

Multiresidue confirmatory method for determination of quinolones in milk by HPLC: method development and validation according to the criteria of Commission Decision 2002/657/EC

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

Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta,
Torino, Italy

Abstract

Veterinary drugs have become an integral part of the livestock production and play an important role in maintaining 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 high performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization (HPLC-FLD) method for the quantitative detection of eight quinolones – norfloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, oxolinic acid, nalidixic acid, and 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 solid phase extraction (SPE) cartridge. The extract is analyzed using an HPLC-FLD. Mean recovery ranged between 65-88%. The method is validated as a confirmatory method according to Decision 2002/657/EC. All the verified parameters (linearity, selectivity/specificity, trueness, precision, CC, CC, ruggedness and stability) were satisfactory and the method is able to quantify all the analytes in milk in the concentration range 15-60 µg/Kg for danofloxacin and 25-150 µg/Kg for the other quinolones.

Introduzione

I chinoloni 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, 1996; Dougherty *et al.*, 2001); sono composti caratterizzati da una

struttura chimica comune consistente in un eterociclo aromatico con anelli condensati, un gruppo chetonico in posizione 4, una funzione carbossilica in posizione 3 e un sostituente in posizione 1 costituito da etile, ciclo propile o anello condensato (Figura 1). I chinoloni sono autorizzati in medicina veterinaria per il trattamento delle infezioni urinarie, della diarrea da salmonella e shigella, delle infezioni respiratorie da Haemophilus, streptococcus e pseudomonas. Sono somministrati come forma farmaceutica o in mangimi medicati e acqua di abbeverata.

Un utilizzo massivo, improprio o abusivo di antibiotici in zootecnica è causa sia di sviluppo di ceppi batterici resistenti e trasmissibili all'uomo attraverso gli alimenti, sia di presenza residuale di farmaci negli alimenti di origine animale. Il regolamento 470 della Commissione Europea (2009) definisce come residui di farmaci *tutte le sostanze farmacologicamente attive, espresse in mg/Kg o µg/Kg, e i loro metaboliti che rimangono negli alimenti ottenuti da animali*. L'impiego di farmaci negli animali da reddito deve avvenire in modo da garantire che, al momento del consumo, l'alimento non contenga residui in quantità nociva per il consumatore. L'impatto sulla sicurezza alimentare è pertanto tale da aver indotto l'Unione Europea (UE) a stabilire precise regole in merito all'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 autorizzati. Il regolamento 37 della Commissione Europea (2010) ha stabilito LMR nel latte bovino solo per cinque chinoloni: 30 µg kg⁻¹ per danofloxacin, 100 µg kg⁻¹ per enrofloxacin e ciprofloxacin, 75 µg kg⁻¹ per marbofloxacin e 50 µg kg⁻¹ per flumechina.

L'Italia, analogamente agli altri stati membri, per svelare le somministrazioni illecite o non registrate e per verificare la conformità degli alimenti agli LMR, programma 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. I metodi di screening sono applicati nell'analisi preliminare di routine su un numero elevato di campioni con lo scopo di evidenziare quelli sospetti: per tale motivo, sono metodiche di facile impiego, basso impatto economico e che non richiedono l'utilizzo di apparecchiature sofisticate. I metodi di conferma devono fornire informazioni specifiche sugli analiti ricercati in modo da consentire un'identificazione univoca degli stessi ed eventualmente una loro quantificazione, hanno costi più elevati rispetto a quelli di screening, richiedono strumenta-

Correspondence: Marilena Gili, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, via Bologna 148, 10154 Torino, Italy.
Tel. +39.011.2686235 - Fax: +39.011.2686237.
E-mail: marilena.gili@izsto.it

Key words: Quinolones, Milk, HPLC-FLD, Validation.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Received for publication: 15 January 2013.

Revision received: 11 February 2013.

Accepted for publication: 22 February 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright M. Gili *et al.*, 2013

Licensee PAGEPress, Italy

Italian Journal of Food Safety 2013; 2:e9

doi:10.4081/ijfs.2013.e9

zioni analitiche complesse e specifica formazione degli operatori.

La decisione 657 della Commissione Europea (2002) definisce le caratteristiche dei metodi da utilizzare per le prove di screening e di conferma nell'ambito dei controlli ufficiali e i parametri da verificare durante la validazione dei metodi che ogni laboratorio deve effettuare prima di trasferirli in routine. Il regolamento 882 della Commissione Europea (2004) richiede che i laboratori che partecipano all'analisi di campioni ufficiali utilizzino procedure analitiche accreditate in conformità alla norma ISO/IEC 17025 (ISO, 1999).

