Revista de la Societat Catalana de Química. 10 (1): 37-41 (2011)
Filial de l'Institut d'Estudis Catalans, Barcelona.

DOI: 10.2436/20.2003.01.28 ISSN: 2013-9853 (ed. electrònica) ISSN: 1576-8961 (ed. impresa)
http://revistes.iec.cat/index.php/RSCQ

SCQ

Metodologies analítiques basades en l'espectrometria de masses per a l'anàlisi de fàrmacs veterinaris
Analysis of veterinary drugs based on mass spectrometry

Anna Martínez
Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona

Resum. Durant els últims anys, l'espectrometria de masses ha experimentat avenços importants que han fet que aquesta tècnica es converteixi en quelcom omnipresent a la gran majoria dels laboratoris d'anàlisi química. En concret, els laboratoris dedicats a l'anàlisi de residus de contaminants en aliments constitueixen un dels principals grups d'usuaris d'aquesta tècnica. En relació amb la presència de residus i atesa la creixent preocupació per assegurar la qualitat dels productes alimentaris, les autoritats governamentals dels diferents països han establert normatives cada cop més restrictives, la qual cosa sovint representa un repte per a la metodologia analítica existent. En aquest treball es presenten alguns exemples en els quals es mostra l'avantatge d'utilitzar l'espectrometria de masses per resoldre problemes concrets relacionats amb la presència de fàrmacs veterinaris en aliments d'origen animal.

Paraules clau: coccidiosis, espectrometria de masses, seguretat alimentaria, analisi de residus.

Abstract. In recent years, developments in mass spectrometry instrumentation have led this technique to become ubiquitous in the vast majority of analytical chemistry laboratories. Specifically laboratories devoted to the analysis of residues in food are major users of this technique. The growing concern for safer animal products have forced authorities from different countries to establish increasingly restrictive regulations that often represent a challenge to the existing analytical methodology. This paper presents some examples showing the advantage of using mass spectrometry to solve some specific problems related to the presence of veterinary drugs in food.

Keywords: coccidiosis, mass espectrometry, food safety, waste analysis.

Introducció

Els fàrmacs veterinaris són utilitzats per tractar i prevenir malalties en els animals de producció, ja que és imprescindible el fet de disposar d'animals salubres per tal d'assegurar un subministrament de carn de qualitat amb garanties de seguretat. En aquest sentit, és important el fet de controlar la presència de fàrmacs veterinaris en la carn de consum. De fet, els fàrmacs veterinaris comercials s'han distribuït i aplicat amb garanties de seguretat en la producció animal des de fa més de cinquanta anys,[1, 2] atès que el seu ús reporta importants beneficis, com ara la capacitat de millorar la salut dels animals i la reducció dels costos de producció limitant les malalties que podrien disminuir la taxa de creixement.[3] La utilització de medicaments veterinaris està estrictament legislada tant per la Unió Europea[4] com pels diferents governs de cada país[5] i es regulen diversos aspectes com la qualitat, la seguretat i l'eficàcia de cada fàrmac. Tot i els importants beneficis que reporten aquestes substàncies, del seu ús també deriven algunes conseqüències negatives que cal tenir en compte. El principal problema prové del fet que l'administració de fàrmacs a animals durant llargs períodes de temps pot comportar que la carn que arriba al consumidor contingui residus de fàrmacs que, encara que es trobin a baixes concentracions, poden donar lloc a episodis de reaccions al·lèrgiques en individus hipersensibles, però el més preocupant, pel seu abast més generalitzat, és que es pot produir l'aparició de soques bacterianes resistents als fàrmacs per a humans.[6] Per aquest motiu, els nivells de tolerància respecte a les concentracions de residus d'aquestes substàncies en productes destinats al consum humà han estat revisats darrerament i han estat establerts límits més exigents, la qual cosa obliga a desenvolupar noves metodologies analítiques que siguin capaces de determinar aquests compostos a concentracions cada cop més baixes. En aquest context, la cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses[7-15] ha esdevingut la tècnica per excel·lència i, en concret, ha proporcionat a la comunitat científica una eina de gran valor tant pel que fa a la seva capacitat de detecció de baixes concentracions de residus en matrius alimentàries com per les seves possibilitats en relació amb la caracterització de compostos químics i la identificació de substàncies desconegudes.

