

ARTÍCULO ORIGINAL

Validación de un método multiresiduos en UHPLC-MS/MS para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*

Validation of a multi-residue method in UHPLC-MS/MS for determination of ten veterinary antibiotic residues in *Oncorhynchus mykiss*

Nathaly Hurtado  ^{1a*}, Diego Chirinos  ^{2,3 b}, Yenka Flores  ^{4c}, Diana Ochoa  ^{1,4d}, Luis Huicho  ^{4,5,6 e} y Maria Rivera-Chira  ^{1,3,4 f}

¹ Facultad de Ciencias y Filosofía, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

² Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria (LACCSA), Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

³ Centro de Innovación Productiva y Transferencia Tecnológica Privado Acuícola de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (CITEacuícola UPCH), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁴ Centro de Investigación para el Desarrollo Integral y Sostenible (CIDIS), Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁵ Centro de Investigación en Salud Materna e Infantil, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

⁶ Facultad de Medicina “Alberto Hurtado”, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú

^a nathaly.hurtado.g@upch.pe, ^b diegochpa@gmail.com, ^c yenka.flores@upch.pe, ^d diana.ochoa@upch.pe, ^e lhuicho@gmail.com, ^f maria.rivera.c@upch.pe

* Autor de correspondencia

| Recibido: 16/03/22 |
| Arbitrado por pares |
| Aceptado: 23/06/22 |

Resumen

En el Perú existen protocolos regulados para la vigilancia de los residuos antibióticos en el área alimentaria. No obstante, otros rubros como el sector acuícola, que están en continuo crecimiento, no cuentan con controles de vigilancia rutinarios a pesar del uso de antibióticos en los productos de cultivo. La falta de control se debe en parte a que el ente regulador peruano (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera SANIPES) no cuenta con ensayos validados, regulados o aceptados para determinar y cuantificar la presencia de residuos veterinarios en productos acuícolas. Por ende, con el objetivo de identificar y determinar si estos



residuos se hallan dentro del límite máximo permitido de acuerdo a la regulación nacional, se validó un método de multiresiduos de 10 antibióticos mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas de triple cuadrupolo (UHPLC-MS/MS) evaluado en la trucha arcoíris, el producto acuícola de mayor producción nacional. La validación incluyó los parámetros de selectividad, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación y precisión, basándose en los criterios de aceptabilidad de la guía de validación de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA). Con el método validado, se analizaron los niveles de residuos de antibióticos en muestras de trucha arcoíris adquiridas al azar en 6 diferentes mercados de Lima Norte (Los Olivos, Independencia, Comas, Puente Piedra, San Martín). Se verificó una adecuada selectividad, menor al 13.82%; una linealidad con valores mayores de 0.99; una sensibilidad con tendencia vertical para la mayoría de los antibióticos; límites de detección y cuantificación menores de 1.994 µg/kg y 6.647 µg/kg, respectivamente; una recuperación dentro del rango de 90% a 115% y una precisión menor del 9%. Finalmente, se detectó trazas de oxitetraciclina en una de las muestras de mercado. El método demostró ser adecuado para la determinación de 10 residuos antibióticos, constituyendo una alternativa útil para el monitoreo de residuos de antibióticos en productos acuícolas.

Palabras clave: *oncorhynchus mykiss*; residuos antibióticos, UHPLC/MS/MS, regulación sanitaria

Abstract

In Peru there are regulated protocols for monitoring antibiotic residues in the food industry. However, the aquaculture sector, in continued growth, does not have routine monitoring checks, although the use of antibiotics in aquaculture products is common. The lack of monitoring is partly due to the fact that the Peruvian regulatory body (National Fisheries Health Agency [Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, SANIPES]) does not have validated, regulated or accepted tests to determine and quantify the presence of veterinary residues in aquaculture products. Therefore, to identify and determine if the residues are within the maximum limit allowed by national regulations, we aimed to validate a multiresidue method of 10 antibiotics through the ultra-high performance liquid chromatography coupled to a triple quadrupole mass spectrometric (UHPLC-MS/MS), assessed in rainbow trout that is the aquaculture product with the highest national production. The validation

includes parameters of selectivity, linearity, sensitivity, detection limit, quantification limit, recovery range and precision, based on the acceptability criteria of the chemical method validation guide of the Food and Veterinary Medicine Program of the Food and Drug Administration of the United States (FDA). After the validation of the method, the levels of antibiotic residues in rainbow trout samples acquired at random in 6 different markets in North Lima (Los Olivos, Independencia, Comas, Puente Piedra, San Martín) were analyzed. The method showed an adequate selectivity, lower than 13.82%; a linearity with values greater than 0.99; a sensitivity with a vertical trend for most antibiotics; detection and quantification limits lower than 1,994 µg/kg and 6,647 µg/kg, respectively; a recovery within the range of 90% to 115% and an accuracy of less than 9%. Traces of oxytetracycline were detected in one of the market samples. The method proved to be adequate for the determination of 10 antibiotic residues, being a useful alternative for monitoring aquaculture products.

Keywords: *oncorhynchus mykiss*; antibiotic residues, UHPLC-MS/MS, sanitary regulation

Introducción

En el Perú, el consumo y exportación de los productos acuícolas y en especial de la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) han aumentado a lo largo de esta última década, como lo demuestra el anuario estadístico del Ministerio de la Producción (Ministerio de la Producción del Perú, 2021). Al ser un producto de consumo humano, la trucha arcoíris requiere pasar por diversos controles de calidad que aseguren su inocuidad y el cumplimiento de las regulaciones sanitarias correspondientes. Entre los que se realizan a los productos acuícolas se encuentran los ensayos de detección del nivel de residuos de medicamentos, según se describe en el procedimiento del Programa de Control de Sustancias y Residuos (PCSR) (SANIPES, 2017). Aunque, el PCSR no especifica un cronograma de recolección de muestras para el análisis de estas sustancias, explica que se debe extraer el 1% de la producción anual para tal propósito (SANIPES, 2017). Por tanto, el análisis del 1% no se realiza por empresa productora, sino en relación a la producción anual de cada tipo de pez (SANIPES, 2017). En el contexto de la realidad pesquera del país, es probable la presencia de múltiples lotes de productos no analizados. Adicionalmente, SANIPES, encargado de normar, supervisar y fiscalizar la sanidad e inocuidad en toda la cadena productiva de los alimentos,

aditivos y productos pesqueros y acuícolas, sólo cuenta con un método validado y aceptado, basado en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa en tandem, exclusivo para medicamentos antihelmínticos, por lo que el resto de sustancias controladas deben ser analizadas en laboratorios extranjeros o resultan postergadas (SANIPES, s.f.). Esta situación es indeseable desde el punto de vista de salud pública, considerando que las enfermedades más comunes que padecen los peces en el país, según reporta el propio SANIPES, son producidas por bacterias (SANIPES, 2016). Estudios similares sobre patologías en truchas arcoíris coinciden con esta conclusión (Mendoza & Palomino, 2004; Montesinos, 2018; Fernández, 2013; León et al., 2008; Fernando et al., 2019). En consecuencia, urge desarrollar y certificar nuevos análisis que permitan evaluar cuantitativamente la inocuidad de las especies en la cadena productiva, incluyendo aditivos (tales como acondicionadores y desinfectantes) y medicamentos (tales como antibióticos). La implementación sistemática de este tipo de métodos permitiría la adecuada supervisión de medicamentos y productos de consumo, lo cual se convertiría en un sello de calidad y garantía de que los productos nacionales cumplen con la regulación nacional e internacional vigente.

