

Desarrollo de un Método de Análisis de Metabolitos de Nitrofuranos en Tejido Animal Empleando el Sistema GC/PTV/EI/MSMS

Sonia del Carmen Soto Alvarado*, Osvaldo Nicolás Rodríguez Valdés*, Guillermo Rodríguez Ventura**, Ernesto Vélez López**, Juan Temores Peña** y Laura Renné Velázquez Chong*

RESUMEN

En el análisis de metabolitos de 5-nitrofuranos actualmente se emplean sistemas en fase líquida, acoplados a analizadores de masas/masas LC/MSMS los cuales son muy costosos. En este estudio se presenta un método alternativo en el cual se utiliza un sistema en fase gaseosa, con analizador de masa secuencial de trampa de iones y un sistema de inyección de temperatura programable GC/PTV/EI/MS⁵, para introducir los metabolitos de 5-nitrofuranos, a baja temperatura y derivatizarlos para evitar la degradación térmica de estos compuestos en el sistema de inyección. La derivatización de los metabolitos con anhídrido heptafluorobutírico (HFBA) en el inyector de temperatura programable (PTV), permite obtener estructuras térmicamente estables y se logra una mayor información estructural. Utilizando este método se obtuvo la caracterización de cuatro derivados heptafluorobutirilados de metabolitos de nitrofuranos: semicarbazida (SEM), 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ) y 1-aminohidantoina (AHD) en tejido animal de ganado porcino a un nivel de concentración de 1 µg/kg.

ABSTRACT

Currently, liquid phase systems are used in the analysis of metabolites of 5-nitrofuranes, connected to mass/mass LC/MSMS analyzers of which are very expensive. In this study an alternative method is presented in which a gaseous phase system is used, with an ion trap sequential mass analyzer and a temperature programmable GC/PTV/EI/MS⁵ injection system, to introduce 5-nitrofuranes metabolites, at low temperature and as derivatized to avoid the thermal degradation of these compounds in the injection system. Thermally stable structures are obtained with by derivitizing the metabolites with heptafluorobutyric anhydride (HFBA) in the temperature programmable injection system, and greater structural information is also obtained. Using this method the characterization of four heptafluorobutyrate derivatives of metabolites of 5-nitrofuranes was obtained: semicarbazide (SEM), 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), 3-amino-5-morfolinomethyl-oxazolidinone (AMOZ) and 1-aminohydantoina (AHD) in porcine tissue at a concentration of 1 µg/kg.

Recibido: 8 de Agosto de 2007
Aceptado: 25 de Julio de 2008

INTRODUCCIÓN

Los derivados de 5-nitrofuranos corresponden a un grupo de sustancias antimicrobianas utilizadas contra algunos agentes patógenos, su uso puede constituir un riesgo para la salud pública, cuando su aplicación se proporciona en forma indiscriminada a los animales cuya carne es utilizada para consumo humano (Matus, 2005).

Palabras clave:

SEM; AMOZ; AOZ; AHD; GC/PTV/EI/MSMS.

Keywords:

SEM; AMOZ; AOZ; AHD; GC/PTV/EI/MSMS.

Los derivados de 5-nitrofuranos más empleados son: Nitrofurazona, Fuzazolidona, Furalfadona y Nitrofurantoina los que se metabolizan rápidamente originando sus respectivos metabolitos persistentes: Semicarbazida (SEM), 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ), 1-aminohidantoina (AHD) (Figura 1).

* Universidad Autónoma de Baja California, Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Km. 3.5 Carretera Mexicali-San Felipe, Fracc. Campestre S/N C.P. 21386, Mexicali, Baja California, México.

** Universidad Autónoma de Baja California, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Calzada Tecnológico S/N. Delegación Mesa de Otay, Tijuana, Baja California, México.

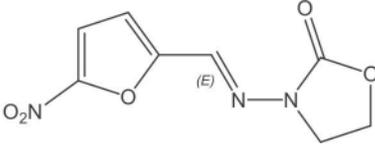
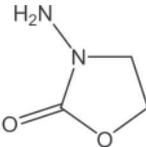
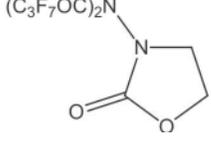
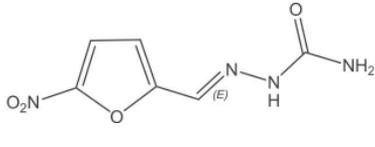
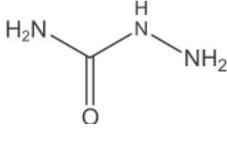
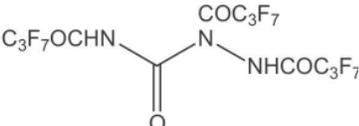
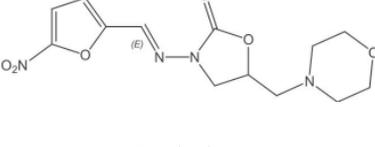
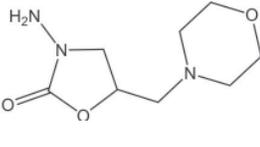
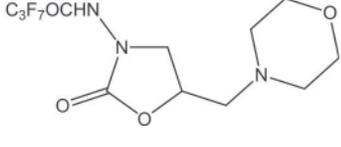
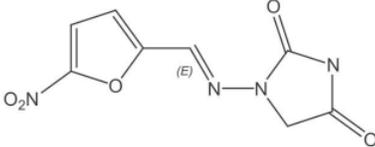
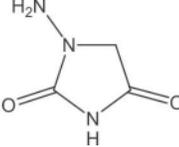
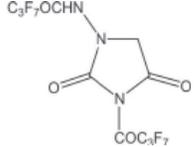
| Nitrofuranos | Metabolitos | Derivatizados-HFBA |
|--|--|---|
|  <p>Furazolidona</p> |  <p>AOZ</p> |  <p>HFBA-AOZ</p> |
|  <p>Nitrofurazona</p> |  <p>SEM</p> |  <p>HFBA-SEM</p> |
|  <p>Furaltadona</p> |  <p>AMOZ</p> |  <p>HFBA-AMOZ</p> |
|  <p>Nitrofurantoina</p> |  <p>AHD</p> |  <p>HFBA-AHD</p> |

Figura 1. Estructura de derivados de 5-nitrofuranos, metabolitos y sus respectivos metabolitos derivatizados.