En aquest treball es descriuen alguns exemples de la utilització de l'espectrometria de masses per a la determinació i la caracterització d'alguns fàrmacs veterinaris, concretament, els pertanyents a la família terapèutica dels anticoccidials, que es mostren a la figura 1.

Correspondència: Anna Martínez. Departament de Química Analítica, Fac. de Química, Universitat de Barcelona. C/Martí i Franquès 1-11, 08028 Barcelona.
Tel.: +34 934039127. Fax: +34 934021233.
A/e: anna_martinez@ub.edu

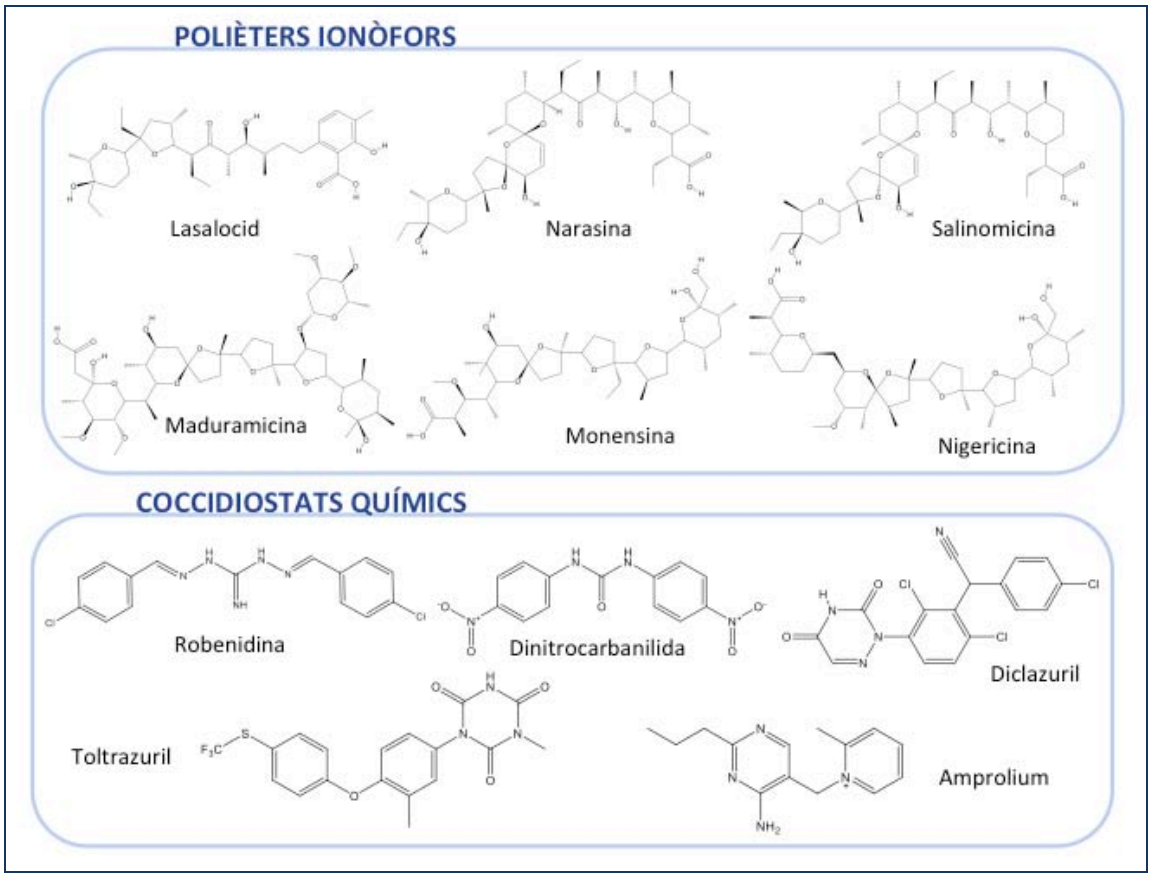


Figura 1. Estructures i noms dels coccidiostats.