La técnica analítica de cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo, denominado en inglés Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS), es internacionalmente considerada como una técnica altamente sensible y selectiva y además es de uso estándar para la detección de todo tipo de análisis de residuos antimicrobianos (Mainero et al., 2017; FSIS, 2018). El servicio de seguridad e inspección alimentaria (FSIS) de los Estados Unidos tiene un procedimiento oficial para más de 90 antimicrobianos usando esta técnica analítica (FSIS, 2018). Esta técnica es utilizada incluso en productos acuícolas como el salmón, la trucha, el bagre, la corvina, la tilapia y otras especies, habiéndose desarrollado métodos para determinar grupos de analitos con 14 a más antibióticos diferentes en un solo análisis (Rocha et al., 2017; Santos et al., 2019; Tao, 2020). Estos antecedentes muestran la necesidad de la implementación de técnicas similares en el país y abren el paso para el establecimiento de métodos confiables de cuantificación de residuos de antibióticos en productos acuícolas, incluida la trucha arcoíris, de modo que se tenga un mejor control de la inocuidad de los productos hidrobiológicos antes de su consumo dentro y fuera del país. En tal sentido, el presente estudio tuvo como objetivo desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de diez residuos de antibióticos veterinarios en *Oncorhynchus mykiss*, utilizando cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a un detector de masas de triple cuadrupolo y probar el método en muestras de mercado que van directo al consumidor.

Materiales y métodos

Obtención y preparación de muestras

Se obtuvieron muestras de trucha arcoíris libres de residuos antibióticos de una empresa local de Pasco dedicada a la acuicultura (ver Apéndice 1), las que se mantuvieron protegidas de la luz y fueron almacenadas a -18 °C hasta la preparación para el análisis. La preparación de las muestras siguió las pautas de los estudios de investigación del método oficial del FSIS de los Estados Unidos, con optimizaciones para el presente estudio (FSIS, 2018; Geis-Asteggiante et al., 2012), según se describe a continuación.

Las muestras de truchas fueron descongeladas a temperatura ambiente y troceadas para obtener sólo fragmentos de músculo con piel y fueron posteriormente molidas utilizando el homogenizador Robocouper®). A partir de este homogenizado se pesaron aproximadamente 2.00 g de músculo de trucha en tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL y se realizó la fortificación para las pruebas de validación, con el agregado de 10 mL de una solución de acetonitrilo: EDTA 0.1 M con 0.1% de ácido fórmico (4:1 v/v). Posteriormente se homogenizó la mezcla con un equipo vórtex por 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se trasvasó a un tubo de 50 mL conteniendo 500 mg de adsorbente C18, se adicionaron 10 mL de Hexano, se agitó por 30 segundos y se procedió a centrifugar nuevamente a 5000 rpm por 10 minutos. A continuación, se eliminó la capa de hexano con una pipeta Pasteur y se transfirieron 5 mL del sobrenadante remanente a un tubo de centrífuga de polipropileno de 10 mL. El extracto se concentró hasta la sequedad en un equipo de evaporador de nitrógeno a 50 °C. El concentrado seco fue reconstituido con 1 mL de acetonitrilo (ácido fórmico al 0.1 % en agua (1:9 v/v)) y se filtró a través de filtros PDVF de 0.2 µm en viales de color ámbar. Finalmente, se inyectaron 2 µL en el equipo UHPLC-MS/MS Acquity Xevo TQ-XS (Waters®), del Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria del CITEacuícola UPCH, en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Estándares y reactivos

Los estándares utilizados en el estudio fueron los siguientes: enrofloxacino (99.8%, Sigma Aldrich), hidrato de hidrocloruro de ciprofloxacino (99.7%, Sigma Aldrich), ácido oxolínico (99%, Sigma Aldrich), amoxicilina trihidratada (98.74%, Dr. Ehrenstorfer), oxitetraciclina dihidratada (99.9%, Sigma Aldrich), hidrocloruro de clortetraciclina (93.3%, Sigma Aldrich), hidrocloruro de tetraciclina (97.5%, Sigma Aldrich), sulfadoxina (98.9%, Sigma Aldrich), sulfadimetoxina (99.6%, Sigma Aldrich) y florfenicol (99%, Sigma Aldrich).

Los reactivos utilizados fueron de grado LC-MS/MS o HPLC. Metanol (Sigma Aldrich), acetonitrilo (Merck), hexano (Merck), ácido fórmico (Honeywell Fluka), hidróxido de sodio (EMSURE), EDTA sal disódica (Merck), adsorbente C18 (Sigma Aldrich) y agua ultrapura del equipo Milipore Mili-Q system (Milford, MA, USA).

La primera dilución stock sigue las pautas de los estudios del FSIS para su dilución y conservación (FSIS, 2018; Geis-Asteggiante et al., 2012). Los estándares se llevan a una concentración de 1000 ppm (Soluciones Stock) de cada uno de los 10 estándares de antibióticos, los cuales fueron preparados disolviendo una cantidad apropiada de cada estándar primario en disolventes como acetonitrilo, metanol, 0.03 M de NaOH o agua ultrapura (para los betalactámicos). Las soluciones fueron almacenadas a -18° C en la oscuridad. Las soluciones estándares para la sintonización de los antibióticos fueron de 0.01 ppm y se prepararon realizando dos diluciones sucesivas donde se tomó 0.1 mL de la solución previa y se enrazaron en una fiola de 10 mL para cada antibiótico. Para las diluciones se utilizó como diluyente el ácido fórmico y el acetonitrilo (en una proporción de 0.1:99.9). Las soluciones para la curva de calibración fueron soluciones mezcla de estos estándares de antibióticos, para lo cual se realizaron diluciones hasta llegar a obtener concentraciones de 10, 50, 100, 200 y 300 ppb con el diluyente de ácido fórmico y acetonitrilo. Con el fin de mantener concentraciones homogéneas de cada antibiótico en las soluciones mezcla, las soluciones fueron previamente agitadas antes de cada dilución.

