

MONITORAGGIO DELLA PRESENZA DI RESIDUI DI CHINOLONI NEL LATTE: SVILUPPO DI UN METODO HPLC MULTIRESIDUO QUANTITATIVO

Quantitative determination of quinolones residues in milk by HPLC-FLD

Gili Marilena*, Marchis Daniela, Stella Paola, Olivo Fabio, Ostorero Federica, Franzoni Mauro, Abete Maria Cesarina

*Corresponding author: Tel: (+39)0112686235 ; Fax: (+39)0112686237. E-mail: marilena.gili@izsto.it
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Torino, Italia

ABSTRACT

Veterinary drugs have become an integral part of the livestock production and play an important role in maintenance of animal welfare. The use of veterinary medicines may be cause of the presence of drug residues in animal food products if appropriate withdrawal periods are not respected or if contaminated feeds are used. This work presents the development of an HPLC-FLD method for the quantitative detection of eight quinolones – norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, oxolinic acid, nalidixic acid, flumequine– in bovine milk. After deproteination and extraction with a metaphosphoric acid 1% w/v / methanol / acetonitrile (60/20/20 v/v/v) solution, the sample is partially evaporated and cleaned up on a reversed phase SPE cartridge. The extract is analyzed using an high performance liquid chromatograph with fluorescence detector. Mean recovery ranged between 65% - 88%. All the analytes can be identified and quantified in the concentration range 15 - 60 µg/Kg for danofloxacin and 25 - 150 µg/Kg for the other quinolones.

Keywords: Quinolones, milk, HPLC-FLD.

INTRODUZIONE

I chinoloni (Figura 1) sono chemioterapici antibatterici di sintesi caratterizzati da ampio spettro d'azione, in quanto esplicano la loro attività nei confronti di batteri Gram positivi e Gram negativi (Christian *et al.*, 1996; Dougherty *et al.*, 2001). Il loro utilizzo può determinare la presenza di residui negli alimenti di origine animale se non sono rispettati i tempi di sospensione o a seguito di fenomeni di contaminazione crociata nei mangimi. L'impatto sulla sicurezza alimentare è pertanto tale da aver indotto l'Unione Europea (UE) a stabilire regole riguardanti l'autorizzazione all'utilizzo dei farmaci negli animali in produzione e al controllo ufficiale degli alimenti, compresa la definizione di Limiti Massimi Residuali (LMR) dei farmaci ammessi. L'UE ha stabilito LMR nel latte bovino solo per cinque chinoloni: 30 µg kg⁻¹ per danofloxacina, 100 µg kg⁻¹ per enrofloxacina e ciprofloxacin, 50 µg kg⁻¹ per flumechina e 75 µg kg⁻¹ per marbofloxacina.

Gli Stati Membri della UE, per svelare le somministrazioni illecite o abusive e per verificare

la conformità dei residui agli LMR, programmano un costante monitoraggio attraverso il Piano Nazionale Residui (PNR), che prevede la ricerca di residui di chinoloni in muscolo, uova, latte e prodotti ittici. I campioni ufficiali, prelevati dall'autorità competente, sono analizzati in laboratori autorizzati attraverso metodi di screening e, in caso di positività, analizzati nuovamente con metodi di conferma.

In letteratura sono descritti diversi metodi per la ricerca di residui di chinoloni nel latte; le tecniche microbiologiche non hanno sensibilità adeguata a soddisfare i requisiti richiesti dalla normativa vigente; le tecniche immunochimiche (Haasnoot *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010), la cromatografia su strato sottile (TLC) (Chroma *et al.*, 1999; Juhel-Gaugain *et al.*, 1998), la gas cromatografia (GC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata con rivelatore spettrofluorimetrico (FLD), a sequenza di diodi (DAD) o a spettrometria di massa (MS) (Yorke *et al.*, 2000; Ramos *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2007; Ho *et al.*, 2004; Gigosos *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009; Bohm *et al.*, 2009) sono invece maggiormente sensibili e in alcuni casi ido-

nee ad un'inequivocabile identificazione degli analiti. Tuttavia questi metodi di solito comprendono solo una delle sottoclassi di chinoloni (derivati dell'acido piridoncarbossilico o fluoro-chinoloni con sostituente piperazinile al C-7).