Los ensayos toxicológicos realizados desde el año 1993, tanto *in vivo* como *in vitro* arrojan resultados que demuestran el potencial mutagénico, carcinogénico y teratogénico de estos compuestos (Comisión de Emergencia Sanitaria Apícola, 2005).

El monitoreo de los metabolitos de 5-nitrofuranos en alimentos de origen animal en la actualidad se realizan fundamentalmente por dos tipos de métodos: presuntivos y confirmatorios; los métodos presuntivos, como los microbiológicos, inmunoensayos, la cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de ultravioleta (HPLC-UV) y el sistema de ensayo receptor CHARM II (Tangallapally, 2007; Vass, 2005; Lanzelotti, 2004), se utilizan para la estimación de residuos de antibióticos en alimentos de origen animal, su gran ventaja es que

requieren de mínima extracción y procedimientos de limpieza, además son relativamente económicos y de fácil aplicación a gran escala. La gran desventaja de todos estos métodos radica en que la detección positiva en estas pruebas conlleva al uso de un método confirmatorio específico como el sistema de cromatografía de líquidos acoplado de triple cuadrupolo (LC/QQQ/MS/MS) (Diario oficial de las comunidades Europeas, 2002, Effkemann, 2004), y el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Harting, 2005), los cuales debido a su alta especificidad, sensibilidad y rango cuantitativo, permite una elevada confiabilidad y disminución de resultados de ensayos de falsos positivos y negativos, con límites de detección entre 0,3-5 ppb (FDA, 2006). Estos métodos

son obligatorios de acuerdo a las políticas de residuos de antibióticos que actualmente rigen a nivel internacional (Montoya, 2003). Sin embargo, tienen un costo alto y no están al alcance de la mayoría de los laboratorios en las diferentes partes del mundo (Finzi, 2005).

Países como Canadá, Japón y la Unión Europea (UE) han incluido el sistema LC/MS/MS para detectar niveles de 0,1 ppb de metabolitos de 5-nitrofuranos. En los EE UU la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) también ha validado la metodología por LC/MS/MS para confirmar los niveles de metabolitos de 5-nitrofuranos en camarón, pescados y miel (FDA, 2006). Esta metodología de EE UU es similar y tiene coincidencia con los métodos de Canadá y UE. Por lo que hoy en día es el método aplicado por las autoridades sanitarias de casi todos los países para el análisis de nitrofuranos en todo el mundo. Este método no es de fácil aplicación, requiere de tecnología sofisticada y personal altamente calificado. Estas desventajas mencionadas hacen que en estos momentos su aplicación a gran escala sea complicada.

La finalidad de esta investigación es desarrollar un método analítico por el sistema GC/PTV/EI/MS⁵, para la determinación de residuos de metabolitos de 5-nitrofuranos en tejido animal de ganado porcino. Empleando el anhídrido heptafluorobutírico para evitar la degradación térmica de los metabolitos estudiados como una nueva propuesta para la derivatización de los metabolitos de nitrofuranos y realizando la derivatización en el puerto de inyección con un programa de temperatura el cual es capaz de derivatizar los metabolitos de 5-nitrofuranos evitando su descomposición térmica, logrando estructuras de las amidas cíclicas conocidas como lactamas: HFBA-AMAZ, HFBA-AHD, HFBA-AOZ, HFBA-SEM. Estas estructuras son estables para realizar un análisis en fase gaseosa bajo las condiciones analíticas estudiadas (Figura 1). Este desarrollo analítico podría aportar en el futuro una nueva panorámica en el análisis de metabolitos de 5-nitrofuranos teniendo una mayor selectividad y especificidad que los sistemas LC/MSMS, los cuales en muchas ocasiones es necesario emplear compuestos deuterados para evitar falsos positivos y negativos. Este método de formación de amidas de metabolitos de 5-nitrofuranos heptafluorobutirilados presenta una alta sensibilidad, especificidad, fácil aplicación y bajo costo con respecto a los sistemas LC/MSMS.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Reactivos y patrones analíticos. Para la extracción de metabolitos de derivados de 5-nitrofuranos de tejido animal de porcino, se utiliza hidróxido de sodio y

ácido clorhídrico, grado reactivo, metanol y acetato de etilo grado OmniSolv de alta pureza Spectrum, fosfato de sodio hidratado grado reactivo VWR, anhídrido heptafluorobutírico Supelco, Semicarbazida, 3-amino-2-oxazolidinona, 5-morfolinometil-3-amino-oxazolidinona, 1-aminohidantoina estándares analíticos de Sigma Aldrich.

Instrumentación Analítica. Para el análisis de muestras se utiliza un sistema en fase gaseosa, una columna capilar equity TM-5 30m x 0,25mm x 0,25µm de película, con analizador de masa secuencial de trampa de iones y con un inyector de temperatura programable GC/PTV/EI/MS⁵ marca Thermo Electron Co. integrado por: Inyector automático modelo AI3000, GC TraceGC ultra, equipado con un PTV, un analizador de trampa de iones MS Finnigan Polaris Q, Software de procesamiento de datos PC Xcalibur 1.4 data system.

Las condiciones de operación en el inyector de temperatura programable a fin de llevar a cabo la reacción de derivatización y limpieza de la muestra son las siguientes: inlet temperature: 40 °C, split flow: 50 (mL/min), splitless time: 1 min, solvent valve temperature: 100 °C. Con respecto a la fase de inyección: una presión de 17,4 psi durante 0,20 min, la transferencia de las amidas heptafluorobutiriladas a la columna analítica se realiza a una presión de 17,4 psi, a una velocidad de 10 °C/s hasta una temperatura final de 250 °C durante 2,0 min, la limpieza del sistema se realiza con un flujo de 50 mL/min a una velocidad de 10 °C/s hasta 250 °C por 12,0 min, la purga del septante es constante.