Análisis por UHPLC-MS/MS

El análisis por espectrometría de masas se realizó con el detector del equipo UHPLC-MS/MS Acquity Xevo TQ-XS (Waters®). La optimización de los parámetros fue realizada con las soluciones estándares para sintonización y bajo una fuente de ionización de electrospray (ESI) en modo ESI positivo, permitiendo al equipo optimizar los resultados para crear el método de este grupo de 10 antibióticos. Los parámetros optimizados fueron: voltaje de capilar 3.0 kV, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo del gas de cono (N₂) 20 L/h y flujo del gas desolvatación (N₂) 1000 L/h. La adquisición y procesamiento de datos en el equipo UHPLC-MS/MS se realizó con el programa MassLynx 4.2. En la Tabla 1 se muestran los principales parámetros de espectrometría de masa MS/MS por cada analito determinado en el presente estudio.

El análisis de cromatografía se realizó en el equipo de UHPLC-MS/MS a través de la separación de los analitos con la columna de fase reversa HSS T3, 100 mm largo*2.1 mm diámetro, 1.8 µm tamaño de partículas. Para la corrida cromatográfica se utilizó como fase móvil ácido fórmico al 0.1% en agua ultrapura

(Fase A) y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B), con un flujo de 0.5 mL/min. La gradiente de elución inició con 0 % de Fase móvil B hasta los 8 minutos, luego 100% de Fase móvil B hasta los 9.5 min al volver a 0 % de Fase móvil B hasta los 13 minutos en que culmina la corrida cromatográfica, con un tiempo de lavado para llegar al equilibrio inicial de la columna, que dura 3.4 minutos antes de la siguiente corrida. El volumen de inyección fue de 2 μ L y la temperatura de la columna de 40 °C.

Tabla 1

Ventanas de tiempo de retención (t_R) y parámetros MS/MS de los 10 analitos del estudio

Estándar / Analito	Precursor (m/z)	Producto (m/z)	Modo de ionización	Voltaje cono (V)	Colisión (V)	Tiempo de retención (min)
Enrofloxacino	360.168	316.115	Positivo	40	20	2.55
		244.929	Positivo	40	10	
Ciprofloxacino	332.196	288.221	Positivo	40	25	2.39
		245.143	Positivo	40	15	
Ácido oxolínico	262.068	244.063	Positivo	40	15	3.45
		159.967	Positivo	40	25	
Amoxicilina	366.196	349.182	Positivo	40	32	1.68
		113.991	Positivo	40	10	
Tetraciclina	445.27	410.25	Positivo	20	18	2.52
		154	Positivo	20	25	
Clortetraciclina	479.332	444.15	Positivo	40	15	2.99
		462.2	Positivo	40	18	
Oxitetraciclina	461.24	426.21	Positivo	40	18	2.38
		443.307	Positivo	40	12	
Sulfadoxina	311.07	155.922	Positivo	30	30	3.18
		91.989	Positivo	30	15	
Sulfadimetoxin	311.132	155.983	Positivo	30	25	3.62
		91.98	Positivo	30	16	
Florfenicol	358.2	240.86	Positivo	25	16	3.24
		205.8	Positivo	25	26	

Nota. m/z (Relación de la masa molecular y el número de carga) y V (Voltaje)

Validación del método analítico

Para validar el método se utilizaron prioritariamente los criterios de aceptabilidad de la guía de métodos químicos del Programa de Alimentos y Medicina Veterinaria de la FDA de los Estados Unidos del 2019, en la que se requiere más de 9 muestras por nivel de concentración. En el presente estudio se utilizó 10 muestras para cada concentración analizada y se estudiaron los siguientes parámetros: Selectividad, Sensibilidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Recuperación (Exactitud) y Precisión (Repetibilidad y Reproducibilidad). La Tabla 2 muestra los criterios de aceptabilidad para cada uno de estos parámetros, de acuerdo a la guía de validación de la FDA (FDA, 2019).

Adicionalmente, guías como la IUPAC, la guía de residuos de pesticidas en alimentos (SANTE), la guía de SERNAPESCA y la guía de validación de métodos del Instituto Nacional de Salud de Chile sirvieron de orientación para los parámetros que no tenían criterio de aceptación en la guía de la FDA (Thompson et al., 2002; EURL, 2019; SERNAPESCA, 2018; Instituto de Salud Pública de Chile, 2010). Todos los parámetros analizados fueron realizados en matrices fortificadas, para minimizar el efecto matriz que pudiera existir, es decir, analizar directamente de la muestra y no de una solución mezcla.

Tabla 2

Parámetros de validación y sus criterios de aceptación según la FDA (2019)

Parámetro de validación	Criterios de aceptación de la FDA			
	0.001 mg/kg	0.01 mg/kg	0.1 mg/kg	1 mg/kg
	1 ppb	10 ppb	100 ppb	1 ppm
Límite de detección	≤ 0.0002 mg/kg	≤ 0.002 mg/kg	≤ 0.01 mg/kg	≤ 0.1 mg/kg
Límite de cuantificación	≤ 0.0004 mg/kg	≤ 0.004 mg/kg	≤ 0.02 mg/kg	≤ 0.2 mg/kg
Desviación estándar relativa (RSD _r)	≤ 22%	≤ 22%	≤ 11%	≤ 8%
Reproducibilidad intralaboratorio (PRSD _r)	≤ 22%	≤ 22%	≤ 22%	≤ 16%
Recuperación	40% - 120%	60% - 115%	80% - 110%	80% - 110%

Nota. FDA (2019, p. 23)

Análisis en muestras comerciales (productos disponibles en el mercado)

Las muestras de trucha para el análisis de residuos antibióticos con el método validado fueron obtenidas como truchas directas para el consumo humano en mercados de Lima Norte ubicados en los distritos de Los Olivos, Independencia, Comas, Puente Piedra y San Martín de Porres (ver Apéndice 2). Las muestras usadas para estos análisis siguieron la metodología descrita anteriormente, excepto que estas no fueron fortificadas. La secuenciación de su corrida cromatográfica se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Secuencia de las corridas cromatográficas para cada muestra en el UHPLC-MS/MS.