Scopo del presente lavoro è stato lo sviluppo di un metodo di prova multiresiduale per la identificazione univoca e la determinazione quantitativa di residui di chinoloni di interesse veterinario nel latte a partire da livelli di concentrazione pari ad almeno la metà dei valori di LMR, ove fissati.

MATERIALI E METODI

5 g di latte sono estratti per due volte mediante agitatore ad inversione per 10 min con 20 mL di miscela acido metafosforico 1% acquoso/metanolo/acetonitrile (60/20/20 v/v/v); la precipitazione termica delle proteine è ottenuta mediante agitazione in bagno ad ultrasuoni per 10 min e successivamente in bagnomaria per 30 minuti a $50\pm 5^\circ\text{C}$.

L'estratto ottenuto è centrifugato per 15 minuti a 4000 rpm a 5°C e il surnatante è sottoposto a concentrazione in bagnomaria a $50\pm 5^\circ\text{C}$ sotto flusso d'azoto fino ad una riduzione del volume a circa 15 mL.

L'estratto concentrato è sottoposto a purificazione su colonne SPE polimeriche a fase inversa (60 mg, 3 mL Phenomenex Strata X) preconizionate sequenzialmente con 2 mL di metanolo e 2 mL di acqua ultrapura; dopo il caricamento del campione, le colonne sono lavate con 5 mL di soluzione metanolo HPLC/acido ortofosforico 0.025M acquoso a pH 3 (5/95 v/v) e poi con 5 mL di acqua ultrapura; gli analiti sono eluiti con 2 mL di metanolo. L'eluato è portato a secco in bagnomaria a $50\pm 5^\circ\text{C}$ in corrente d'azoto e il residuo è ripreso con 1 mL di miscela acido ortofosforico 0.025 M acquoso pH 3/acetonitrile (90/10 v/v) e sottoposto ad analisi HPLC-FLD. Gli estratti sono stabili a $2-8^\circ\text{C}$ per tre giorni.

L'analisi cromatografica è condotta su colonna Phenomenex LUNA C18 (250 x 3 mm, 5 μm) termostata a 20°C in un tempo totale di analisi di 36 minuti, con programma di eluizione a gradiente con fase mobile [A] acido ortofosforico 0.025 M acquoso pH 3 [B] acetonitrile, flusso di 0.4 mL/min e volume di iniezione di 10 μL ; il programma di eluizione e di rivelazione è riportato in Tabella 1.

RISULTATI

Durante la fase di sviluppo metodo oggetto del presente lavoro sono state effettuate prove preliminari volte ad ottimizzare la specificità, la ripetibilità e il recupero.

Il metodo di analisi sviluppato dal laboratorio

consente, attraverso una procedura relativamente semplice, di ottenere un efficace grado di purificazione del campione.

E' stato verificato che l'introduzione di una fase di sgrassatura dell'estratto grezzo con esano non produce significativi vantaggi in termini di eliminazione di interferenti di matrice e di aumento del recupero, mentre la centrifugazione dell'estratto a bassa temperatura consente una migliore purificazione del campione.

Per ottimizzare la procedura di purificazione, sono state confrontate diverse tipologie di colonnine SPE a fase inversa su supporto polimerico (60 mg, 3 mL): Varian Bond Elut ENV, Varian Bond Elut Plexa, Waters Oasis HLB e Phenomenex Strata X; i migliori risultati in termini di recupero e ripetibilità sono stati ottenuti con le colonne Phenomenex Strata X.

Durante le prove preliminari è stata evidenziata la presenza di un interferente di matrice presente in quasi tutti i campioni di latte, avente tempo di ritenzione molto vicino alla norfloxacina. La termostatazione della colonna HPLC a 20°C consente di migliorare notevolmente la specificità del metodo relativamente a questo interferente significativo di matrice, che a temperature maggiori co-eluisce con la norfloxacina; inoltre determina un aumento della risoluzione tra i picchi, consentendo un'ottima separazione di tutti gli analiti in un'unica corsa cromatografica (Figura 2a e 2b).