Instrumentació

Per a la realització d'aquest estudi, s'han emprat diversos equips d'espectrometria de masses amb diferents analitzadors, una trampa d'ions (LCQ Classic), un triple quadrupol (TSQ Quantum Ultra AM) i un linear *trap-orbitrap* (Orbitrap XL). Els estudis de fragmentació s'han dut a terme a la trampa d'ions, treballant en espectrometria de masses en tàndem en el temps. S'han obtingut els espectres de masses en múltiples etapes (MS/MS, MS^3 i MS^4), la qual cosa ha permès establir l'ordre genealògic dels fragments, ja que, amb aquest tipus d'analitzadors de masses, no són freqüents les fragmentacions per col·lisions múltiples i només s'observen els ions producte originats directament de l'ió precursor aïllat en cadascuna de les successives etapes de fragmentació. Ara bé, en alguns casos, ha estat necessari mesurar la massa exacta per tal d'assignar correctament la composició elemental dels ions moleculars, la d'alguna interferència i la d'alguns ions producte generats en la fragmentació en tàndem. Per a aquestes mesures, s'ha emprat un instrument de triple quadrupol amb quadrupols hiperbòlics amb capacitat per dur a terme mesures de massa exacta mitjançant l'augment de la resolució dels quadrupols fins a 0,04 *m/z* FWHM (*full width half maximum*) i amb un calibratge adequat de l'eix *m/z* per tal d'obtenir valors amb errors inferiors a 5 mDa. Aquest tipus d'analitzador treballa en espectrometria de masses en tàndem a l'espai, i en aquest tipus de tàndem és freqüent la fragmentació per col·lisions múltiples en passar l'ió precursor seleccionat (primer quadrupol) per la cambra de col·lisió (segon quadrupol), la qual cosa comporta que es puguin observar ions de diferents generacions a la mateixa etapa de fragmentació MS/MS. Finalment, hem utilitzat un analitzador linear *trap-orbitrap*, que permet treballar a resolucions de fins a 100.000 i que proporciona errors en la mesura dels valors *m/z* inferiors a 1 mDa, per tal d'identificar i confirmar correctament algun dels ion producte que requerien aquesta precisió i exactitud.

L'augment de la resolució com a eina de treball en l'anàlisi de rutina

En primer lloc, es comenta un exemple de l'avantatge que pot proporcionar el fet d'augmentar la resolució en espectrometria de masses. En concret, es pretén il·lustrar l'aplicació d'aquesta estratègia en l'anàlisi del toltrazuril (un anticoccidial molt utilitzat en aus de corral i en el sector porcí) i dels seus dos metabòlits majoritaris, la toltrazuril sulfona i el toltrazuril sulfòxid, el primer dels quals també presenta activitat farmacològica.[16] Per a aquesta anàlisi, es va desenvolupar un mètode de cromatografia de líquids ràpida acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem emprant ionització química a pressió atmosfèrica (APCI) en mode negatiu i un analitzador de triple quadrupol. L'anàlisi de diferents productes carnis, tant crus com processats, que havien estat sotmesos a un tractament de mostra molt senzill, una extracció amb acetonitril i purificació per extracció en fase sòlida (SPE), va posar de manifest que, encara que la baixa resolució (Q1 *m/z* 0,7; Q2 *m/z* 0,7)