Número de corrida	Muestra	Volumen
1	St 0	2 μ L
2	St 1	2 μ L
3	St 2	2 μ L
4	St 3	2 μ L
5	St 4	2 μ L
6	St 5	2 μ L
8	Blanco: Solución C2 (Solución de reconstitución del extracto)	2 μ L
9	Extracto de la Muestra M1 (replica 1)	2 μ L
10	Extracto de la Muestra M1 (replica2)	2 μ L
10	Lavado débil	1200 μ L
11	Lavado fuerte	400 μ L

Nota. Los St son las diferentes concentraciones de la curva de calibración

Resultados

Selectividad

Este parámetro fue obtenido a través de la relación del promedio de 10 muestras fortificadas con la mezcla de antibióticos a 10 ppb y la muestra blanco. El porcentaje de la muestra blanco (MB) no debe ser mayor al 30% en comparación con el promedio de matrices fortificadas, de acuerdo a la guía de procedimientos de validación SANTE/11945/2015 (EURL, 2019). Este criterio se cumplió en todos los casos, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4

Porcentaje del área del pico cromatográfico en la matriz blanco respecto al área del pico en la matriz fortificada del analista 1 (A1) y del analista 2 (A2) UHPLC-MS/MS

Analitos	Área de	Área del pico	Área del pico
	la matriz	cromatográfico	cromatográfico
	blanco	10 ppb (A1)	10 ppb (A2)
	(MB)	(n=10)	(n=10)
Enrofloxacino	40030.41	289700.072	13.81
			8
Ciprofloxacino	6078.979	96260.664	6.315
Ácido oxolínico	18983.38	612786.513	3.098
	7		
Amoxicilina	70.239	14384.302	0.488
Tetraciclina	449.111	61627.4557	0.729
Clortetraciclina	54.527	14784.016	0.369
Oxitetraciclina	3132.725	67280.5858	4.656
Sulfadoxina	1328.583	168330.087	0.789
Sulfadimetoxina	2742.832	162807.939	1.685
Florfenicol	303.211	4224.5143	7.177
Criterio de aceptación		% MB < 30%	

Linealidad

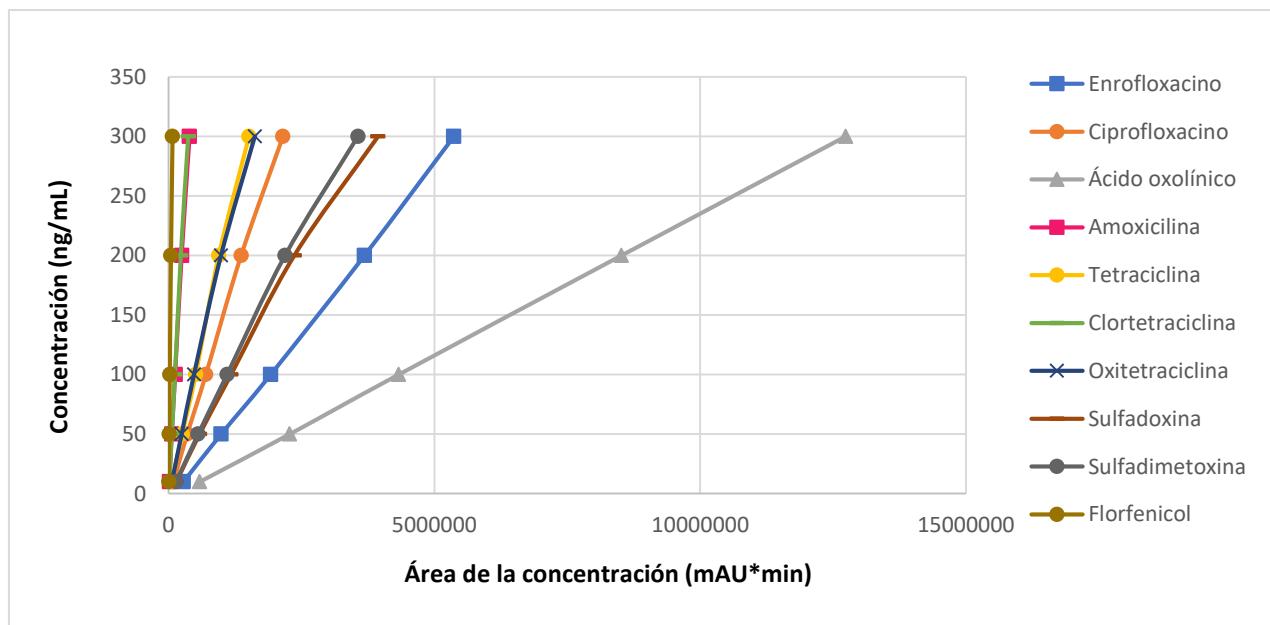
La linealidad de la curva de calibración del método fue calculada a través de la estimación lineal, utilizando el método de mínimos cuadrados. El coeficiente de determinación y el coeficiente de correlación fueron mayores a 0.994 y 0.997, respectivamente, indicando que hay una correlación lineal entre las variables x e y para cada analito y por tanto que la curva de calibración es aceptable (Lee, 2012). Adicionalmente se realizó una regresión lineal en el software de análisis estadístico STATA 16.0, en el que se encontró un p-value < 0.05, lo que indica que existe una relación directamente proporcional entre el área del pico cromatográfico y la concentración de los residuos, con un nivel de confianza del 95%.

Sensibilidad

La sensibilidad fue obtenida de manera gráfica comparando las curvas de calibración de los 10 diferentes analitos, según se aprecia en la Figura 1. Las pendientes verticales muestran mayor sensibilidad debido a que variaciones mínimas del área bajo la curva generan una mayor respuesta a la variación de la concentración (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010). Según este análisis, los analitos menos sensibles son el enrofloxacino y el ácido oxolínico.

Figura 1

Gráfica de comparación de las curvas de calibración de los 10 analitos



Límite de detección y Límite de cuantificación

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron iguales a tres veces y diez veces la desviación estándar, respectivamente, según lo especifica la IUPAC (Thompson et al., 2002). La desviación estándar se obtiene de la concentración blanco o de la mínima concentración de referencia (SERNAPESCA, 2018). Para este estudio fue de 10 matrices fortificadas a 10 ppb. El único analito que no cumplió con el límite de cuantificación fue la clortetraciclina, que excedió la cantidad que indica el criterio de aceptación de la guía de la FDA, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5