L'utilizzo di una colonna HPLC a diametro interno di 3 mm permette un considerevole risparmio di solventi; determina inoltre un aumento della risposta strumentale in termini di intensità del segnale, per cui gli analiti possono essere quantificati a livelli di concentrazione molto minori del valore di LMR, ove fissati, in modo da evidenziare anche fenomeni di trattamento non dichiarato nel registro aziendale dei farmaci: la quantificazione degli analiti avviene infatti in un range di concentrazione nel campione tra 15 e 60 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ per la danofloxacina e tra 25 e 150 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ per gli altri chinoloni. Come rivelatore è stato scelto il fluorimetro (FLD), in quanto presenta sensibilità molto maggiore del rivelatore a sequenza di diodi (DAD); poiché gli strumenti moderni consentono la registrazione dello spettro di assorbimento o di emissione in fluorimetria, tali spettri costituiscono un importante strumento per la conferma dell'identità della molecola.

La verifica delle prestazioni del metodo attraverso il processo di validazione è ancora in corso: dati preliminari indicano che il recupero medio è compreso tra 65% e 88%.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il metodo sviluppato permette l'identificazione e

la determinazione quantitativa di residui di chinoloni di interesse veterinario in latte mediante HPLC con rivelatore FLD. La procedura definita consente la ricerca di residui di chinoloni attraverso tecniche analitiche adatte a processare in parallelo più campioni e sufficientemente sensibili da soddisfare i requisiti richiesti dalle norme europee vigenti. Il metodo può essere utilizzato sia per analisi di screening che di conferma, in quanto il rivelatore FLD permette l'identificazione univoca dell'analita basata su tecniche di spettroscopia molecolare. La semplicità del metodo, i brevi tempi di esecuzione della prova e i ridotti costi lo rendono utilizzabile per le normali analisi di routine nell'ambito dei controlli ufficiali.

BIBLIOGRAFIA

- Bohm D.A., Stachel C.S., Gowik P. 2009. *J. Chromatogr. A* 1216: 8217
- Christian J. S. 1996. MD, Primary Care Update for OB/GYNS, 3: 87
- Chroma I., Grenda D., Malinowska I., Supryniewicz Z. 1999. *J. Chromatogr. B* 734: 7
- Dougherty T. J., Beaulieu D., Barrett J. F. 2001. *D.D.T.* 6: 529
- Gigosos P.G., Revesado P.R., Cadahia O., Fente C.A., Vazquez B.I., Franco C.M., Cepeda A. 2000. *J. Chromatogr. A* 871: 31
- Haasnoot W., Gerçek H., Cazemier G., Nielen M. W.F. 2007. *Anal. Chim. Acta* 586: 312
- Ho C., Sin D. W.M., Tang H. P.O., Chung L. P.K., Siu S. M.P. 2004. *J. Chromatogr. A* 1061: 123
- Juhel-Gaugain M., Abjean J.P. 1998. *Chromatographia* 47: 101
- Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C. 2004. *J. Chromatogr. A* 1034: 25–32.
- Ramos M., Aranda A., Garcia E., Reuvers T., Hooghuis H. 2003. *J. Chromatogr. B* 789: 373
- Yorke J.C., Froc P. 2000. *J. Chromatogr. A* 882: 63
- Van Hoof N., De Wasch K., Okerman L., Reybroeck W., Poelmans S., Noppe H., De Brabander H. 2005. *Anal. Chim. Acta* 529: 265–272.
- Wang Y., Shen Y. D., Xu Z.L., Lei H.T., Wang H., Sun Y.M. 2010. *J. Anal. Chem.* 38: 313
- Zhang H., Ren Y., Bao X. 2009. *J. Pharm. Biom. Anal.* 49: 367
- Zhao S. J., Jiang H. Y., Ding S. Y., Li X. L., Wang G. Q., Li C., Shen J. Z. 2007. *Chromatographia* 65: 539