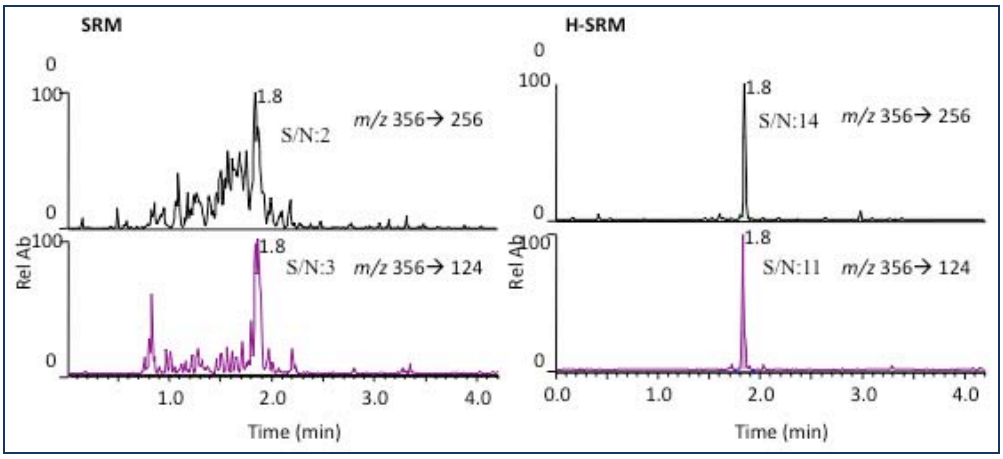


Figura 2. Cromatogrames en SRM i en H-SRM corresponents al toltrazuril en una mostra de salsitxa de Frankfurt. Transició de quantificació: 356 → 256; transició de confirmació: 356 → 124.

és una tècnica que pot permetre el fet d'obtenir bons resultats (per exemple, es podia determinar la toltrazuril-sulfona a les mostres), en alguns casos l'anàlisi no es pot dur a terme (en el nostre cas, el toltrazuril no es podia identificar a causa d'un important soroll de fons). En aquests casos, l'augment de la resolució en el primer quadrupol (Δ*m/z* 0,1 FWHM) permet eliminar possibles interferències isobàriques de l'ió precursor, la qual cosa produeix una disminució del soroll. Si aquest procés es pot dur a terme sense una pèrdua significativa en la transmissió d'ions, com és el cas en treballar amb el triple quadrupol TSQ Quantum Ultra AM, es millora considerablement la relació senyal-soroll. A la figura 2 es mostra, a tall d'exemple, el cromatograma corresponent al toltrazuril en una mostra de salsitxes de Frankfurt, on es pot observar la dificultat per identificar aquest compost a baixa resolució (SRM), mentre que, treballant en el mode H-SRM (Q1 Δ*m/z* 0,1 FWHM), la relació senyal-soroll augmenta fins a 14, la qual cosa permet el fet de confirmar la presència de toltrazuril i determinar-ne la concentració (2,2 μg kg^{-1}) a la mostra.[17]

A la figura 2 s'indiquen les transicions utilitzades per a la determinació i la confirmació del toltrazuril. En general, en *electrospray* (ESI) i APCI, l'ió precursor acostuma a ser la molècula protonada, si es treballa en ionització positiva $[M+H]^+$, i la molècula desprotonada $[M-H]^-$, si es treballa en mode negatiu. Ara bé, en el cas del toltrazuril, la molècula desprotonada és molt difícil de fragmentar, per la qual cosa s'ha emprat com a precursor l'ió $[M-69]^-$, generat per fragmentació a la font i a causa de la pèrdua de CF_3.

Identificació de substàncies desconegudes

En l'anàlisi de mostres alimentàries, la presència de compostos interferents presents a la matriu dificulta amb freqüència l'aplicació dels mètodes establerts. En l'exemple següent es mostra la identificació d'una interferència observada en la determinació en aliments de l'amprolium, un compost d'amoni quaternari emprat contra la coccidiosi, per al qual es va desenvolupar un mètode basat en cromatografia de líquids d'interacció hidrofílica (HILIC) acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem (triple quadrupol) emprant *electrospray* en mode positiu com a font d'ionització.