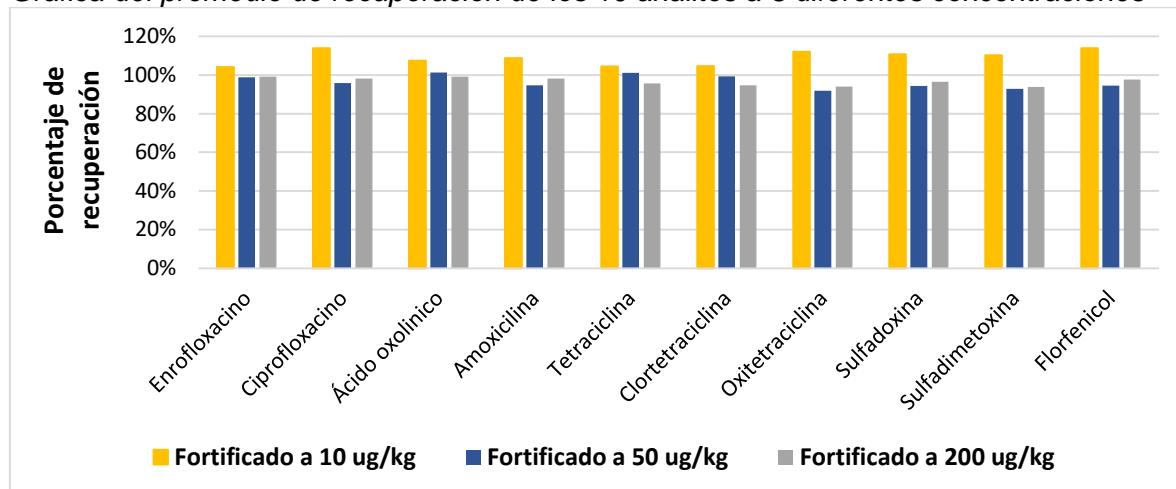
Límite de detección y de cuantificación

Nº	Analito	Desviación estandar (s)	LOD ($\mu\text{g/kg}$) (3^*s)	LOQ ($\mu\text{g/kg}$) (10^*s)
1	Enrofloxacino	0.375	1.124	3.748
2	Ciprofloxacino	0.228	0.685	2.283
3	Ac. Oxolínico	0.377	1.130	3.765
4	Amoxicilina	0.303	0.910	3.035
5	Oxitetraciclina	0.290	0.869	2.898
6	Clortetraciclina	0.665	1.994	6.647
7	Tetraciclina	0.267	0.801	2.671
8	Sulfadoxina	0.221	0.664	2.214
9	Sulfadimetoxina	0.333	0.998	3.327
10	Florfenicol	0.302	0.906	3.020
			LOD ≤	LOQ ≤
Criterio de aceptación			0.002 mg/kg o 2 $\mu\text{g/kg}$	0.004 mg/kg o 4 $\mu\text{g/kg}$

Nota. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) del método

Recuperación

La recuperación se realizó en 20 muestras para cada nivel de concentración, habiéndose obtenido el promedio de recuperación de cada analito en cada uno de estos niveles. El criterio de aceptación de la recuperación de acuerdo a la guía de la FDA es de 80-110% y para concentraciones menores de 100 ppb es de 60-115%. Todos los analitos se encuentran dentro del rango requerido (superior a 80%), según se muestran en la Figura 2.

Figura 2*Gráfica del promedio de recuperación de los 10 analitos a 3 diferentes concentraciones***Precisión**

La repetibilidad es parte de la precisión ejercida bajo las mismas condiciones de análisis y fue realizada a 10 muestras por cada analista. Como se muestra en la Tabla 6, todas las muestras cumplen con el criterio de aceptación de la FDA, aunque existe una mayor variación en las muestras fortificadas a menor concentración.

Tabla 6

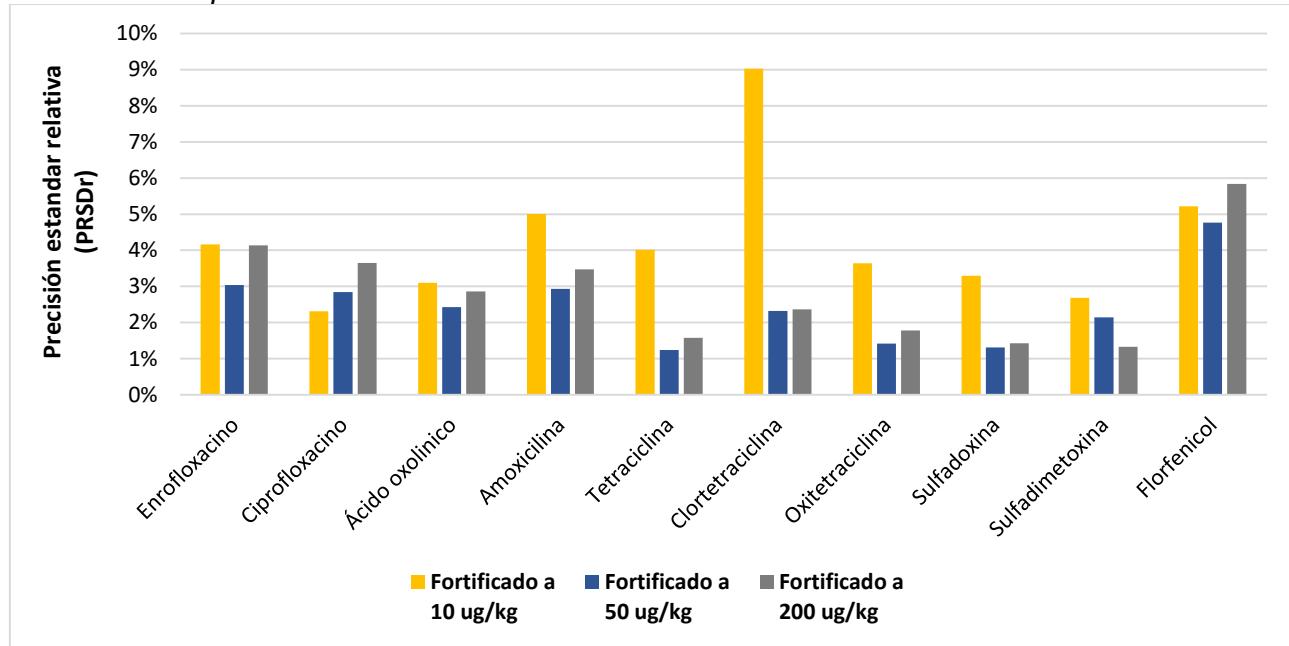
Repetibilidad del método según el analito

Nº	Analitos	Fortificado a 10 µg/kg		Fortificado a 50 µg/kg		Fortificado a 200 µg/kg	
		Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)	Analista 1 (n=10)	Analista 2 (n=10)
1	Enrofloxacin	3.69	3.05	0.89	1.79	0.97	1.27
2	Ciprofloxacin	2.02	2.34	1.28	1.90	2.06	2.01
3	Ácido oxolinico	3.55	2.16	1.59	1.46	1.12	1.86
4	Amoxicilina	2.69	3.82	1.40	1.57	1.50	0.78
5	Tetraciclina	2.86	2.24	1.31	1.22	1.37	1.76
6	Clortetraciclina	5.95	5.50	2.69	2.03	1.38	1.44
7	Oxitetraciclina	2.32	2.86	1.46	1.45	1.36	1.93
8	Sulfadoxina	2.00	4.34	1.53	1.09	1.21	1.43
9	Sulfadimetoxina	3.03	2.35	1.15	1.81	0.90	1.03
10	Florfenicol	2.76	3.71	3.36	4.16	1.92	2.60
Criterio de aceptación		<22%		<11%		<8%	

La reproducibilidad se muestra a través de la desviación estándar relativa de ambos analistas, apreciándose la evidente variación de precisión a 10 ppb (Figura 3). No obstante, todos los valores se mantienen dentro de los márgenes establecidos por la FDA, es decir en valores menores al 22%.

