestran el promedio de las respuestas relativas a la temperatura y al flujo más altos. El análisis estadístico indicó que no existe interacción entre los factores estudiados ($p > 0,005$) y que hay diferencias estadísticas entre los flujos, las temperaturas y voltajes evaluados ($p < 0,005$), siendo las mejores condiciones 210 °C para la línea de desolvatación, 10 L min⁻¹ para el gas de secado, 4kV para el capilar y 1,5 Lmin⁻¹ para el gas nebulizador. Finalmente, se fortificaron muestras de leche a una concentración cercana a 50 µg kg⁻¹ y se determinaron los porcentajes de recuperación que se presentan en la Figura 2.

Al comparar los resultados de literatura, se encuentra que estos correlacionan con los resultados de otros métodos existentes, pues la determinación de tetraciclinas empleando sistemas líquido-líquido no son eficientes para la extracción de estos compuestos (Kaale E, 2008).

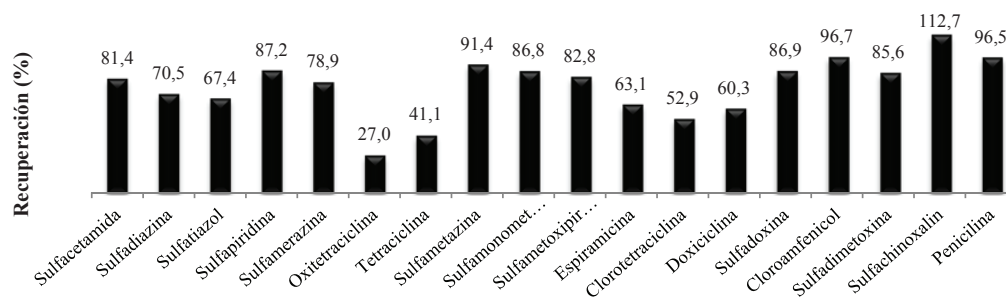


Figura 2. Resultados de porcentaje de recuperación de la evaluación del método optimizado.

CONCLUSIONES.

Se desarrolló un método multiresiduo para el análisis de residuos de antibióticos en leche, el método se optimizó a través de diseños factoriales, con lo cual se establecieron las mejores condiciones de operación del cromatógrafo y de la interfaz. El método mostró un buen desempeño al realizar la evaluación con muestras de leche fortificadas ya que para la mayoría de compuestos se obtuvieron porcentajes de recuperación entre el 70 y 120%. (Directive 96/23/EC).

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen a Colciencias por su financiación a través del proyecto No.120256135813.

BIBLIOGRAFÍA.

- Arroyo, N., L. Gámiz y A. García. 2014. Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC. *Analytical Methods* 143(15):459-464.
- Barcellos, R., F. Barreto, J. Melob, M. Targa, T. Pizzolato and M. Ruaro. 2014. Scope extension validation protocol: inclusion of analytes and matrices in an LC-MS/MS sulfonamide residues method. *Food Additives & Contaminants: Part A* 31(1): 39-47.
- ICA. 2014. Medicamentos veterinarios con registro vigente a 20 de Febrero de 2014. En: Instituto Colombiano de Agricultura <http://www.ica.gov.co/getdoc/8c3a3a0c-070f-4aaf-961b-776279e5cf27/Medicamentos-veterinarios.aspx>; consulta: Marzo 2014.
- Paige, J., L. Tollefson and M. Miller. 1997. Public health impact on drug residues in animal tissues, *Veterinary and Human Toxicology* 9:1-27.