Condiciones del horno: La temperatura inicial del inyector de 40 °C en el modo PTV splitless y temperatura final de 250 °C. La temperatura inicial del horno es de 60 °C con un tiempo de inicio de 7,20 min y un incremento de la temperatura de 15°C hasta llegar a una temperatura final de 230 °C.

Parámetros analíticos de la trampa de iones: El modo de adquisición de datos es barrido total y masas masas con una celda de impacto electrónico (EI+) la temperatura de la fuente 150 °C la temperatura de la línea de transferencia 200 °C, el flujo damping de helio 0,3 mL/min, la energía de ionización 70 eV y la corriente de emisión de 250 µA, las masas de calibración y los lentes son afinados cuando se realiza la limpieza de la celda, la limpieza de la trampa y la calibración se lleva a cabo utilizando perfluorotributilamina, el número de microscan en el modo de barrido completo de masas masas es de 3 ms, el rango de masas es de 20 uma a 800 uma, para la cuantificación MSMS se utiliza una energía máxima de excitación con $q=0,225$, tiempo de aislamiento de 0,2 ms, ventana de aislamiento igual a

8 y excitación por colisión inducida igual a 13, 11, 15 y 12, las condiciones analíticas para masas masas se encuentran resumidas en la Tabla 1.

Preparación de los patrones analíticos.

Preparación de las soluciones madre de los nitrofuranos (100 mg/L): Se pesan $10 \pm 0,1$ mg ($0,010 \pm 0,001$ g) en una balanza analítica Plus OHAUS y aforar a 100 mL en un matraz volumétrico ambar Clase A con metanol grado cromatográfico, se corrigió la concentración obtenida con la pureza del material de referencia. Una vez preparada la solución madre se transfiere en un frasco ámbar de 120 ml para su almacenamiento en congelación.

Soluciones de trabajo de los metabolitos de nitrofuranos: Las soluciones madre se prepararon a 1 mg/mL en metanol, los derivados de los metabolitos de nitrofuranos son sensibles a la luz, por esta razón se debe evitar la exposición prolongada a fuentes de luz durante la preparación.

Se toman 10 μ L de la solución madre de cada nitrofurano de 100 mg/L y se afora en un matraz volumétrico de 10 mL case A con metanol grado cromatográfico. La solución de trabajo se transfiere a viales ámbar de 15 ml para su almacenamiento.

Para la fortificación de la muestra se pesan 5g de músculo de ganado porcino en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL y se fortifica cada muestra control con 50 μ L de una concentración de 0,1 ng/ μ L para obtener una concentración de 1 μ g/kg.

Preparación de la muestra.

Un gramo de la muestra de tejido animal de ganado porcino se fortifica con una solución de los cuatro metabolitos de nitrofuranos con una relación metabolito: muestra de 1 μ g/kg, se homogeniza en vortex por un minuto, se hidroliza en medio ácido añadiendo 5 ml de ácido clorhídrico 0,2 M y se incuba a 37° C por

12 horas. Posteriormente se enfría a 25°C, se neutraliza con una solución de 500 mL de Na_3PO_4 0,3 M y se lleva a un pH 7 con NaOH 2M.

Posteriormente se añade 4 ml de acetato de etilo OmniSolv y se centrifuga a 3000 rpm, se repite el paso anterior y se combinan los dos extractos, se lleva a sequedad a una temperatura de 40°C en un evaporador de nitrógeno y se reconstituye con 80 μ L de acetato de etilo y 70 μ L de anhídrido heptafluorobutírico, utilizando un inserto de vidrio silanizado Agilent de 120 μ L de fondo plano y soportado en vial de 2 ml Agilent, finalmente se mezcla en un agitador vortex. La muestra se inyecta en el sistema GC/PTV/EI/MS/MS descrito anteriormente (Velázquez, 2005).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La decisión de la comisión 2002/657/CE establece que los límites mínimos de funcionamiento exigidos de los métodos analíticos utilizados para la determinación de metabolitos de Nitrofuranos, de 1 μ g/kg, ésta es la razón por la que el método fue desarrollado a fin de dar cumplimiento a las regulaciones internacionales.

Estudios de caracterización de metabolitos de 5-nitrofuranos realizados en nuestro laboratorio, empleando inyectores split splitless en un intervalo de temperatura de 150°C-250°C, en varias adquisiciones de diferentes muestras, observamos la degradación total de los metabolitos de nitrofuranos, lo cual nos indica que estos metabolitos presentan una baja estabilidad térmica. Por esta razón en este trabajo se propone el uso combinado del PTV inyectando estos metabolitos a 40°C, temperatura en la que son estables y se hacen reaccionar *in situ* con anhídrido heptafluorobutírico con el programa de temperatura anteriormente descrito, para obtener las correspondientes amidas heptafluorobutiriladas que presentan estabilidad térmica.