En analitzar mostres d'aliments (ou, pollastre) i de pinso emprant un tractament de mostra senzill, que consistia únicament en una extracció amb acetonitril i l'anàlisi directa dels extractes, es va observar que els patrons i les mostres amb la mateixa concentració d'amprolium donaven una resposta molt superior en el cas de les matrius addicionades que en el dels patrons. Una de les possibles causes que provoquen aquest fenomen, conegut amb el nom de *matrix ion enhancement*, és la coelució amb l'amprolium d'alguna substància de la matriu que afavoreix la ionització del nostre anàlit. Es va observar que, en el moment de retenció de l'amprolium, apareixia una substància amb un ió de massa *m/z* 162 (figura 3). Per tal d'obtenir informació estructural sobre aquest ió i poder identificar el compost, es va adquirir l'espectre d'ions producte i es

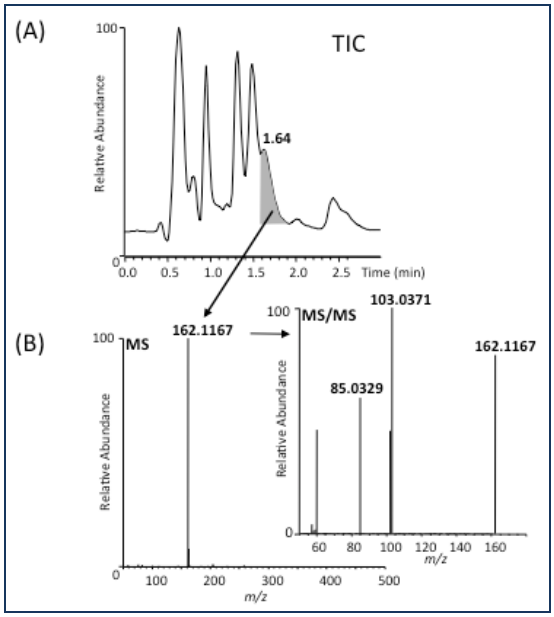


Figura 3. Identificació d'un compost de la matriu que coelueix amb l'amprolium: *a*) cromatograma de la intensitat del corrent iònic total (TIC) d'una mostra d'ous; *b*) espectre de masses de la interferència, espectre d'ions producte de l'ió precursor *m/z* 162. En els espectres, s'indiquen les masses exactes de l'ió precursor i dels ions producte més intensos.

van determinar les masses exactes de l'ió precursor (*m/z* 162,1167) i dels dos ions producte més abundants (*m/z* 103,0371 i 85,0329). Acceptant un error de menys de 5 mDa respecte de les masses mesurades, només existeixen tres possibles composicions elementals per al catió precursor. La utilització d'una base de dades[18] va permetre descartar dues de les tres composicions elementals, ja que l'una no proporcionava cap estructura química lògica i l'altra corresponia a molècules neutres, i identificar la L-carnitina com a possible substància interferent. Finalment, l'anàlisi d'un patró va permetre la confirmació d'aquesta hipòtesi, ja que tant el comportament cromatogràfic com l'espectre d'ions producte obtingut a partir del patró de L-carnitina van ser idèntics al de la interferència. Per tant, aquesta era la substància responsable de l'efecte matriu en la determinació d'amprolium en els aliments analitzats.[19]