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 e Abejan, 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) (Gigosos *et al.*, 2000; Yorke e Froc, 2000; Ramos *et al.*, 2003; Ho *et al.*, 2004; Marazuela e Moreno-Bondi, 2004; Van Hoof *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007; Bohm *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009) sono invece maggiormente sensibili e in taluni casi idonee a una inequivocabile identificazione degli analiti. Tuttavia questi metodi di solito comprendono solo una delle sottoclassi di chinoloni (derivati dell'acido piridoncarbossilico o fluorochinoloni con sostituente piperazinile al C-7). Da quanto esposto emerge la necessità di sviluppare metodi di analisi di screening e di

conferma per la ricerca e la determinazione quantitativa dei chinoloni nel latte, rapidi e al tempo stesso accurati e sensibili, in accordo con quanto indicato nel PNR.

Nel presente lavoro è descritto lo sviluppo e la validazione di un metodo di prova multiresiduale per l'identificazione e la determinazione quantitativa di chinoloni di interesse veterinario (acido oxolinico, acido nalidissico, flumechina, norfloxacina, enrofloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina e difloxacina) nel latte mediante HPLC-FLD.

Materiali e Metodi

Reagenti

Tutti i reagenti utilizzati sono di grado analisi o HPLC (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Gli standard degli analiti sono di purezza certificata non inferiore al 98% (Sigma Aldrich). Per la purificazione di estrazione in fase solida (SPE) sono state utilizzate colonnine a fase inversa su supporto polimerico Strata X 60 mg, 3 mL (Phenomenex, Torrance, CA, USA).

Soluzioni

Le soluzioni madri di ciascun analita, alle concentrazioni nominali di 200 ng μL^{-1} in idrossido di sodio 0,01 M acquoso, sono stabili per un anno a $2\pm 8^\circ\text{C}$ al buio. La soluzione intermedia MIX degli analiti in metanolo, alla concentrazione di 5 ng μL^{-1} per danofloxacina e 20 ng μL^{-1} per gli altri chinoloni, è stabile per sei mesi a $2\pm 8^\circ\text{C}$ al buio.

La miscela di estrazione è costituita da acido metafosforico acquoso 1% (p/v)/metanolo/acetonitrile (60/20/20 v/v/v), stabile a $2\pm 8^\circ\text{C}$ per 6 mesi. La miscela di lavaggio per le colonnine SPE è costituita da metanolo/acido ortofosforico 0,025 M acquoso a pH 3 (5/95 v/v), stabile a $2\pm 8^\circ\text{C}$ per 1 mese. La fase mobile A per HPLC è acido ortofosforico 0,025 M acquoso a pH 3, stabile a $2\pm 8^\circ\text{C}$ per 1 mese. Gli estratti purificati sono risospesi in miscela di ripresa costituita da fase mobile A/acetonitrile (90/10 v/v), stabile a $2\pm 8^\circ\text{C}$ per 1 mese.

Caratteristiche dei campioni di prova

Le prove di sviluppo e validazione del metodo sono state condotte su campioni di latte crudo bovino. I campioni sono stati prelevati dai servizi veterinari delle aziende sanitarie locali (AA.SS.LL) direttamente in allevamento e conferiti al laboratorio. Prima dell'utilizzo è stata verificata su ciascun campione l'assenza di residui dei chinoloni ricercati.

Apparecchiature

L'analisi cromatografica è eseguita mediante cromatografo liquido Agilent 1200 (Agilent Tech., Atlanta, GA, USA), equipaggiato con pompa quaternaria, termostato per colonne,

autocampionatore e rivelatori DAD e FLD. Il detector FLD è impostato a lunghezza d'onda di eccitazione (I_{ex}) di 278 nm e lunghezza d'onda di emissione (I_{em}) di 450 nm per norfloxacina, ciprofloxacina, danofloxacina, enrofloxacina, difloxacina e a I_{ex} di 252 nm e I_{em} di 370 nm per acido oxolinico, acido nalidissico e flumechina. La separazione HPLC è condotta su colonna RP 18 (250x3,0 mm i.d. - 5 μm) Luna[®] C18 munita di precolonna C18 (4x3 mm i.d.) (Phenomenex), termostata a 20°C , in un tempo totale di analisi di 36 min.

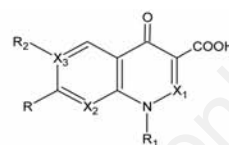
Come eluenti si utilizzano: i) acido ortofosforico 0,025 M acquoso pH 3, ii) acetonitrile,

a flusso di 0,4 mL/min secondo un programma di eluizione a gradiente. Il volume di iniezione è di 10 μL (Tabella 1).