Por tales razones el propósito de este estudio fue desarrollar un método analítico alternativo a los que

Tabla 1.
SRM: Monitoreo de reacción seleccionada.

| Metabolitos de Nitrofurano derivatizado | Tiempo de Retención (min) | Ion molecular (m/z) | Ion Padre (Parent) m/z | Iones Hijos (Product) m/z | Ventana de aislamiento (Isolation Width) | Tiempo de aislamiento (Isolation Time) | Energía de Colisión (Collision Energy) [V] |
|---|---------------------------|---------------------|------------------------|---------------------------|--|--|--|
| HFBA-AOZ | 6,26 | 494 | 494 | 424,407,255 | 8 | 0,2 | 12 |
| HFBA SEM | 5,24 | 663 | 660 | 464,215,150 | 8 | 0,2 | 15 |
| HFBA-AMAZ | 3,46 | 397 | 397 | 196,169,131 | 8 | 0,2 | 13 |
| HFBA-AHD | 4.34 | 507 | 294 | 267,223,169,100 | 8 | 0,2 | 11 |

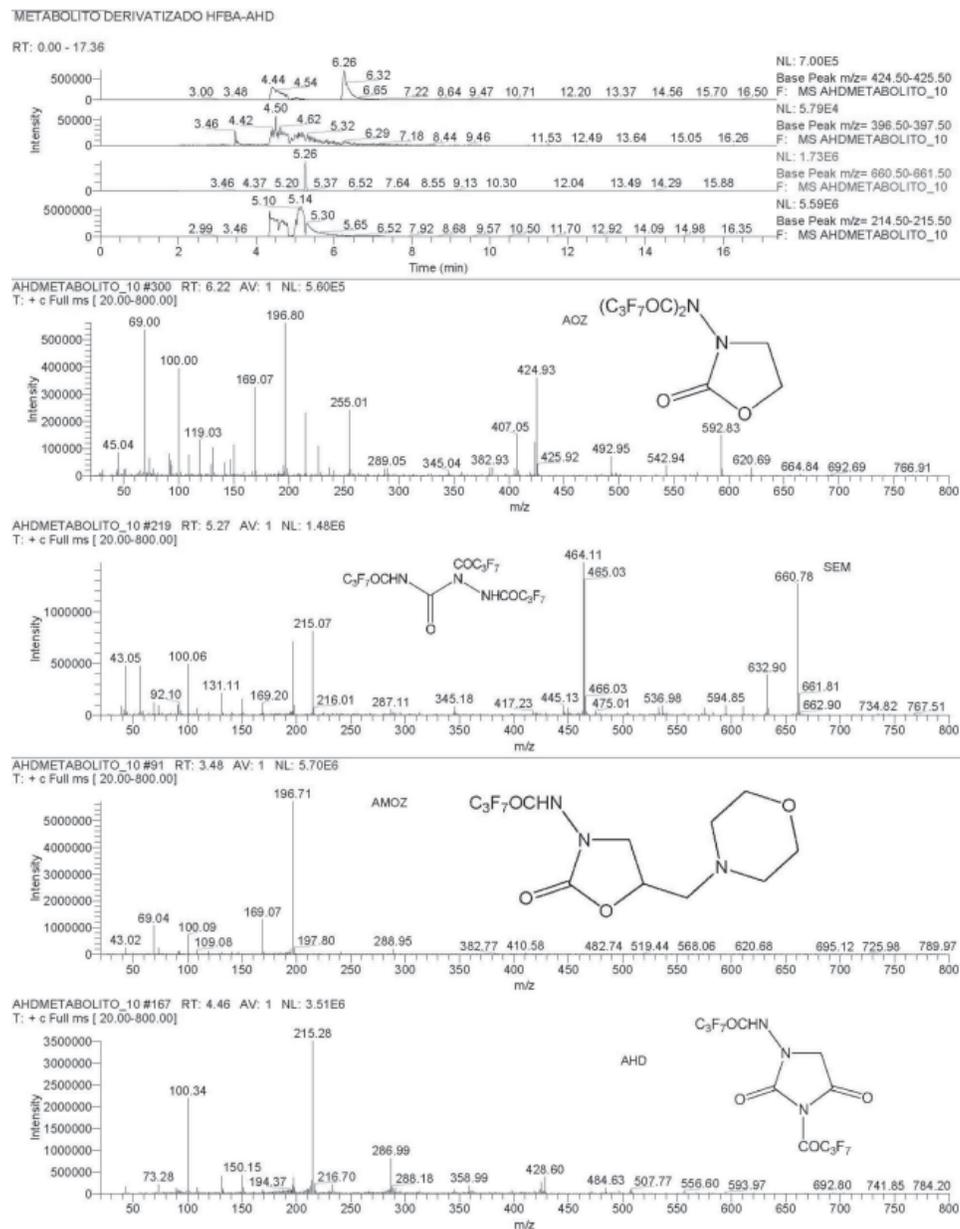


Figura 1a. Espectros de masas de amidas heptafluorbutiriladas de los metabolitos de nitrofuranos.

ya se vienen utilizando en todos los laboratorios a nivel internacional, basado en utilizar un sistema de cromatografía gaseosa acoplado a un analizador de trampa de iones el cual permite realizar mediciones en los modos de barrido completo (Full Scan), monitoreo de iones selectivos (SIM) y de masas masas (MS/MS). Este sistema analítico pudiera tener una gran sensibilidad y especificidad para la cuantificación de metabolitos de nitrofu-

ranos en diferentes matrices biológicas, en este estudio preliminar utilizamos tejido animal de porcino. Con estos modos de adquisición anteriormente descritos que permiten estos sistemas en el modo de barrido completo se pudo lograr los tiempos de retención y los pesos moleculares de cada uno de los cuatro metabolitos de nitrofuranos estudiados, obteniendo la huella digital de las estructuras de estos metabolitos (Figura 1a).

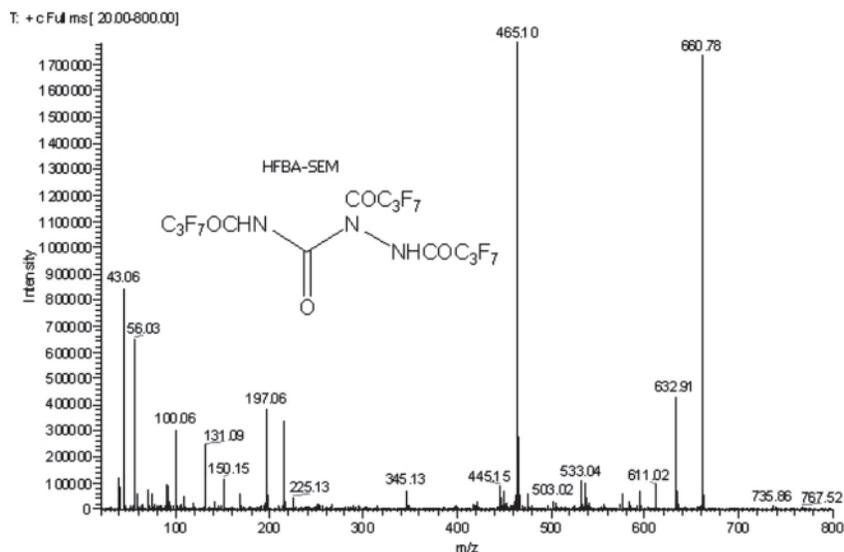


Figura 2. Espectro de masas del metabolito derivatizado semicarbazida (SEM).