Caracterització de polièters ionòfors

Entre els compostos administrats en grans quantitats, sobretot a les aus de corral, cal esmentar els polièters ionòfors, productes naturals que s'empren no només en la prevenció i el tractament de la coccidiosi,[1] sinó que també s'administren en dosis subterapèutiques com a promotors del creixement.[20] En aquest apartat, es comenten els estudis de fragmentació d'aquests compostos duts a terme durant l'establiment d'un mètode de cromatografia de líquids acoblada a l'espectrometria de masses en tàndem per a l'anàlisi de nou polièters ionòfors. Aquests compostos estan formats per un esquelet de múltiples èters cíclics hidroxilats que contenen un àcid carboxílic i un hidroxil terminals i que presenten una elevada tendència a formar adductes amb cations metàl·lics, la qual cosa ha comportat que, en treballar amb una font d'*electrospray* en polaritat positiva, tots els polièters ionòfors donin lloc a espectres de masses amb un únic ió, que correspon a l'adducte amb sodi. La fragmentació d'aquest ió en espectrometria de masses en tàndem dóna lloc, per a la majoria dels polièters ionòfors, a espectres de masses en els quals el pic base correspon a la pèrdua d'aigua. Aquesta pèrdua es pot explicar per la presència de nombrosos grups hidroxil en els corresponents compostos (figura 1). Els ionòfors amb un grup carbonil a l'estructura (salinomicina, narasina i lasalocid) presenten també una altra fragmentació característica, que correspon al trencament de l'enllaç en β respecte del grup carbonil, la qual cosa dóna lloc a dos fragments amb una diferència de 100 unitats de massa. A la figura 4*a* es mostra, a tall d'exemple, aquesta fragmentació per a la salinomicina. Per a la maduramicina, en canvi, el pic base de l'espectre d'ions producte (*m/z* 877) correspon a la pèrdua de 62 Da (figura 5*a*), una pèrdua que també s'observa a l'espectre de MS^3 (figura 5*b*) de la monensina (*m/z* 613) emprant com a ió precursor l'ió corresponent a la pèrdua d'aigua (*m/z* 675) de l'espectre MS/MS. Tenint en compte les estructures d'aquests dos compostos, aquests ions fragment poden provenir de la pèrdua de dos grups metoxi o de la pèrdua simultània de

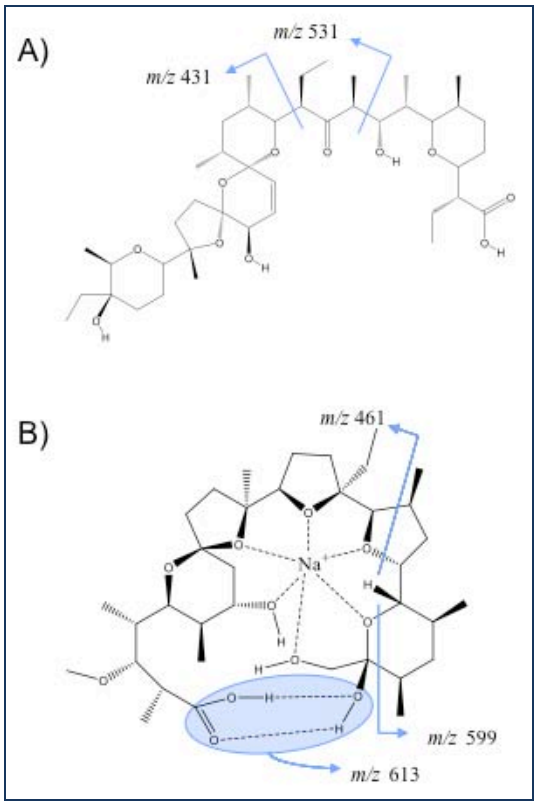


Figura 4. *a*) Trencament en β respecte del carbonil per a la salinomicina; *b*) estructura pseudomacrocíclica de la monensina i la seva fragmentació.

CO_2 i H_2O. Amb l'objectiu d'assignar correctament aquests fragments, es va emprar un instrument capaç de treballar en alta resolució, un linear Orbitrap XL, que va permetre calcular les masses exactes dels ions corresponents a la maduramicina (*m/z* 877,5272) i a la monensina (*m/z* 613,4045), que concorden amb la pèrdua de CO_2 i H_2O (errors menors a 5 ppm). Ara bé, aquesta pèrdua planteja un problema relacionat amb el fet que en un analitzador de trampa d'ions en general només s'observen trencaments directes i, per tant, per perdre simultàniament CO_2 i H_2O, cal que aquests dos grups estiguin propers. Això és possible si la molècula forma un pseudomacrocicle amb l'ió sodi al centre i els grups carboxílic i hidroxil terminals enfrontats, tot establint-se interaccions per ponts d'hidrogen.[21, 22] A tall d'exemple, a la figura 4*b* es mostra l'estructura pseudomacrocíclica de la monensina.[23]