Figura 3

Gráfica de la reproducibilidad de los 10 analitos a 3 diferentes concentraciones

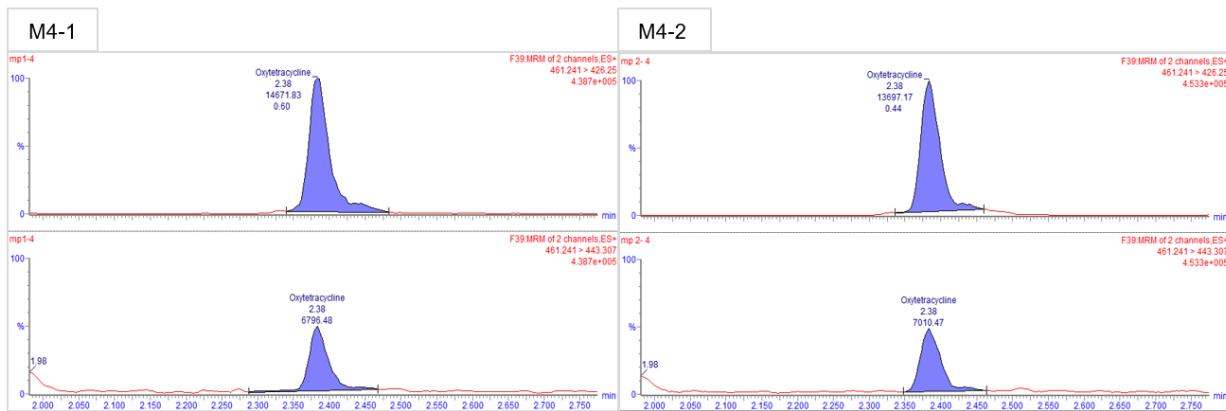


Análisis en muestras de mercado

En los resultados obtenidos de las muestras de mercado no se detectó presencia de los analitos del método, excepto en el caso de la oxitetracilina, que se detectó por encima del límite de detección del método (Tabla 5), a una concentración de 1.359 µg/kg, en la muestra obtenida del mercado de Comas. El equipo de UHPLC-MS/MS obtuvo automáticamente las señales de los fragmentos o iones hija de la señal de oxitetracilina de la muestra analizada, debido a los parámetros de identificación (ver Tabla 1), que se obtuvieron en la sintonización y que quedan registrados en el software del equipo como parte del método. En la Figura 4 se aprecia los fragmentos de la molécula de oxitetracilina obtenida en cada réplica.

Figura 4

Cromatograma de los fragmentos de oxitetraciclina de la muestra del mercado de Comas (M4)



Discusión

El método evaluado demostró ser adecuado para la determinación de los residuos antibióticos estudiados. Se discute a continuación los diferentes parámetros de validación obtenidos en el presente estudio. La cromatografía liquida acoplada a un espectrómetro de masas en un equipo de UHPLC-MS/MS es un método selectivo, debido a la forma en que reconoce los fragmentos de la molécula. Al compararlo con un blanco, se pudo verificar que (i) no existe ninguna señal suficientemente fuerte que pueda ocasionar interferencia en ese mismo tiempo de retención como se aprecia en la Tabla 4 y (ii) puede separar los antibióticos a pesar de que algunos son de la misma familia química (EURL, 2019). Por otra parte, la sensibilidad y la linealidad son parámetros que se pueden evaluar por un método visual observando la tendencia de la gráfica, aunque para la linealidad es obligatorio que el coeficiente de determinación y el de correlación sean mayores a 0.99 (Instituto de Salud Pública de Chile, 2010; Lee, 2012).

En cuanto al límite de detección y de cuantificación, se observó en el presente estudio que la clortetraciclina fue el único analito que estuvo fuera del criterio de cuantificación, presentando una mayor desviación estándar. No obstante, cabe mencionar que este parámetro se puede realizar en muestra blanco, en la que

la desviación estándar sería menor y probablemente cumpliría con el criterio, aunque correspondería al cálculo de una interferencia, por lo que sería preferible realizar la prueba con la desviación estándar de una concentración de referencia mínima (SERNAPESCA, 2018). Sin embargo, debe remarcarse que los resultados obtenidos en el presente estudio muestran un mejor rendimiento en comparación a otros estudios, en los que se han reportado LOQ de alrededor de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para los mismos analitos (Rocha et al., 2017; Pereira et al., 2012).

En cuanto a la recuperación, todos los analitos cumplieron con el criterio referencial, si bien los resultados de la concentración menor se encuentran cerca del límite, aunque dentro de los límites de la guía SANTE sugiere valores de recuperación entre 70-120% (FDA, 2019; EURL, 2019).

En cuanto a los parámetros de precisión, las mayores variaciones ocurrieron en el menor nivel de concentración, especialmente en el caso de la clortetraciclina, aunque todos los analitos cumplieron con el criterio de aceptación. La variación en las concentraciones mínimas se explica porque las diluciones son más críticas, dado que cualquier microvolumen (por ejemplo, una gota) resulta significativa en la dilución, pudiendo alterar la concentración. Estudios previos en productos acuícolas han mostrado resultados de recuperación y precisión con perfiles más variables, con recuperaciones fuera de los límites del criterio de aceptabilidad de la guía de la FDA, pero dentro de los criterios de la precisión. No obstante, en todos los casos los valores referidos a la precisión fueron mayores a los del método evaluado en el presente estudio (Rocha et al., 2017; Pereira et al., 2012; kanda et al., 2015; Fedorova et al., 2013). Los estudios más recientes, que utilizaron la metodología multiresiduos en UHPLC-MS/MS (You-Yu et al., 2018; Grande-Martínez et al., 2018; Santos et al., 2019; Li et al., 2020), han reportado valores más acordes al criterio de aceptabilidad, semejantes a los nuestros, debido a optimizaciones realizadas en el procesamiento de la muestra. No obstante, cabe remarcar que en dichos estudios se reporta todavía una mayor variabilidad en la precisión.

Se debe recalcar que, a mayor número de analitos, los resultados de las pruebas suelen ser más variables que cuando se usa un menor número de analitos.