Se realiza el estudio de poder lograr el espectro del HFBA bajo las condiciones analíticas del método desarrollado en el inyector de temperatura programable, llegando a la conclusión que él mismo se elimina por el flujo del split de 50 ml/min, por lo que el derivatizante no interfiere en los espectros de masas obtenidos durante los procesos de adquisición.

Una característica al parecer muy importante de este método analítico desarrollado, es que en las masas bajas hay un comportamiento repetitivo que caracteriza a esta familia de metabolitos de nitrofuranos ya que los iones $m/z = 43$ $[\text{HNCO}]^+$, $m/z = 69$ $[\text{CF}_3]^+$, $m/z = 100$ $[\text{C}_2\text{F}_4]^+$,

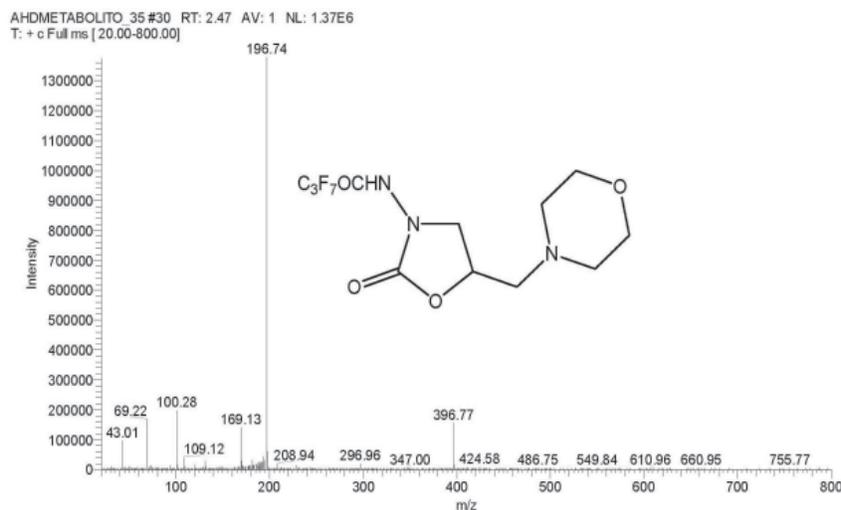


Figura 3. Espectro de masas del metabolito derivatizado 3-amino-morfolinometil-2-oxazolidinona (AMOZ).

$m/z = 169$ $[\text{C}_3\text{F}_7]^+$, siendo la huella digital en las masas bajas de estos cuatro metabolitos estudiados, la diferencia entre ambos métodos es que al comparar este método analítico con los métodos de LC/MSMS vemos como por ejemplo en la SEM el metabolito 2-NBA-SEM, el peso molecular obtenido es de 209 el cual generalmente tiene baja intensidad con una masa de 209 uma (Hurtaud, 2006; Saari, 2004; Zöllner, 2003) y en el caso del método propuesto GC/MSMS se obtiene el cluster en las masas altas con un ión molecular de 661 uma, con una intensidad del ión molecular casi del 100% (Figura 2).

La derivatización en los métodos analíticos por cromatografía líquida es necesaria porque mejora la eficiencia y la sensibilidad del método, indistintamente en espectrometría de masas y cuando se utiliza la cromatografía líquida es prácticamente obligatorio el empleo de las reacciones de derivatización para mejorar la sensibilidad y selectividad en las masas baja. En los métodos en LC/MSMS la derivatización de los nitrofuranos se realiza con el p-Nitrobenzaldehído produciendo derivados iminas para mejorar la respuesta UV cuando se emplean detectores de arreglo de diodos, la masa molecular del analito en estos casos se incrementa de 75 que es el peso molecular del SEM en tres veces obteniéndose el peso molecular del derivado de 284 g/ml, esto disminuye el background en las masas bajas, pero no lo reduce por completo, por lo que hoy en día para su cuantificación se está exigiendo la utilización de compuestos deuterados de estos metabolitos (Pereira, 2004).

En el sistema desarrollado la derivatización se realiza con HFBA, logrando que la masa molecular se incremente en 8,5 veces con respecto al metabolito derivatizado, que es de 661 uma (cluster) (Figura 2), en este caso la molécula del

metabolito derivatizado se ve favorecida porque se incrementa la energía de resonancia del 3HFBA-SEM con respecto al compuesto original, por lo que la energía total de la molécula disminuye y es por esta razón que el ión molecular tiene una intensidad elevada con respecto al derivado obtenido con 2-NBA-SEM, derivatizado con el p-Nitrobenzaldehido.

Estos objetivos de desarrollo del método están basados en la hipótesis de que las moléculas termolábiles de los metabolitos AHD, SEM, AMOZ, AOZ, son estables si las mismas son protegidas en los puntos débiles de la molécula, en las figuras 2, 3, 4 y 6 se pueden observar los espectros de masas de barridos completos de cada uno de los metabolitos. En los parámetros relacionados a la fragmentación masas masas (MS/MS) fueron estudiados aunque trabajamos en su total optimización, focalizando en particular la energía de colisión y el voltaje aplicado a los iones padre, en vista de obtener una mayor sensibilidad y especificidad en los espectros de masas tandem (Tabla 1). La energía de colisión fue seleccionada para producir una mayor intensidad de los iones hijos (iones producto) y

manteniendo el ión precursor con una intensidad mínima del 5%, estas condiciones fueron estudiadas utilizando la matriz de tejido de ganado porcino y estudiando el efecto que pudiera tener la contaminación de la matriz en una secuencia de mediciones de varias muestras.