Figura 1. Chinoloni e fluorochinoloni di interesse veterinario

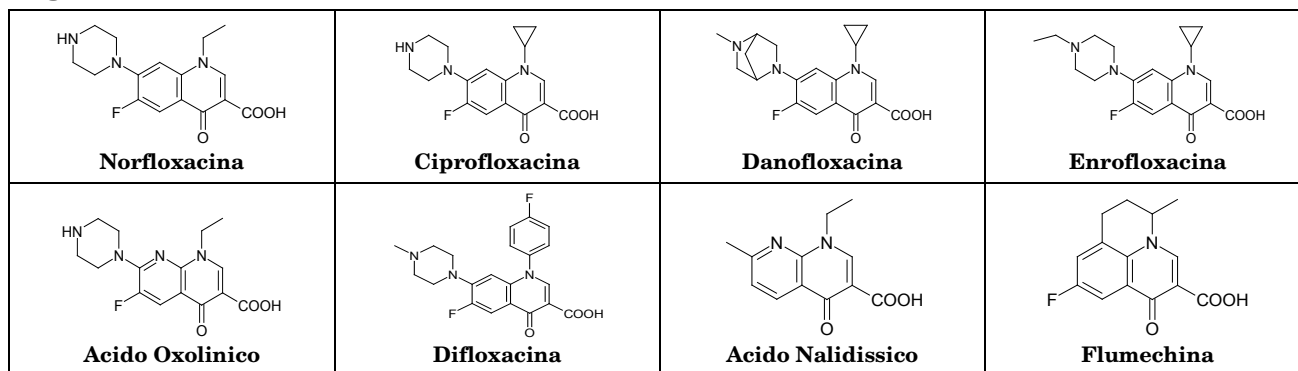


Tabella 1. Condizioni strumentali HPLC/FLD

Detector FLD	Tempo (minuti)	λ eccitazione (nm)	λ emissione (nm)	Gain
	0.0	278	450	11
	19.49	278	450	11
	19.50	252	370	13
	26.0	252	370	13
Programma eluizione a gradiente	Tempo (minuti)		% A	% B
	0.0		85	15
	10.0		80	20
	14.0		60	40
	25.0		60	40
	26.0		85	15

Figura 2a. cromatogramma di una soluzione di tutti gli analiti in solvente

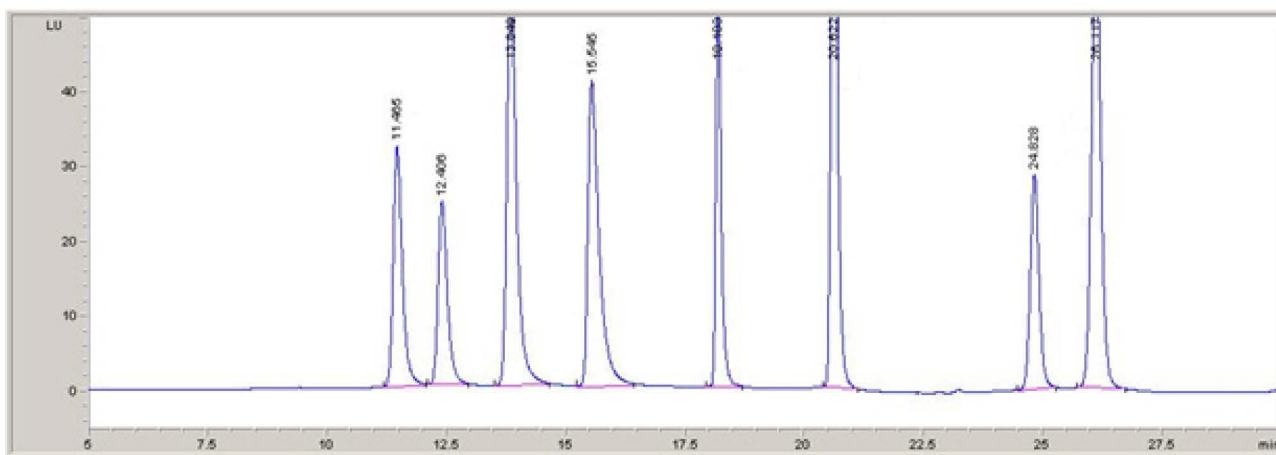


Figura 2b. cromatogramma di un estratto di latte fortificato con tutti gli analiti; a.: norfloxacin; b.: ciprofloxacin; c.: danofloxacin; d.: enrofloxacin; e.: difloxacin; f.: oxolinic acid; g.: nalidixic acid; h.: flumequine.