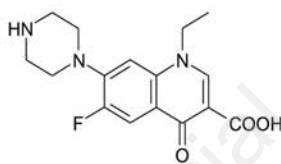
Preparazione del campione

Cinque g di latte sono estratti mediante agitatore ad inversione per 10 min con 20 mL di miscela di estrazione; la precipitazione termica delle proteine è ottenuta mediante agitazione in bagno ad ultrasuoni per 10 min e successivamente in bagnomaria per 30 min a $50\pm 5^\circ\text{C}$.

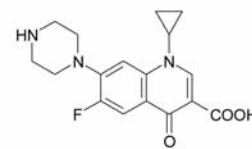
Dopo centrifugazione per 15 min a 4000 rpm a 5°C , il surnatante è trasferito in provetta di polipropilene da 50 mL e il residuo è estratto



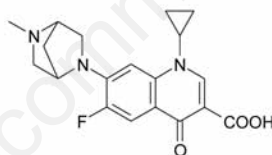
STRUTTURA CHIMICA di base



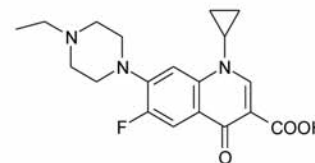
Norfloxacina



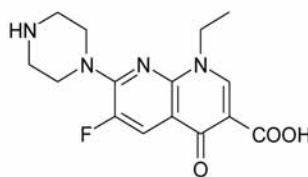
Ciprofloxacina



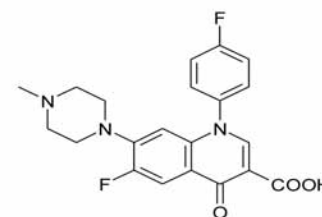
Danofloxacina



Enrofloxacina



Acido Oxolinico



Difloxacina

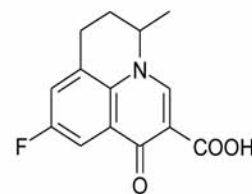
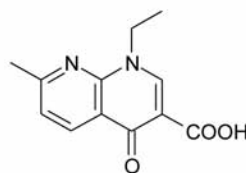


Figura 1. Formule di struttura dei chinoloni considerati.

nuovamente con 20 mL di miscela di estrazione su agitatore a inversione per 10 min. Dopo centrifugazione per 15 min a 4000 rpm a 5°C, il surnatante è riunito al precedente e sottoposto a concentrazione in bagnomaria a 50±5°C sotto flusso d'azoto fino a una riduzione del volume a circa 15 mL.

L'estratto concentrato è sottoposto a purificazione su colonne SPE Strata X (60 mg, 3 mL) 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 di lavaggio 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±5°C in corrente d'azoto e il residuo è ripreso con 1 mL di miscela di ripresa, filtrato con filtri da 0,2 µm e sottoposto ad analisi HPLC.

Studio di validazione

La validazione del metodo è stata condotta in accordo ai requisiti della decisione 657 della Commissione Europea (2002) per i metodi di conferma; per tutti gli analiti sono stati verificati i seguenti indici di prestazione: linearità della risposta strumentale, specificità, limite di decisione ($CC\alpha$), capacità di rivelazione ($CC\beta$), precisione (ripetibilità e riproducibilità intralaboratorio), esattezza/recupero, robustezza, stabilità e incertezza di misura.

La linearità della risposta strumentale è stata valutata approntando una curva di taratura in solvente, costruita iniettando 3 volte 5 punti di concentrazione degli standard (0,05; 0,10; 0,20; 0,50 e 1,00 ng µL⁻¹); poiché il fattore di risposta della danofloxacina è molto elevato, al fine di evitare fenomeni di saturazione del segnale la concentrazione della danofloxacina è ¼ degli altri analiti (0,0125; 0,025; 0,050; 0,125; 0,250 ng µL⁻¹). La retta area del picco *vs* concentrazione di analita è stata calcolata mediante l'algoritmo dei minimi quadrati non pesati; mediante la funzione Excel *Reglin* sono stati calcolati i parametri della retta, utilizzati per la valutazione del coefficiente di determinazione (R^2), del limite di rilevabilità X_a (minima concentrazione significativamente diversa da zero) e della significatività dell'intercetta.

La specificità è stata studiata analizzando 22 diversi campioni di latte bovino e verificando l'assenza di interferenti significativi nel range $R_t=R_t$ medio dello standard nella curva in solvente ±2,5% R_t .