Para optimizar completamente este método se pudieran realizar ajustes y hacer cambios en la energía de colisión para optimizar el espectro de barrido total de los iones hijos del ión padre. Los puntos de identificación en este sistema GC/PTV/EI/MS/MS pudieran ser seleccionados de acuerdo a los criterios desplegados en la Tabla 1, en los cromatogramas los tiempos de retención variaron alrededor de 0,2% entre las muestras de la matriz estudiada. En los próximos estudios realizaremos mediciones con otras matrices y mediremos la relación señal/ruido para evaluar el volumen de muestra que puede ser inyectado a través del PTV estudiando el efecto del ruido de fondo de la columna y del método de extracción, esto nos dará la posibilidad de poder optimizar el efecto de la energía de colisión (CID) y el voltaje de excitación (q) que puede tomar valores de 0,225, 0,3 y 0,45, de acuerdo a estos valores nos dará un compromiso entre la selección del rango de masa de los iones producto para lograr obtener de acuerdo con la complejidad de la matriz una intensidad del ión precursor de alrededor del 5%. Durante el proceso de derivatización de las moléculas de los metabolitos de nitrofuranos, se formaron derivados estables, la muestra se reconstituye con 70 μ L de HFBA y 80 μ L de acetato de etilo en un vial, mezclándose en un vortex por 1 min y se inyecta 1 μ L en el PTV, bajo estas condiciones el porcentaje del coeficiente de variación por altura es de 1,89% y el porcentaje del coeficiente de variación por área es de 12,25%.

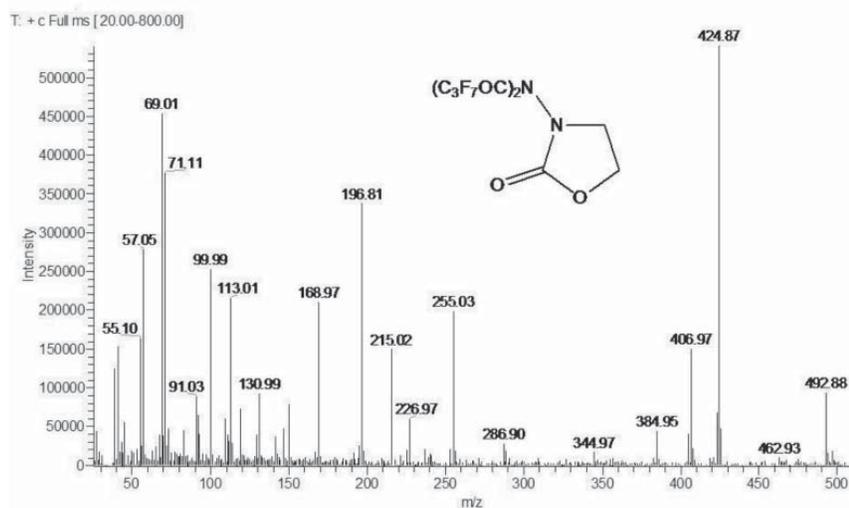


Figura 4. Espectro de masas del metabolito derivatizado 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ).

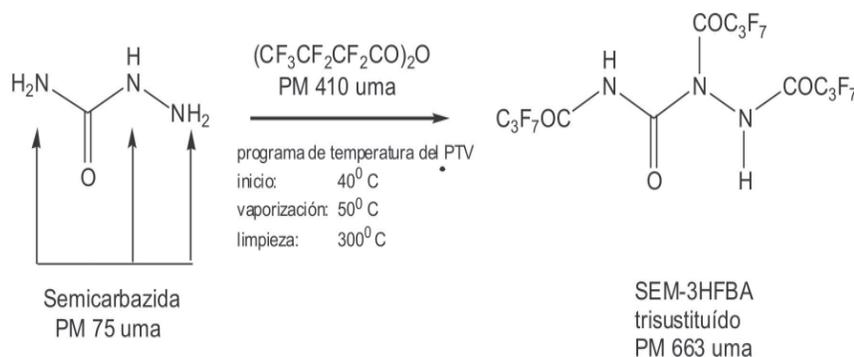


Figura 5. Reacción de la derivatización de la Semicarbazida con HFBA en el inyector PTV.

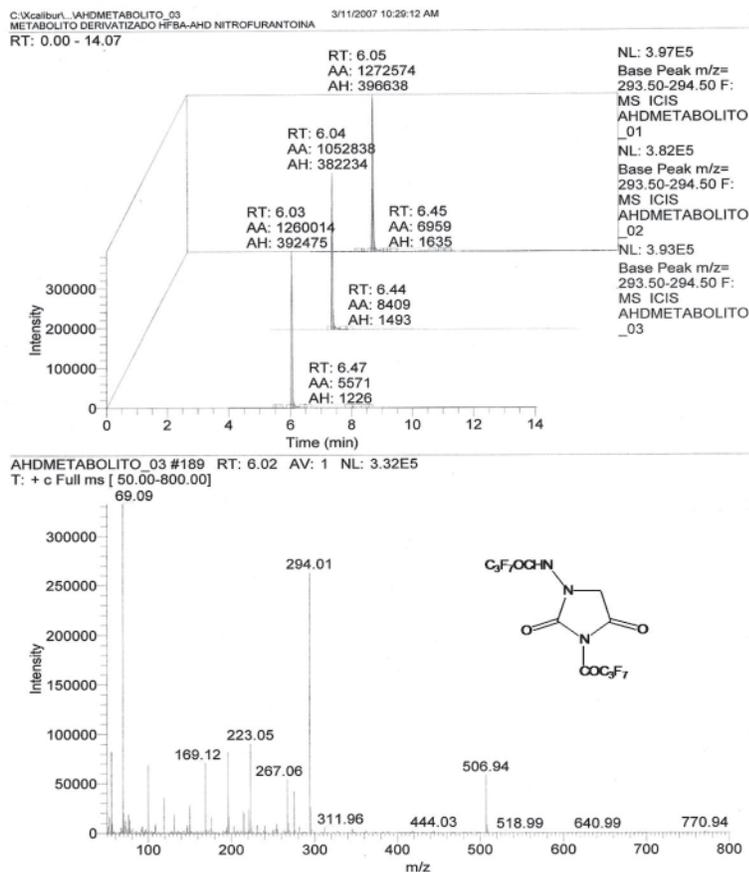


Figura 6. Repetibilidad y estabilidad térmica del AHD en el inyector PTV.