Conclusions

S'ha posat de manifest que l'espectrometria de masses és una tècnica altament útil en l'anàlisi de residus de fàrmacs veterinaris en mostres alimentàries. L'augment de la resolució en el primer quadrupol ha possibilitat la confirmació de la presència de toltrazuril en mostres de salsitxa de Frankfurt, gràcies a l'augment de la relació senyal-soroll, que permet millorar els límits de detecció. Altrament, la utilització d'un equip capaç de treballar en mode de massa exacta ens ha permès la identificació d'una interferència cromatogràfica en l'anàlisi d'amprolium, responsable d'un important efecte matriu. Aquesta substància ha estat identificada com a L-carnitina, un compost d'amoni quaternari. Finalment, la

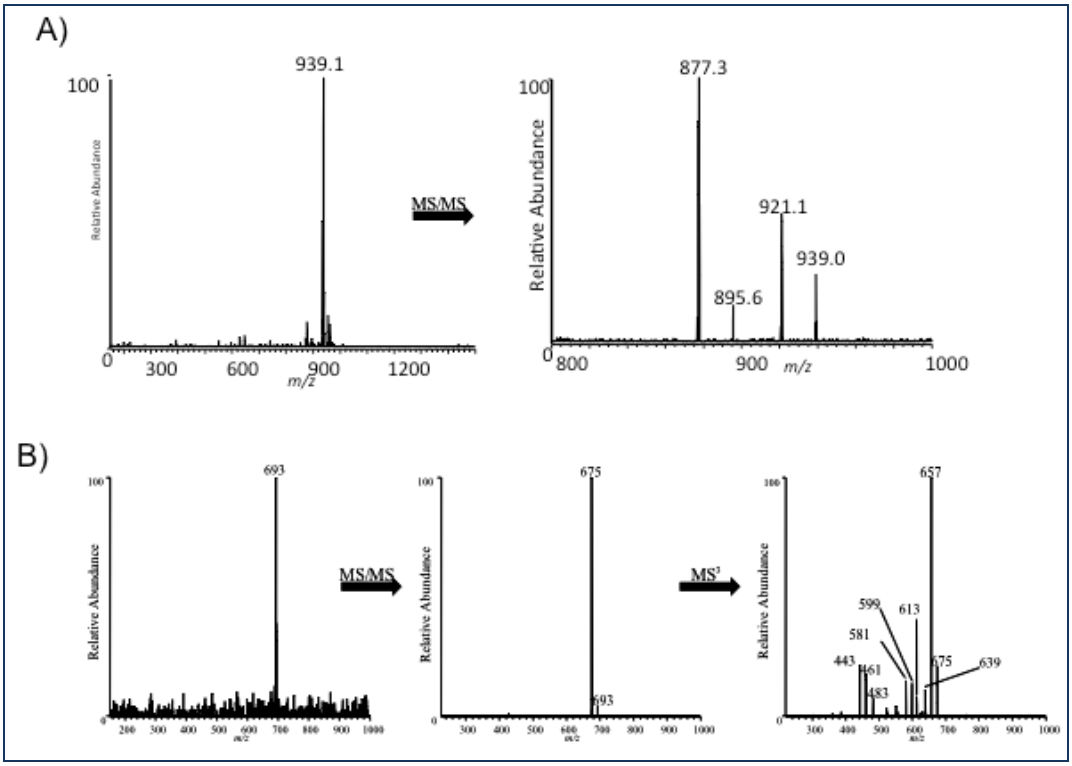


Figura 5. *a*) Espectres MS i MS/MS de la maduramicina; *b*) MS, MS/MS i MS³ de la monensina.

utilització de l'espectrometria de masses en múltiples etapes ha permès establir el patró de fragmentació d'una família de compostos, els polièters ionòfors. La utilització de l'alta resolució, en aquest cas, ha permès el fet de confirmar la pèrdua simultània de CO_2 i H_2O, una fragmentació característica de la conformació espacial d'aquests compostos.