Por ende, la validación del presente método sólo tomó en cuenta los analitos que se encuentran en el procedimiento del control de residuos del ente regulador (SANIPES, 2008) y los que tienen registros sanitarios autorizados por SANIPES (Apéndice 3). Asimismo, debe mencionarse que, aunque sus criterios son parecidos, cada guía de validación tiene criterios propios. El presente estudio se basó en los criterios de la FDA para los parámetros de validación, exceptuando la selectividad, sensibilidad y linealidad, para los que no incluye criterios de aceptabilidad, por lo que se tuvo que recurrir al uso de otras guías de referencia.

Análisis en muestras comerciales de trucha arco iris

Los análisis en muestras de mercado se realizaron para verificar la presencia de antibióticos en productos que llegan directamente al consumidor. Si bien sólo se detectó oxitetraciclina en una concentración inferior a su límite permitido (Apéndice 3), es importante mencionar que la depuración de los medicamentos depende de condiciones del hábitat y ambientales, en relación a factores como temperatura y salinidad (Burka et al., 1997). La vida media del grupo de tetraciclinas es de 4.8 días a 16 °C y 8.9 días a 5°C (Burka et al, 1997). En el caso de la muestra con contenido de oxitetraciclina, se desconoce la zona de crianza de la trucha. No obstante, dado que la muestra fue adquirida en verano, es posible que las concentraciones de oxitetraciclina en la zona de producción sean mayores y debido al tiempo transcurrido entre la producción y comercialización, es verosímil que haya existido una degradación del analito, haciendo que se encuentre solamente trazas de oxitetraciclina en el material estudiado. Esta rápida degradación de algunos residuos veterinarios evidencia la urgente necesidad de realizar pesquisas de los productos acuícolas tanto cerca de las zonas de producción como de las de comercialización, con el fin de evaluar los procesos de asimilación y eliminación de los residuos en los productos a consumir.

Nuestros resultados indican que el análisis de analitos por cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo (LC-MS/MS), es un método confiable para la evaluación de multiresiduos veterinarios en tejidos.

Consideramos que, tras las validaciones realizadas, los próximos estudios deben enfocarse en caracterizar la vida media de los antibióticos permitidos, de acuerdo a las condiciones ambientales y socioeconómicas de la acuicultura en el país. Estudios de este tipo se han realizado en otros países de la región como Brasil, donde por ejemplo se ha estudiado el tiempo de excreción de sulfamida, demostrando que se requieren 10 días desde la última dosis administrada al pescado para obtener la concentración máxima permitida (100 µg/kg) (Nunes et al., 2018). Esta caracterización es de relevancia, considerando que la mala administración y uso de antibióticos tienen consecuencias directas sobre el ecosistema y la salud de los consumidores, generando afectaciones que pueden ir desde una simple alergia o el cambio del microbioma intestinal hasta la resistencia antibiótica (Schar, 2020).

Conclusiones

La validación del presente método de multiresiduos llevado a cabo en un equipo de UHPLC-MS/MS, ha mostrado que es confiable y preciso para 10 residuos comunes de antibióticos en muestras de trucha arcoíris, utilizando una extracción de varios pasos para eliminar impurezas y para aislar los analitos de la muestra. La validación también ha demostrado que la técnica podría servir incluso para una mayor cantidad de antibióticos o analitos, considerando que los resultados no se encuentran bordeando los límites del criterio de aceptación de la FDA. La validación con muestras comerciales indica la presencia de oxitetraciclina, lo que indica que, a pesar de no superar el límite máximo permitido en el producto, se requiere evaluar los tiempos de vida media y los procesos de degradación de los diferentes residuos en los productos acuícolas.

Los resultados obtenidos como parte de la validación de este método nos permiten proponerlo como una nueva herramienta que permite el análisis de multiresiduos de forma rutinaria, precisa y confiable y que puede ser usado por los organismos de control y regulación para un mejor manejo de la producción acuícola. Asimismo,

el método podría probarse en otras especies o adaptarse para determinar dichos residuos en el agua de los estanques. Además, posibilita las investigaciones sobre la metabolización y el tiempo de eliminación de los antibióticos en las especies acuáticas, lo cual ayudaría a verificar o mejorar el manejo del tratamiento farmacológico de acuerdo a las condiciones nacionales. Con ello se lograría la mejora de la calidad y se garantizaría la inocuidad de los productos acuáticas para los consumidores y por consiguiente se favorecería la imagen de nuestra industria acuática en el mercado nacional y extranjero.

Agradecimientos e información de financiamiento

Un agradecimiento especial al CITEacuática UPCH y específicamente a su Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria, en la Universidad Peruana Cayetano Heredia, por haber brindado sus instalaciones y recursos para la realización del presente estudio.

Contribución de autoría

Nathaly Hurtado, diseño de la investigación, ejecución, recopilación de la información, redacción e interpretación y revisión del manuscrito. Diego Chirinos, diseño de la investigación, ejecución, redacción, interpretación y revisión final del manuscrito. Diana Ochoa, redacción e interpretación y revisión final del manuscrito. Yenka Flores, redacción e interpretación y revisión final del manuscrito. Luis Huicho, revisión del proyecto, redacción e interpretación y revisión final del manuscrito. María Rivera-Chira, promoción y gestión del proyecto, redacción e interpretación y revisión final del manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no tienen conflictos de interés de ningún tipo.

Referencias

- Burka, J. F., Hammell, K. L., Horsberg, T. E., Johnson, G. R., Rainnie, D. J., & Speare, D. J. (1997). *Drugs in salmonid aquaculture - A review*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 20(5), 333-349. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.1997.00094.x>

- EURL. (2019). *Method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE/12682/2019*. <https://bit.ly/3cnKBlx>
- FDA. (2019). *Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products*. <https://bit.ly/3PyQOzR>
- Fedorova, G., Nebesky, V., Randak, T., & Grabic, R. (2013). Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS. *Chemical Papers*, 68(1), 29-36. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0428-3>
- Fernández, J. (2013). Flavobacterias en trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), procedentes del Lago Titicaca. *Rev. The Biologist*, 11(2), 205-215. https://sisbib.unmsm.edu.pe/brevistas/biologist/v11_n2/pdf/a3v11n2.pdf
- Fernando Mesías, V., Mario Vargas, L., Alexander Cueva, Q., Alberto Manchego, S., & Nieves Sandoval, C. (2019). Patogenicidad de una cepa de *Yersinia ruckeri* de un brote de yersiniosis en truchas arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) de Huaraz, Perú. *Rev Investig Vet del Perú*, 30(1), 387-403. <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v30n1/a39v30n1.pdf>
- FSIS. (2018). *Screening and Confirmation of Animal Drug Residues by UHPLC-MS-MS*. <https://bit.ly/3INDK7J>
- Geis-Asteggiante, L., Lehotay, S., Lightfield, A., Dutko, T., Ng, C., & Bluhm, L. (2012). Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography A*, 1258, 43-54. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.020>
- Grande-Martínez, Á., Moreno-González, D., Arrebola-Liébanas, F. J., Garrido-Frenich, A., & García-Campaña, A. (2018). Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 155, 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.03.029>
- Instituto de Salud Pública de Chile. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*.
- kanda, M., Nakajima, T., Hayashi, H., Hashimoto, T., Kanai, S., Nagano, C., Matsushima, Y., Tateishi, Y., Yoshikawa, S., Tsuruoka, Y., Sasamoto, T. & Takano I. (2015). Multi-residue determination of polar veterinary drugs in livestock and fishery products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 98(1), 230-247. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-272>
- Lee, M. (2012). *Mass spectrometry handbook*. J. Wiley & Sons.