Le prove per la verifica del recupero e della precisione del metodo sono state condotte su campioni fortificati con tutti gli analiti ai livelli di concentrazione in matrice indicati in Tabella 2. Per le prove è stato utilizzato un identico campione ottenuto da un pool di latte di massa risultato negativo. Sono state effettuate 3 sessioni di analisi a distanza di almeno una settimana: in ciascuna seduta sono stati

analizzati 6 replicati per ogni livello di concentrazione, per un totale di 72 prove indipendenti. L'accuratezza del metodo è stata espressa in termini di recupero percentuale e la precisione, come ripetibilità (*intra-day*) e riproducibilità intralaboratorio (*inter-day*), è stata espressa come deviazione standard relativa (RSD)%. Per ogni prova è stata calcolata la concentrazione di analita con il metodo della standardizzazione esterna mediante curva di taratura in solvente e quindi il recupero percentuale medio per ogni livello di concentrazione. Con un test di analisi della varianza a un fattore (ANOVA) sono stati determinati i valori di scarto tipo di ripetibilità (sr) e di riproducibilità intralaboratorio (Sr) per i singoli livelli e i corrispondenti RSD%. Dai valori di Sr ottenuti

sono stati calcolati il limite di decisione $CC\alpha_{LMR}$ e la capacità di rivelazione $CC\beta_{LMR}$ per gli analiti con LMR e $CC\alpha_{C_0}$ e $CC\beta_{C_0}$ per gli analiti senza LMR.

La stabilità delle soluzioni madri è stata valutata per un anno, confrontando i valori ottenuti dalla determinazione eseguita sulla soluzione conservata con i valori ottenuti per soluzioni preparate al momento della determinazione, allo scopo di verificare l'assenza di variazioni significative (-10%) nella risposta strumentale.

La robustezza del metodo ai cambiamenti minori è stata valutata applicando l'approccio di Youden (*fractional factorial design*): una volta individuati i fattori che possono teoricamente influenzare i risultati delle prove, questi

Tabella 1. Condizioni strumentali della cromatografia liquida ad alte prestazioni.

	Tempo (min.)	A	B	Rampa
Programma gradiente eluizione	0,00	85	15	
	10,00	80	20	Linear
	14,00	60	40	Linear
	25,00	60	40	
	26,00	85	15	Linear
	Tempo (min.)	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)	Gain
Rivelatore FLD	0,00	278	450	11
	19,49	278	450	11
	19,50	252	370	13
	26,00	252	370	13
	Tempo (min.)	λ (nm)	Ref (nm)	
Rivelatore DAD	0,00	280	450	
	19,49	280	450	
	19,50	260	450	
	26,00	260	450	

A, acido ortofosforico 0,025 M acquoso pH 3; B, acetonitrile a flusso di 0,4 mL/min secondo un programma di eluizione a gradiente; rivelatore FLD, rivelatore spettrofluorimetrico; rivelatore DAD, rivelatore a sequenza di diodi.

Tabella 2. Livelli di concentrazione per ogni analita considerati durante la validazione

Analita	Livello (µg kg ⁻¹)			
	1°	2°	3°	4°
Norfloxacina	25	50	75	100
Ciprofloxacina*	25	50	100 (MRL)	150
Enrofloxacina*				
Danofloxacina	15	30 (MRL)	45	60
Difloxacina	25	50	75	100
Acido ossolinico	25	50	75	100
Acido nalidissico	25	50	75	100
Flumechina	25	50 (MRL)	75	100

MRL, maximum residue limits. *Per ciprofloxacina e enrofloxacina il valore di MRL è dato come somma dei due analiti.

vengono variati di un massimo di $\pm 10\%$ del loro valore nominale. Le variabili considerate nella valutazione della robustezza sulla matrice latte sono state: composizione della miscela di estrazione, temperatura di estrazione in bagnomaria, temperatura di 1° evaporazione in bagnomaria, tipologia colonnine SPE, volume lavaggio SPE, volume eluizione SPE e temperatura di evaporazione eluato. Come indicato in Tabella 3, sono stati condotti 8 esperimenti su un campione di latte fortificato con tutti gli analiti (Youden e Steiner, 1975).

Relativamente alla incertezza di misura, il documento SANCO/2004/2726 Rev.2 ribadisce che essa è compresa nel valore di CC. Poiché però il metodo produce risultati quantitativi anche al di sotto del valore di LMR, è stata stimata l'incertezza al livello di concentrazione C_0 (sicuramente il più critico per la quantificazione) mediante l'approccio *bottom-up* integrato proposto dalla guida Eurachem (Eurachem, 2000).