Agraïments

L'autora vol expressar el seu agraïment al Ministeri de Ciència i Innovació del Govern espanyol pel finançament rebut a través del projecte CTM2006-00753/TECNO i Acción Complementaria CTM2006-26237-E, i també per la concessió d'una beca FPI per a la realització de la tesi doctoral.

Referencias

1. Jones, F. T.; Ricke, S. C. *Poultry Sci.* 2003, *82*, 613.
2. Castanon, J. I. R. *Poultry Sci.* 2007, *86*, 2466.
3. Visek, W. J. *J. Anim. Sci.* 1978, *46*, 1447.
4. Commission Regulation (EU) núm. 37/2010.
5. <http://www.aemps.es/actividad/legislacion/espana/veterinarios.htm>. [14/05/2010]
6. Felipe, C. C. *Environ. Microbiol.* 2006, I, 1137.
7. Gentili, A.; Perret, D.; Marchese, S. *TrAC-Trend. Anal. Chem.* 2005, 24, 704.
8. Reig, M.; Toldrá, F. *Meat Sci.* 2008, 78, 60.
9. Toldrá, F.; Reig, M. *Trends Food Sci. Tech.* 2006, 17, 482.
10. Zeleny, R.; Ulberth, F.; Gowik, P.; Polzer, J.; Ginkel, L. A. van; Emons, H. *TrAC-Trend Anal. Chem.* 2006, *25*, 927.
11. Stolker, A. A. M.; Brinkman, U. A. T. *J. Chromatogr. A* 2005, *1067*, 15.
12. Vranic, M. L.; Marangunich, L.; Fernández Courel, H.; Fernández Suárez, A. *Anal. Chim. Acta,* 2003, *483*, 251.
13. Weiss, C.; Conte, A.; Milandri, C.; Scortichini, G.; Semprini, P.; Usberti, R.; Migliorati, G. *Food Control,* 2007, *18*, 1068.
14. Brabander, H. F. de; Noppe, H.; Verheyden, K.; Vanden Bussche, J.; Wille, K.; Okerman, L.; Vanhaecke, L.; Reybroeck, W.; Ooghe, S.; Croubels, S. *J. Chromatogr. A,* 2009, *1216*, 7964.
15. Olejnik, M.; Szprengier-Juszkiewicz, T.; Jedziniak, P. *J. Chromatogr. A* 2009, *1216*, 8141.
16. Dirikolu, L.; Yohn, R.; Garret, E. F.; Chakkath, T.; Ferguson, D. C. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2008, *32*, 280.
17. Martínez Villalba, A.; Moyano, E.; Martins, C. P. B.; Galceran, M. T. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, *397*, 2893.
18. <http://www.chemspider.com/> [18/01/2010]
19. Martínez Villalba, A.; Moyano, E.; Galceran, M. T. *J. Chromatogr. A* 2010, *1217*, 580.
20. Butaye, P.; Devriese, L. A.; Haesebrouck, F. Clin. *Microbiol. Rev.,* 2003, 175.
21. Martinek, T.; Riddell, F. G.; Wilson, C.; Weller, C. T. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2 2002, 35.
22. Paz, F. A. A.; Gates, P. J.; Fowler, S.; Gallimore, A.; Harvey, B.; Lopes, N. P.; Stark, C. B. W.; Staunton, J.; Klinowski, J.; Spencer, J. B. *Acta Crystallogr.*, 2003, E59, m1050.
23. Martínez Villalba, A.; Moyano, E.; Galceran, M. T. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009, 23, 1255.



A. Martínez

Anna Martínez va néixer a Barcelona l'any 1982. Va estudiar la llicenciatura de química a la Universitat de Barcelona i en aquests moments es troba realitzant la tesi doctoral al Departament de Química Analítica de la mateixa universitat, sota la direcció de la doctora Maria Teresa Galceran i Huguet (catedràtica de química analítica) i de la doctora Encarnación Moyano Morcillo (professora titular).