- León, J., Ávalos, R., & Ponce, M. (2008). *Flavobacterium psychrophilum* y su patología en alevines de *Onchorhynchus mykiss* del centro piscícola El Ingenio, Huancayo. *Rev. Peruana de Biología*, 15(2), 117-124. <https://doi.org/10.15381/rpb.v15i2.1737>
- Li, T., Wang, C., Wang, C., & Chakraborty, A. (2020). A coupled method of on-line solid phase extraction with the UHPLC-MS/MS for detection of sulfonamides antibiotics residues in aquaculture. *Chemosphere*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126765>
- Mainero Rocca, L., Gentili, A., Pérez-Fernández, V., & Tomai, P. (2017). Veterinary drugs residues: a review of the latest analytical research on sample preparation and LC-MS based methods. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 34(5), 766-784. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1298846>
- Mendoza Bojorquez, R. & Palomino Ramos, A., (2004). Manual de cultivo de trucha arco iris en jaulas. FONDEPES. <https://bit.ly/3yOqUBn>
- Ministerio de la Producción del Perú. (2021). *Anuario estadístico pesquero y acuícola 2020*. <https://bit.ly/3OhQWTo>
- Montesinos, J. (2018). *Diagnóstico situacional de la crianza de truchas arco iris (Oncorhynchus mykiss) en centros de cultivo del lago titicaca*. [Tesis de maestría, Universidad Peruana Cayetano Heredia]. <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/3862>
- Nunes, K., Vallim, J., Assalin, M., Queiroz, S., Paraíba, L., Jonsson, C., & Reyes, F. (2018). Depletion study, withdrawal period calculation and bioaccumulation of sulfamethazine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) treated with medicated feed. *Chemosphere*, 197, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.030>
- Pereira Lopes, R., Cazorla Reyes, R., Romero-González, R., Martínez Vidal, J., & Garrido Frenich, A. (2012). Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 39-47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.011>
- Rocha Guidi, L., Alves Santos, F., Ribeiro, A., Fernandes, C., Silva, L., & Gloria, M. (2017). Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method. *Rev. Food Chem*, 1232-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.094>
- SANIPES. (2008). *Procedimiento: Control de residuos de medicamentos veterinarios, sustancias prohibidas y plaguicidas en la acuicultura*. <https://bit.ly/3AZ9N2p>

- SANIPES. (2016). *Programa oficial de vigilancia y control de enfermedades en animales acuáticos*. <https://bit.ly/3oh3XBO>
- SANIPES. (2017). *Procedimiento: Toma y envío de muestras para el programa control de sustancias prohibidas y residuos de productos en acuicultura*. <https://bit.ly/3J1CDkZ>
- SANIPES. (s.f.). Métodos de ensayo y/o alcance de inspección. <https://bit.ly/3aKuoNd>
- Santos, L., Rosa, J., Freitas, A., Leston, S., Barbosa, J., & Ramos, F. (2019). Detection and quantification of 47 antibiotic residues in farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using a multi-class and multi-residue UHPLC-MS/MS method. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry*, 36(4), 561-570. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1572229>
- Schar, D., Klein, E., Laxminarayan, R., Gilbert, M., & Van Boeckel, T. (2020). Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>
- SERNAPESCA. (2018). *Guía de Validación de Métodos Analíticos*. <https://bit.ly/3ySuQRP>
- Tao, L., Wang, C., Xu, Z., & Chakraborty, A. (2020). A coupled method of on-line solid phase extraction with the UHPLC-MS/MS for detection of sulfonamides antibiotics residues in aquaculture. *Chemosphere*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126765>
- Thompson, M., Ellison, S., & Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74(5), 835-855. <http://dx.doi.org/10.1351/pac200274050835>
- You-Yu, L., Xia-Lin, H., Yi-Fan, B., & Da-Qiang, Y. (2018). Simultaneous determination of 29 pharmaceuticals in fish muscle and plasma by ultrasonic extraction followed by SPE-UHPLC-MS/MS. *Journal of Separation Science*, 41(10), 2139-2150. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701360>

Apéndices

Apéndice 1

Datos del proveedor de las muestras utilizadas en la validación del método

Nombre de la empresa	RUC	Región	Cantidad de muestras	Fecha de recepción de la muestra
INVERSIONES ROQUE HERMANOS M & M SOCIEDAD ANONIMA CERRADA	20600640861	Pasco	2 kg	Octubre de 2019

Apéndice 2

Datos de las muestras obtenidas de los diferentes mercados

Ubicación del mercado	Peso total de muestra	Fecha de la compra
Los Olivos (M1)	Aprox. 1 kg	Diciembre 2019
Independencia (M2)	Aprox. 1 kg	Diciembre 2019
Independencia (M3)	Aprox. 1 kg	Diciembre 2019
Comas (M4)	Aprox. 1 kg	Enero 2020
Puente Piedra (M5)	Aprox. 1 kg	Enero 2020
San Martin de Porres (M6)	Aprox. 1 kg	Enero 2020

Apéndice 3

Antibióticos con registro sanitario en SANIPES (2021) y los límites máximos de estos residuos de acuerdo al Procedimiento de Control de Sustancias y Residuos (2008)

Producto	Registro Sanitario	Principio activo	LMR
TM-700	PV-PHI004I15TM70-SANIPES		
TERRIVET 80%	RSPV0006ITR	Oxitetraciclina	100 ppb
OXI-BLEND AQUA	RSPV0021IOI		
DUFLOSAN 50%	PV-VET005I15DFOA-SANIPES		
FLOR-BLEND AQUA	RSPV0004IFO	Florfénicol	1000 ppb
AQUAFLOR 50 %	RSPV0009IAU		
ENRO-BLEND AQUA	RSPV0003IER	Enrofloxacino	100 ppb