Risultati

Sviluppo del metodo

Il metodo di analisi descritto consente, attraverso una procedura relativamente semplice, di ottenere un efficace grado di purifica-

zione del campione.

Tra le varie miscele di estrazione descritte in letteratura, il miglior solvente di estrazione è risultato la miscela acido metafosforico 1% acquoso/metanolo (60:40 v/v). Questa miscela di estrazione ha dimostrato elevato potere estraente nei confronti degli analiti ricercati,

Tabella 3. Test di robustezza ai cambiamenti minori: fattori valutati e variazioni.

Variabili	Method level	High level	Low level
Composizione miscela di estrazione (acido metafosforico/metanolo/acetonitrile)	60/20/20	56/22/22	65/18/18
Temperatura estrazione in bagnomaria (°C)	50	55	45
Temperatura di 1° evaporazione in bagnomaria (°C)	55	60	50
Tipologia colonne SPE	Strata X	Strata X	Varian
Volume lavaggio SPE (mL)	5,0	5,5	4,5
Volume eluizione SPE (mL)	2,0	2,2	1,8
Temperatura evaporazione eluato (°C)	55	60	50

SPE, solid phase extraction.

Tabella 4. Valori di recupero medio percentuale, ripetibilità, riproducibilità intralaboratorio e limiti analitici.

Analita	Livello di concentrazione	Recupero (%)	RSD% ripetibilità stretta	RSD% riproducibilità intralaboratorio	CC _{CCO} (µg/kg)	CC _{LMR} (µg/kg)	CC _β (µg/kg)
Norfloxacin	1°	73	3,6	10,6	32	-	37
	2°	85	3,6	6,9			
	3°	81	2,9	18,3			
	4°	84	3,5	18,6			
Ciprofloxacina	1°	65	6,8	13,1	-	106	112
	2°	70	4,5	13,5			
	3°	67	4,5	13,5			
	4°	66	2,6	10,5			
Danofloxacina	1°	79	3,9	15,49	-	40	52
	2°	82	2,4	19,62			
	3°	79	3,2	9,18			
	4°	79	4,3	10,97			
Enrofloxacina	1°	85	4,1	6,54	-	107	114
	2°	85	2,2	2,03			
	3°	82	2,0	4,21			
	4°	79	2,4	7,21			
Difloxacina	1°	85	4,6	19,9	37	-	49
	2°	88	3,1	11,6			
	3°	83	2,6	5,0			
	4°	82	3,4	3,1			
Ac. oxolinico	1°	71	4,8	24,7	42	-	59
	2°	82	3,8	23,7			
	3°	81	3,9	12,3			
	4°	80	4,5	17,8			
Ac. nalidixico	1°	88	4,4	10,0	32	-	37
	2°	85	4,5	20,5			
	3°	83	4,0	9,5			
	4°	83	3,4	12,2			
Flumechina	1°	85	5,9	16,3	-	64	82
	2°	85	3,4	17,1			
	3°	83	3,3	8,5			
	4°	83	3,8	14,5			

RSD, deviazione standard relativa; Ac. Oxolinico, acido oxolinico; Ac. Nalidixico, acido nalidixico.

unitamente all'azione deproteinizzante e alla ridotta capacità estrattiva verso composti interferenti, soprattutto di natura lipidica, che possono compromettere la successiva fase di purificazione ostruendo le cartucce di estrazione in fase solida (SPE). Successive prove hanno dimostrato che l'introduzione di una percentuale di acetonitrile nella miscela di estrazione migliora il recupero e la ripetibilità e riduce i tempi di evaporazione dell'estratto grezzo, per cui la composizione ottimale della miscela di estrazione risulta composta da acido metafosforico 1% acquoso/metanolo/acetonitrile (60:20:20 v/v/v). Prima della fase di purificazione è necessario eliminare quasi completamente il metanolo presente nell'estratto attraverso evaporazione in bagnomaria in corrente di azoto, poiché la presenza del metanolo determina perdita dell'analita nella fase di purificazione SPE.

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; invece 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 (Phenomenex).

Durante le prove preliminari è stata evidenziata la presenza frequente di un componente di matrice che interferisce significativamente con la norfloxacina. La termostatazione della colonna HPLC a 20°C consente di migliorare notevolmente la specificità del metodo relativamente a questo interferente; inoltre determina un aumento della risoluzione tra i picchi, consentendo un'ottima separazione di tutti gli analiti in un'unica corsa cromatografica (Figure 2A,B,C).