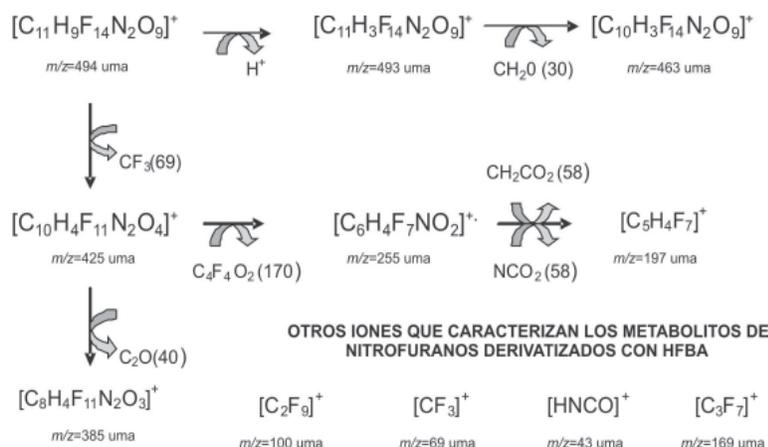


Figura 7. Probable ruta de fragmentación del 3-amino-2-oxazolidinona (AOZ).

Para evitar los efectos de la humedad en el medio ambiente y la descomposición térmica, se derivatizan los metabolitos de nitrofuranos extraídos de la matriz de ganado porcino que fue previamente fortificada a 1 µg/kg, con anhídrido heptafluorobutírico (C₃F₇CO)₂O en exceso con las condiciones de temperatura y presión anteriormente descritas, en el interior del inyector de temperatura programable del sistema GC/PTV/EI/MS/MS con el programa de temperatura anteriormente descrito. Obteniéndose las estructuras de los metabolitos derivatizados de 5-nitrofuranos: HFBA-AMAZ, HFBA-AHD, HFBA-AOZ, HFBA-SEM, los que se muestran en la Figura 1.

La reacción de derivatización con HFBA para el metabolito de la nitrofurano se representa en la Figura 5.

Reacciones similares ocurren con los otros tres metabolitos, con el AMAZ se forma un derivado monosustituido con el AHD un derivado disustituido y con el AOZ se forman derivados monosustituidos.

La sensibilidad del método depende en gran parte de la estabilidad térmica de los metabolitos derivatizados, para demostrar lo anterior, se realizaron adquisiciones en el sistema analítico en concentraciones de 0,5, 1, 5 y 10 ng/µL y a partir de los resultados obtenidos se determinó fortificar las muestras de tejido a una concentración de 1 µg/kg, cuyos espectros de masas de barrido completo de 20-800 uma de los metabolitos derivatizados se observan en la Figura 1a.

Un ejemplo donde no se observan productos de descomposición térmica se observa en la Figura 6, en donde los cálculos arrojan un coeficiente de variación de 1,8%.

Debido a que los espectros de masas de los derivados heptafluorobutirilados de los metabolitos de 5-nitrofuranos, no se encuentran reportados en la librería de referencia (NIST® 98 y Wiley® 275).

La propuesta de ruta de fragmentación del AOZ, se describe en la Figura 7. Entre las ventajas de este método analítico

tico está la posibilidad de hacer inyecciones múltiples, que va a estar en dependencia de las condiciones de limpieza de la fuente de ionización, liner y otros componentes del sistema que influyen en la relación señal/ruido del equipo de medición, además la reacción en el puerto de inyección con el HFBA como una nueva posibilidad de derivatizar los metabolitos de nitrofuranos en un sistema en fase gaseosa.

En el método desarrollado, realiza una reacción con el anhídrido heptafluorobutírico en el PTV a baja temperatura, evitando la degradación de los metabolitos de nitrofuranos en el puerto de inyección, además los espectros de masas originan una mayor información estructural, por estas razones estamos proponiendo como método alternativo para el análisis este tipo de familias de compuestos, una comparación entre los sistemas LC/MSMS y el GC/MSMS se presenta en la Tabla 2 (Cooper, 2005). Los iones moleculares padres (M^+) de los metabolitos derivatizados formados con HFBA se muestran en la Tabla 1, donde los derivados que se forman en el inyector PTV, son estables bajo las condiciones de trabajo, este sistema desarrollado una vez optimizado con los parámetros presentados en Tabla 1 y validado pudiera ser superior que los sistemas tradicionales empleados en la actualidad para el análisis de nitrofuranos.

CONCLUSIONES.

El sistema GC/PTV/EI/MSMS de la compañía Thermo Electron Corporation empleado para detectar metabolitos de nitrofuranos con el método de tratamiento de la muestra experimentado, con la derivatización empleando el anhídrido heptafluorobutírico, combinado con el sistema analítico en fase gaseosa propuesto, empleando el inyector de temperatura programable, es una configuración más económica, sensible y específica, la cual para confirmación no necesita emplear derivados deuterados como se exige actualmente en los sistemas LC/MSMS para la determinación de metabolitos de nitrofuranos en tejido animal en fortificaciones en concentraciones establecidas por los límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) por lo que este método sirve para detectar y confirmar los residuos de metabolitos de nitrofuranos. Una vez optimizado el volumen de inyección, los límites de cuantificación pudieran ser menores

de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ las recuperaciones obtenidas estuvieron en un rango de 80%-110%.