Per ottimizzare la separazione HPLC sono state confrontate diverse tipologie di colonne a fase inversa (250×4.6 mm, 5 µm): Supelcosil LC 18, Macherey Nagel Nucleosil C18, Supelco Discovery e Phenomenex Luna C18 (Phenomenex). Le prime due colonne hanno mostrato scarsa capacità di risoluzione e i picchi risultano asimmetrici, larghi e non ben separati; la colonna Discovery ha dato buoni risultati; le prestazioni migliori sono state ottenute con la colonna Luna, caratterizzata da elevato grado di *endcapping* e basso contenuto di metalli che possono causare allargamento e asimmetria dei picchi.

L'utilizzo di una colonna HPLC a diametro interno di 3 mm anziché 4.6 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.

Quando si effettuano sequenze analitiche lunghe e dopo un periodo di utilizzo della colonna, si nota una variazione non trascurabile del tempo di ritenzione degli analiti tra inizio e fine seduta; il problema si ritiene sia dovuto alla presenza di componenti lipidiche della matrice passate nell'estratto e si ovvia applicando al termine di ogni seduta una corsa di lavaggio di almeno 90 min con acetonitrile alla temperatura di 40°C.

Come rivelatore è stato scelto di utilizzare

l'FLD sia nelle prove di screening che in quelle di conferma, in quanto presenta sensibilità molto maggiore rispetto al DAD e risulta idoneo come tecnica analitica per prove di conferma secondo la decisione 657 della Commissione Europea (2002); come ausilio per l'identificazione della molecola, si può utilizzare anche il confronto degli spettri di fluorescenza in emissione registrati con l'FLD e degli spettri UV-VIS registrati col DAD di standard e campioni.

Nella fase di sviluppo del metodo erano state ottimizzate anche le condizioni di rivelazione della marbofloxacina in solvente: il massimo di emissione in fluorescenza si ottiene impostando λ_{ecc} a 290 nm e λ_{em} a 500 nm; tuttavia non è stato possibile inserire la marbofloxacina tra gli analiti da ricercare in quanto si è riscontrato

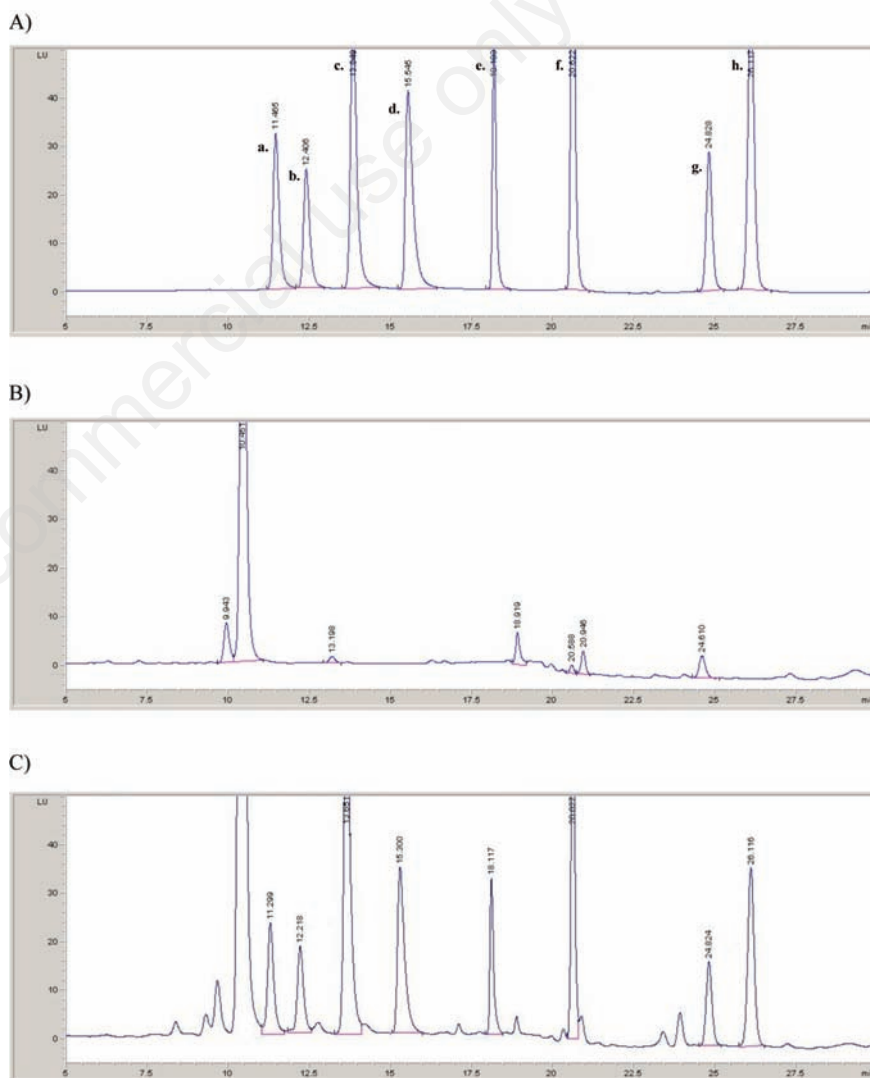


Figura 2. Esempio di cromatogramma: A) soluzione standard a 0.125 ng μL^{-1} per danofloxacina e 0.5 ng μL^{-1} per gli altri chinoloni; B) estratto di latte negativo; C) estratto di latte fortificato al primo livello di validazione. Chinoloni: a, norfloxacina; b, ciprofloxacina; c, danofloxacina; d, enrofloxacina; e, difloxacina; f, acido oxolinico; g, acido nalidissico; h, flumechina.

ta la presenza di forti interferenti di matrice in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'analita.

Studio di validazione

La linearità della risposta strumentale è stata verificata nel range tra 0,0125 e 0,250 ng L⁻¹ (2,50-50,0 g kg⁻¹ in matrice) per danofloxacina e tra 0,05 e 1,00 ng L⁻¹ (10,0-200 g kg⁻¹ in matrice) per gli altri analiti. In tutti i casi il coefficiente di determinazione (R²) risulta superiore a 0,999, la dispersione dei fattori di risposta è compresa nel range (Y/X) medio ±10%, il punto più basso di concentrazione è maggiore del limite di rilevabilità e l'intercetta non è significativamente diversa da zero.

Relativamente alla specificità, si è evidenziato un interferente sempre presente nel range di tempo di ritenzione della norfloxacina, ma il cui picco risulta sufficientemente separato da quello dell'analita; in alcuni casi è presente un interferente prossimo alla danofloxacina, di intensità non elevata ma che può causare scodamento del segnale dell'analita; in prossimità del tempo di eluizione dell'acido oxolinico si rilevano in alcuni casi due segnali compresi nella finestra di Rt, di cui il più intenso può contribuire talvolta a formare una spalla sulla destra del segnale analitico; nella finestra di Rt dell'acido nalidissico talvolta è presente un segnale relativo ad un componente della matrice che però non crea alcun problema all'integrazione del picco analitico (Figura 2B).

I dati di recupero medio percentuale non sono significativamente differenti per i vari livelli di concentrazione e sono compresi tra 65 e 88%; i valori di RSD% di ripetibilità e di riproducibilità intralaboratorio risultano in tutti i casi conformi ai requisiti della decisione 657 della Commissione Europea (2002) in quanto soddisfano l'equazione di Horwitz (Horwitz, 1982); i valori di CCα e CCβ indicano che il metodo ha sufficiente capacità di evidenziare campioni non conformi (Tabella 4).

Il test di Youden ha evidenziato che il metodo risulta robusto, in quanto nessuna delle variabili considerate influenza in modo significativo il risultato. Le soluzioni madri risultano stabili per almeno un anno conservate a 2-8°C e gli estratti conservati a 4°C risultano stabili per almeno 7 giorni.

Applicazione del metodo ai controlli ufficiali

Dopo la validazione, il metodo è stato utilizzato per analisi su latte di massa nell'ambito dei controlli ufficiali previsti dal Piano Nazionale Residui (PNR). Poiché in ogni seduta analitica come controllo di qualità è stato inserito un campione fortificato con tutti gli analiti al livello C₀, è stato possibile monitorare il mantenimento delle prestazioni del metodo per circa un anno: con i dati del recupero di validazione al

livello C₀ è stata redatta una carta di controllo tipo Shewart, utilizzata in seguito nelle analisi di routine per riportare i dati dei controlli fortificati di seduta; i valori di recupero ottenuti in routine per i campioni di controllo in più di 30 sessioni di analisi erano tutti nel range Rec_{medio} ±2 s della carta di controllo.