Para lograr la optimización y validación de este método propuesto se deben lograr valores óptimos de los parámetros de la energía máxima de excitación (Maximum Excitation Energy, Activation q), voltaje resonante de excitación (Resonance Excitation RF voltage) tiempo de aislamiento (Isolation Time) y ventana de aislamiento (Isolation Width) en el sistema analítico empleado para el desarrollo de este método y una vez logrado esto se pudiera presentar a las autoridades sanitarias correspondientes, como una propuesta de método alternativo.

Para realizar mediciones rutinarias y dar cumplimiento a los reglamentos de las autoridades sanitarias, es necesario efectuar un estudio de aptitud entre los laboratorios que analizan estos residuos en México.

AGRADECIMIENTOS.

Damos gracias al Laboratorio de Toxicología Analítica del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias y al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, de la Universidad Autónoma del Estado de Baja California, México.

Tabla 2.

Comparación del análisis de metabolitos de nitrofuranos por LC/GC.

| PARAMETROS DE EVALUACIÓN | LC/ESI/QQQ/MSMS TRIPLE CUADRUPOLO | GC/PTV/EI/MSMS TRAMPA DE IONES |
|---|---|-------------------------------------|
| Barrido completo (Full Scan) | Información estructural limitada | Huella digital de la molécula |
| Elección de iones precursores | Un solo ión precursor | Varios iones precursores |
| Iones diagnóstico (fracciones de masa y puntos de ID obtenidos) | De un fragmento de la molécula | De varios fragmentos de la molécula |
| Iones hijos | Un solo ión hijo | Varios iones hijos |
| Puntos de identificación | 2 iones precursores cada uno con un ión de segunda generación (no cumple) | Posibilidad de 5 o más puntos de ID |
| Peso molecular del derivado | Menor peso molecular | Mayor peso molecular |

REFERENCIAS

- Comisión de Emergencia Sanitaria Apícola. (2005). Nitrofuranos en Miel, Informe de la Comisión, <http://www.senasa.gov.ar/sanidad/abejas/informe.php>. Junio.
- Cooper K.M., Mulder P.P., van Rhijn J.A., Kovacsics L., McCracken R.J., Young P.B. and Kennedy D.G. (2005). Depletion of four nitrofurant antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissues and determination using LC-MS/MS and HPLC-UV. *Food additives and contaminants*; Mayo Vol. 22(5); pp. 406-14.

- Diario oficial de las comunidades Europeas. (2002). Por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Decisión de la comisión 2002/657/CE. L 221/8-L 221/34.
- Effkemann S, and Feldhusen F. (2004). Triple-quadrupole LC-MS-MS for quantitative determination of nitrofurán metabolites in complex food matrices. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, Nov. Vol. 378; pp. 842-844.
- Finzi J.K., Donato J.L., Sucupira M. and De Nucci G. (2005). Determination of nitrofurán metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, Sep; Vol. 824(1-2); pp. 30-35.
- Harting L., And Von Czapiewski K. (2005). Detecting nitrofurán metabolites in animal products using LC/MS/MS. *Espectroscopy Europe*. Vol 17; pp. 21-23.
- Hurtaud D., Verdon E., Blot J. and Sanders P. (2006). Proficiency study for the determination of the nitrofurán metabolites in shrimps. *Food additives and contaminants*. Junio, Vol 23 (6); pp. 569-578.
- Lanzelotti P. and Maldonado M. (2004). Primer estudio de casos de la distribución de concentraciones de nitrofuranos en la cera y en la miel en los diversos cuadros de una misma colmena, incluyendo la variable temporal. *Melacrom laboratorio de control de calidad*, Buenos Aires Argentina. pp 1-4.
- Matus E., Jacques J. and Albornoz A. (2005). Highly Selective Detection and Identification of Nitrofurans Metabolites in Honey using LC/MS/MS. *Food additives and contaminants*. Agosto. Vol. 23(5); pp. 508-13.
- Montoya V. (2003). *Métodos de screening y confirmación para la detección de antibióticos: Cloranfenicol y nitrofuranos*. Mayo. Vol. 22(5); pp. 406-14.
- National Institute of Standards and Technology (NIST) Scientific and technical Database/Wiley 275. (1998). Standard reference database 1A, mass spectral library with search program (data version: Nist 05, software version 2.0d).
- Pereira A., Donato L and Nucci G. (2004). Implications of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products. *Food additives and contaminants*, Enero vol. 21(1); pp. 63-69.
- Saari L. and Peltonen K. (2004). Novel source of semicarbazide: levels of semicarbazide in cooked crayfish samples determined by LC/MS/MS. *Food additives and contaminants*, Septiembre. Vol 21(9) pp. 825-832.
- Tangallapally R., Yendapally R., Daniels T., Lee R. and Lee R. (2007). Nitrofurans as novel antituberculosis Agents: identification, Development and Evaluation. *Current topics in medicinal chemistry*, Vol. 7; pp 509-526.
- US FDA: Food and Drug administration. Detection of Nitrofurán Metabolites in Shrimp, <http://www.cfsan.fda.gov/~comm/methnf.html> Julio 2006.
- Vass M., Kotkova L., Diblikova I., Nevorankova Z., Cooper K., Kennedy D. and M. Franek. (2005). Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ, a tissue bound metabolite of furazolidone. *Vet Med*. Vol 50 pp. 300-310.
- Velázquez L., Rodríguez O. and Soto A. (2005). Procedimiento IT-TA-A-06, método analítico para la determinación de anabólicos, desarrollado en el Laboratorio de Toxicología Analítica de la Universidad Autónoma del Estado de Baja California, acreditado ante la entidad mexicana de acreditación con número SA-010-001/06.
- Zöllner P., Leitner A., Jodlbauer J., Mayer B., and Linder W. (2003). Improving LC-MS/MS Analyses in complex food matrices Part II—Mass Spectrometry. *LC-GC Europe*. Junio.