Discussione

Il metodo sviluppato permette l'identificazione e la determinazione quantitativa di residui di otto chinoloni di interesse veterinario in latte mediante HPLC con rivelatore FLD. La procedura prevede l'utilizzo di 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 (spettro di emissione) in accordo con i requisiti richiesti dalla decisione 657 della Commissione Europea (2002). Il metodo consente la quantificazione degli analiti nel latte in un range di concentrazione nel campione tra 15 e 60 µg/Kg per danofloxacina e tra 25 e 150 µg/Kg per gli altri chinoloni. Inoltre la strumentazione richiesta, rappresentata da un HPLC con rivelatore FLD, rientra nella normale dotazione dei laboratori chimici.

Conclusioni

La semplicità del metodo, i brevi tempi di esecuzione della prova e i ridotti costi lo rendono utilizzabile per le normali analisi di routine; la validazione rende il metodo idoneo nell'ambito dei controlli ufficiali.

Bibliografia

Bohm DA, Stachel CS, Gowik P, 2009. Multi-method for the determination of antibiotics of different substance groups in milk and validation in accordance with Commission Decision 2002/657/EC. *J Chromatogr A* 1216:8217-23.

Commissione Europea, 2002. Decisione del 12/08/2002 che attua la direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati, 657/2002/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 221/8, 17/08/2002.

Commissione Europea, 2004. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del

29/04/2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali, 882/2004/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 165/1, 30/04/2004.

Commissione Europea, 2009. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del 06/05/2009 che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio e modifica la direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, 470/2009/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 152/11, 16/06/2009.

Commissione Europea, 2010. Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22/12/2009 concernente le sostanze farmacologicamente attive e la loro classificazione per quanto riguarda i limiti massimi di residui negli alimenti di origine animale, 37/2010/CE. In: *Gazzetta Ufficiale*, L 15, 20/01/2010.

Christian JS, 1996. The quinolone antibiotics. *Prim Care Update OB/GYNS* 3:87-92.

Chroma I, Grenda D, Malinowska I, Suprynowicz Z, 1999. Determination of flumequine and doxycycline in milk by a simple thin-layer chromatographic method. *J Chromatogr B* 734:7-14.

Dougherty TJ, Beaulieu D, Barrett JF, 2001. New quinolones and the impact on resistance. *Drug Discov Today* 6:529-36.

Eurachem, 2000. Quantifying uncertainty in analytical measurement. 2nd ed. Eurachem ed., Uppsala, Svezia. Disponibile al sito: <http://www.eurachem.org/index.php/publications/pubarch/quam2000wd>

Gigosos PG, Revesado PR, Cadahia O, Fente CA, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A, 2000. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photo-diode-array detection. *J Chromatogr A* 871:31-6.

Haasnoot W, Gerçek H, Cazemier G, Nielen MWF, 2007. Biosensor immunoassay for flumequine in broiler serum and muscle. *Anal Chim Acta* 586:312-8.

Ho C, Sin DWM, Tang HPO, Chung LPK, Siu SMP, 2004. Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *J Chromatogr A* 1061:123-31.

Horwitz W, 1982. Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal Chem* 54:67-76.

ISO, 1999. Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.

- Norma ISO/IEC 17025. Organizzazione internazionale per la normazione ed., Ginevra, Svizzera.
- Juhel-Gaugain M, Abjean JP, 1998. Screening of quinolone residues in pig muscle by planar chromatography *Chromatographia*. 47:101-4.
- Marazuela MD, Moreno-Bondi MC, 2004. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A* 1034:25-32.
- Ramos M, Aranda A, Garcia E, Reuvers T, Hooghuis H, 2003. Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B* 789:373-81.
- Van Hoof N, De Wasch K, Okerman L, Reybroeck W, Poelmans S, Noppe H, De Brabander H, 2005. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Anal Chim Acta* 529:265-72.
- Wang Y, Shen YD, Xu ZL, Lei H-T, Wang H, Sun Y-M, 2010. Production and identification of monoclonal antibody against flumequine and development of indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay. *Chinese J Anal Chem* 38:313-7.
- Yorke JC, Froc P, 2000. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 882:63-77.
- Youden WJ, Steiner EH, 1975. *Statistical Manual of AOAC*. Association of Official Analytical Chemists ed., Washington, DC, USA.
- Zhang H, Ren Y, Bao X, 2009. Simultaneous determination of (fluoro)quinolones antibacterials residues in bovine milk using ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharmaceut Biomed* 49:367-74.
- Zhao SJ, Jiang HY, Ding SY, Li XL, Wang GQ, Li C, Shen JZ, 2007. A reliable LC method with fluorescence detection for quantification of (fluoro)quinolone residues in chicken muscle. *Chromatographia* 65:539-44.

Non-commercial use only